VANESSA UEMURA DA FONSECA

AVALIAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO DO PÂNCREAS DE
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS APÓS INJEÇÃO DE VEGF

São Paulo
2012

VANESSA UEMURA DA FONSECA

Avaliação da vascularização do pâncreas de camundongos diabéticos após injeção de VEGF

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento: Cirurgia

Área de Concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo
2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2624
FMVZ

Fonseca, Vanessa Uemura da
Avaliação da vascularização do pâncreas de camundongos diabéticos
após injeção de VEGF / Vanessa Uemura da Fonseca. -- 2012.
137 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo,
2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Pâncreas. 2. *Diabetes mellitus*. 3. Camundongos. 4. Fator de
crescimento endotelial vascular. 5. Terapia Gênica. I. Título.

ERRATA

FONSECA, V.U. Avaliação da vascularização do pâncreas de camundongos diabéticos após injeção de VEGF. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1º	FONSECA, V.U.	FONSECA, V. U.
Abstract	1º	Universidade de São Paulo, 2012.	Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
	1º	FONSECA, V.U.	FONSECA, V. U.
		Universidade de São Paulo, 2012.	Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da vascularização do pâncreas de camundongos diabéticos após a injeção de VEGF", protocolado sob o nº 2192/2011, utilizando 48 (quarenta e oito) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Vascularization of pancreas in diabetic mouse after VEGF injection", protocol number 2192/2011, utilizing 48 (forty-eight) mice, under the responsibility Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 19 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: FONSECA, Vanessa Uemura

Título: Avaliação da vascularização do pâncreas de camundongos diabéticos após injeção de VEGF

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto, devemos

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro.

(Fernando Sabino)

DEDICO

Aos meus pais, José Malaquias da Fonseca e Luiza Uemura da Fonseca, meus exemplos de dignidade, luta, esforço e vitória. Agradeço por me apoiarem em todas as decisões, por me darem suporte para chegar até aqui, a vocês tudo devo.

Ao meu noivo Vinícius Miranda Villas Bôas, pelo amor e companheirismo em todos os momentos ao longo desta dissertação, por estar ao meu lado quando obtive bons e maus resultados, pelos conselhos que me acalmaram e me incentivaram a levantar e continuar, por ir além sempre; pois ao invés de compreender a minha ausência, se fez presente nos mais inusitados dias e horários, seja em testes metabólicos sábado à noite ou troca de alcoóis e xilóis em véspera de ano novo.

A estes amores pacientes e incondicionais dedico este momento

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À querida mestre Paula de Carvalho Papa

Incrível como há tanto para dizer e como é difícil organizar as ideias e traduzir em palavras 8 anos de gratidão. Esse momento é uma oportunidade de agradecer por tudo o que pude vivenciar nessa nossa trajetória. Quando reflito sobre o que conquistei, reconheço em você uma das minhas mais fortes influências, incentivadora presente e fonte de inspiração. Iniciei minha trajetória na medicina veterinária navegando pelo mundo da pesquisa, conhecendo a área da endocrinologia e impressionada como os projetos eram criados.

Há 3,5 anos quando me formei descobri facilmente para onde caminharia minha profissão, pois no final da faculdade só havia um grande assunto que me fascinava, a endocrinologia; momento em que aliei duas paixões: a clínica e a endocrinologia. Mas atuar na área clínica não seria suficiente se não desse continuidade ao outro lado que me completa, a pesquisa.

Se me perguntarem se você sentou comigo e me ensinou a ter senso crítico, a criar ideias novas, a procurar informações e escrever um projeto, posso assegurar que não tenho essa lembrança. Se me perguntarem com quem aprendi tudo isso, é o seu nome que me vem à cabeça. E por mais contraditório que seja, refletindo sobre a nossa trajetória consigo reafirmar o que já imaginava, você é parte fundamental na minha educação e o seu objetivo como educadora com certeza foi atingido. Portanto, posso usar as palavras de um importante pedagogo para explicar isso:

"A principal meta da educação é criar homens que sejam capazes de fazer coisas novas, não simplesmente repetir o que outras gerações já fizeram. Homens que sejam criadores, inventores, descobridores. A segunda meta da educação é formar mentes que estejam em condições de criticar, verificar e não aceitar tudo que a elas se propõe." (Jean Piaget).

Agradeço por cada oportunidade que tive, pelos pesquisadores que conheci, por ter ido para o exterior, pelos eventos que participei, e principalmente, por me dar o caminho para conquistar o que mais me impressionava nos pesquisadores: a criatividade de criar projetos e senso crítico sobre assuntos científicos.

Obrigada por acreditar na minha capacidade!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu querido Prof^o Dr. Sang Won Han, que tive a sorte de conhecer no início desta trajetória, obrigada por me acolher em seu laboratório e por fazer de mim parte dele. Obrigada por me colocar em contato com todos os pesquisadores e técnicos de que precisei para conseguir os animais para o projeto, protocolos, espaços e materiais. Não sei bem em que momento conquistei a sua confiança, mas sou grata pelas oportunidades de conhecer além do meu assunto de domínio, por fazer parte de diferentes projetos e poder contribuir com outros pesquisadores. Por tudo isso, o considero meu coorientador, pois me ensinou muito sobre o fantástico mundo da terapia gênica, me proporcionou estrutura para execução de parte do projeto, me cobrou resultados, os discutiu comigo e vibrou com cada um deles.

AGRADECIMENTOS

À Bianca Ferrarini Zanetti, por estarmos juntas neste mestrado desde o início, por poder contar com a sua ajuda a qualquer momento e em qualquer situação, por me ensinar muito sobre biologia molecular tornando este assunto mais interessante e mais fácil, por se engajar neste estudo e dispor de seu tempo em todas as etapas me auxiliando sempre que precisei e por me ajudar na construção do vetor lentiviral. Agradeço à Deus por ter te conhecido, obrigada por sua amizade, você é parte fundamental deste projeto!

À Renata Santos Silva e Valdir Pavanelo Junior, meus queridos amigos, por tornarem a pós-graduação um ambiente além de científico também descontraído, pelos almoços, pelas conversas e pelos diversos experimentos juntos que realizamos.

À Luciana Alves de Fátima e Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa, pela paciência em responder diversas perguntas, por dispor de tempo para explicar mesmo estando atarefadas e por todos os experientes ensinamentos.

À Carolina Dutra Queiroz Flumignan, por auxiliar nas cirurgias de injeção do vetor com suas delicadas e experientes mãos de cirurgiã vascular.

Ao Prof^o Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda, por me ensinar um pouco do que sabe sobre estereologia, por ser receptivo, generoso e tão atencioso comigo e com todos os alunos desta escola.

Aos professores doutores José Roberto Kfoury Junior, Maria Angélica Miglino e Francisco Javier Hernandez Blazquez, por sempre manterem as portas de seus laboratórios abertas a todos os alunos de pós graduação deste setor, nos concedendo alguns materiais e equipamentos complementares e indispensáveis ao nosso estudo.

Aos alunos do Centro de Investigação em Terapia Gênica da UNIFESP, especialmente a doutoranda Priscila Matsumoto pelas dicas que fizeram com que dificuldades encontradas em protocolos experimentais fossem transpostas.

Aos pós graduandos e graduandos pela prazerosa convivência e pelos momentos em que pudemos trabalhar juntos, em especial: Garros Fontinha, Felipe Juscele, Jaqueline Hanassaka, Giuliano Gustavo Lesnau, Juliana Ferrão, Antenor Pereira Bonfim Neto.

Aos queridos amigos, André Luis Soares dos Santos e Alessandra Martins Vargas, por apoiarem e acompanharem minha trajetória, e por compreenderem minhas decisões profissionais.

À equipe do setor de Anatomia da FMVZ-USP, em especial: Ronaldo Agostinho da Silva, Jacqueline Martins de Santana, Maicon Silva e Diogo Palermo Neto por toda a colaboração nestes anos.

À Valderez Bastos Valero Lapchik e Gui Mi Ko, pelo auxílio na obtenção e manejo dos animais de laboratório deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por financiar grandes projetos que possibilitaram a execução deste estudo, por auxiliar e participar da realização de grandes sonhos.

RESUMO

FONSECA, V.U. Avaliação da vascularização do pâncreas de camundongos diabéticos após injeção de VEGF. [Vascularization of pancreas in diabetic mice after VEGF injection]. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

Há um número crescente de pessoas e animais com obesidade e sobrepeso, com consequente aumento no número de pacientes resistentes à insulina e portadores de *Diabetes mellitus* (DM). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) tem sido caracterizado como uma molécula importante em inúmeros mecanismos fisiopatológicos. Em diabéticos, pesquisas indicam uma redução deste fator em alguns tecidos estudados, sendo esta menor expressão envolvida com o desenvolvimento de hipóxia tecidual e não cicatrização de feridas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivos caracterizar um modelo diabético induzido por dieta, avaliar a vascularização, expressão gênica e proteica do VEGFA e seus receptores FLT1 e KDR em pâncreas de camundongos diabéticos e não diabéticos, antes e após a terapia gênica com VEGF. O estudo consistiu de 2 fases para as quais foram utilizados cinquenta camundongos, na primeira fase foram utilizados 28 animais distribuídos em 6 grupos experimentais: submetidos à dieta controle (CT) e dieta hipercalórica (DH) por 3, 4 e 6 meses. Na segunda fase, 4 grupos experimentais foram avaliados aos 4 meses: CT e DH sem vetor terapêutico (CTPLL e DHPLL) e CT e DH com vetor terapêutico (CTVEGF e DHVEGF). A análise gênica pelo PCR em tempo real e proteica pela imuno-histoquímica evidenciou queda na expressão de VEGF, FLT1 e KDR no grupo DH, sendo que a variável estereológica de densidade de volume vascular (Vv) indicou queda significativa ($p < 0,05$) da vascularização pancreática no grupo DH em relação ao CT aos 3, 4 e 6 meses do estudo. O DM foi caracterizado com queda significativa ($p < 0,05$) na insulinemia após 4 meses com DH. Após a injeção pancreática no grupo DHVEGF do lentivírus contendo a sequência que condifica o VEGF, foram observados aumento na expressão gênica de VEGF, FLT1 e KDR ($p < 0,05$), com aumento de Vv vascular pancreático e aumento na insulinemia. Os resultados obtidos sugerem que é possível obter um modelo animal diabético induzido por dieta, que o VEGF e seus receptores participam da evolução e estabelecimento do quadro diabético, levando a uma redução da vascularização pancreática, e que o aumento na expressão do transgene no

pâncreas de camundongos diabéticos possa contribuir para a revascularização pancreática e função das células B.

Palavras chaves: Pâncreas. *Diabetes mellitus*. Camundongos. Fator de Crescimento Endotelial Vascular. Terapia Gênica.

ABSTRACT

FONSECA, V.U. Vascularization of pancreas in diabetic mice after VEGF injection. [Avaliação da vascularização do pâncreas de camundongos diabéticos após injeção de VEGF]. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

There is an increasing number of people and pets showing overweight and obesity, with a consequent growth of the number of insulin-resistant and diabetic patients. The vascular endothelial growth factor (VEGF) has been characterized as an important molecule in many physiopathological states. Recent studies indicate a reduction in VEGF content in some tissues of diabetic patients causing tissue hypoxia and impairing cicatrization. In this context, this study aimed to characterize a diet-induced diabetic animal model and to evaluate vascularization, gene and protein expression of VEGFA and its receptors KDR and FLT1, in pancreas of diabetic and non-diabetic mice before and after gene therapy with VEGF. The study was divided in two phases and fifty male mice were used. In the first phase 28 animals were distributed into 6 groups: control diet (CT) and high calorie diet (DH) for 3, 4 and 6 months. In the second phase, four experimental groups were evaluated at 4 months: CT and DH without therapeutic vector (CTPLL and DHPLL) and CT and DH with therapeutic vector (CTVEGF and DHVEGF). The genetic analysis using real time PCR and protein by immunohistochemistry showed decrease in expression of VEGF, FLT1 and KDR in the DH group, and the stereological estimate of vascular volume density (Vv) indicated a significant decrease ($p < 0,05$) of vascularization in pancreatic DH group relative to the CT at 3, 4 and 6 months of the study. Diabetic mice were characterized with a significant decrease ($p < 0,05$) in insulin after 4 months with DH. After injection of lentivirus containing the VEGF sequence in DHVEGF's pancreas, increase in VEGF, FLT1 and KDR gene expression ($p < 0,05$) was observed, accompanied by the increase of vascular Vv and insulinemia. The results suggest that it is possible to obtain a diabetic animal model induced by diet, that VEGF and its receptors participate in the development and establishment of the diabetic state, leading to a reduction of pancreas vascularization, and that the increase of transgene expression in the pancreas of diabetic mice may contribute to the revascularization and function of pancreatic B cells.

Keywords: Pancreas. *Diabetes mellitus*. Mice. Vascular Endothelial Growth Factor. Gene Therapy.

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
µg	microgramas
µL	microlitros
µm ²	micrometros quadrados
ADA	adenosina desaminase
AIN	Instituto Americano de Nutrição
Akt	proteína quinase B
APES	3-aminopropiltriethoxi-silano
A _T	área teste
BSA	albumina sérica bovina
CMV	promotor forte de citomegalovírus
cm ²	centímetros quadrados
CT	dieta controle
CTPLL	animais com dieta controle e com injeção do vetor lentiviral sem gene terapêutico
CTVEGF	animais com dieta controle e com injeção do vetor lentiviral com gene terapêutico
DAB	diaminobenzidina
DH	dieta hipercalórica
DHPLL	animais com dieta hipercalórica e com injeção do vetor lentiviral sem gene terapêutico
DHVEGF	animais com dieta hipercalórica e com injeção do vetor lentiviral com gene terapêutico
dL	decilitro
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMEM- SFB 10%	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> contendo 10% de soro fetal bovino
DMID	<i>Diabetes mellitus</i> dependente de insulina
DMNID	<i>Diabetes mellitus</i> não dependente de insulina
E	eficiência
FLT1	<i>Fms-like tyrosine kinase</i> – 1
Flt4	<i>Fms-like tyrosine kinase</i> – 4

GAG	proteínas que compõem matriz e capsídeo viral
GFP	proteína fluorescente verde
GLP1	peptídeo semelhante ao glucagon
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HSPG	proteoglicanos de sulfato de heparina
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IL1Ra	antagonista do receptor de interleucina 1
IL1B	interleucina 1B
IRES2	sítio de entrada ribossomal interno
JNK	c-Jun quinase N-terminal
KDR	<i>Kinase insert domain containing region</i>
LB	Luria-Bertani broth
LDL	lipoproteína de baixa densidade
Lv	densidade de comprimento
mg	miligrama
MINIPREP	pequena extração de vetor plasmidial
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetros
mm ³	milímetros cúbicos
NFkB	fator nuclear-kB
NRP	neurofilina
°C	graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI3K	fosfatidil inositol 3-quinase
PIGF	fator de crescimento da placenta
POL	Proteínas transcriptase, protease e integrase
Pp	número de pontos teste
P _T	número total de pontos teste contidos no sistema teste
Q _A	densidade numérica por área
REV	proteína reguladora da expressão do virion
RPM	rotações por minuto
SM	síndrome metabólica

Sv	densidade de superfície
TBF-1	<i>Tuber borchii fruiting body-1</i>
TG	terapia gênica
TTG	teste de tolerância à glicose
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
VSVG	glicoproteína do vírus da estomatite vesicular
Vv	densidade de volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de representação das principais diferenças entre as isoformas do VEGFA (adaptado de Grunewald et al., 2010).....	34
Figura 2.	Representação esquemática da obtenção de cortes seriados ao longo de todo o órgão.....	46
Figura 3.	Representação de uma área teste (A_T) com as linhas de proibição e permissão e a esquematização de contagem dos vasos marcados com anticorpo anti-CD31 dentro da A_T na interface do programa Stepanizer.....	49
Figura 4.	Representação de uma área teste (A_T) com 81 pontos teste e a esquematização de contagem dos vasos marcados com anticorpo anti-CD31 que tocam estes pontos.....	50
Figura 5.	Fotomicrografias do pâncreas de camundongos, imuno marcação anti-CD31 em área de ilhota pancreática (A) e região acinar (B). Barras de 50 μ m.....	74
Figura 6.	Fotomicrografias da expressão da proteína VEGF no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) ao longo de 3 (A), 4 (C) e 6 meses (E), e dieta hipercalórica (DH) ao longo de 3 (B), 4 (D) e 6 meses (F). Legenda: ip , ilhota pancreática; ra , região acinar; CN , controle negativo. Barras: 50 μ m.....	78
Figura 7.	Fotomicrografias da expressão da proteína FLT1 no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) ao longo de 3 (A), 4 (C) e 6 meses (E), e dieta hipercalórica (DH) ao longo de 3 (B), 4 (D) e 6 meses (F). Legenda: ip , ilhota pancreática; ra , região acinar; CN , controle negativo. Barras: 50 μ m.....	79
Figura 8.	Fotomicrografias da expressão da proteína KDR no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) ao longo de 3 (A), 4 (C) e 6 meses (E), e dieta hipercalórica (DH) ao longo de 3 (B), 4 (D) e 6 meses (F). Legenda: ip , ilhota pancreática; ra , região acinar; CN , controle negativo. Barras: 50 μ m.....	80
Figura 9.	Alinhamento das sequências de RNAm de VEGFA das espécies humana e murina.....	84
Figura 10.	Mapa do vetor plasmidial gT-VEGF indicando o sítio de restrição enzimática para isolamento da sequência VEGFA.....	85
Figura 11.	Sítios de restrição de Eco RI e Eco RV na região de sítio de múltipla clonagem (SMC) do vetor plasmidial pBluescript.....	86
Figura 12.	Gel de agarose 1% com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII	

	evidenciando o vetor pBluescript (pBSK) linearizado (2961pb).....	86
Figura 13.	Gel de agarose 1% evidenciando o vetor pBSK (2961pb) e o gene VEGF inserido no pBSK (3537pb).....	87
Figura 14.	Gel de agarose 1% A) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII evidenciando o vetor PLL 3.7 CMV-Neo-IRES2-EGFP (1) e o mesmo vetor após digestão com BAMHI (2) e B) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII evidenciando o vetor PLL 3.7 CMV-IRES2-EGFP (8295pb) e o inserto Neo (1015pb) retirado após digestão com NheI (1).....	88
Figura 15.	Gel de agarose 1% A) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII evidenciando o vetor pBSK (2961pb) digerido com XbaI e EcoRV para retirada do inserto VEGF (1) e B) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII evidenciando a purificação do vetor PLL3.7 CMV-IRES2-EGFP (1; 8295pb) e do inserto VEGF (2; 576pb).....	89
Figura 16.	Gel de agarose 1% 1) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII e 3) marcador molecular de 100 pb evidenciando 2) o vetor PLL-CMV-VEGF-IRES2-EGFP com a correta inserção de VEGF após a digerido com a enzima NcoI e correspondentes fragmentos 4554, 2845, 1088, 323 pb.....	90
Figura 17.	Titulação lentiviral em células HEK utilizando 0,1; 1, 5 10, 15 e 20 μ L de lentivírus, correspondendo à A, B, C, D, E e F, respectivamente. A letra seguida do número 1 indica a fotomicrografia sob contraste de fase e 2 sob luz fluorescente.....	91
Figura 18.	Fotomicrografias do pâncreas de camundongos, imuno marcação anti-GFP em ilhota pancreática (A) e região acinar (B). Barras de 50 μ m.....	92
Figura 19.	Fotomicrografias da expressão da proteína VEGF no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT, C) e hipercalórica (DH, D) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL, G , e DHPLL, H), com vetor com gene VEGF (CTVEGF, I e DHVEGF, J) ao longo de 4 meses. Legenda: ip , ilhota pancreática; ra , região acinar; CN , controle negativo. Barras: 50 μ m.	99
Figura 20.	Fotomicrografias da expressão da proteína FLT1 no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT, C) e hipercalórica (DH, D) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL, G , e DHPLL, H), com vetor com gene VEGF (CTVEGF, I e DHVEGF, J) ao longo de 4 meses. Legenda: ip , ilhota pancreática; ra , região acinar; CN , controle negativo. Barras: 50 μ m.	100

Figura 21. Fotomicrografias da expressão da proteína KDR no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT, **C**) e hipercalórica (DH, **D**) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL, **G**, e DHPLL, **H**), com vetor com gene VEGF (CTVEGF, **I** e DHVEGF, **J**) ao longo de 4 meses. Legenda: **ip**, ilhota pancreática; **ra**, região acinar; **CN**, controle negativo. Barras: 50µm..... 101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Valores nutricionais e composição das rações da dieta controle (CT) e do grupo com dieta hipercalórica (DH), segundo o padrão AIN-93.....	42
Quadro 2.	Primers para VEGF, FLT1, KDR e beta actina murino para PCR em tempo real.....	56
Quadro 3.	Vetores e enzimas de restrição utilizadas para construção do lentivírus contendo o gene de interesse.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	No eixo Y consumo médio de ração diária por animal por dia do grupo controle (CT) e grupo com dieta hipercalórica (DH), sendo no eixo X a representação dos 6 meses do estudo.....	69
Gráfico 2.	Peso médio dos animais do grupo controle (CT) e grupo com dieta hipercalórica (DH) ao longo de 6 meses. A representação por # representa os meses em que houve diferença significativa entre os grupos CT e DH ($p<0,05$).....	70
Gráfico 3.	Concentração média de insulina plasmática (ng/mL) e erro padrão dos animais controles (CT) e com dieta hipercalórica (DH) ao longo de 6 meses. Representação por asteriscos comparam o grupo DH e # diferenças significativas entre o grupo CT e DH ao longo de 6 meses (sendo $p<0,05$).....	71
Gráfico 4.	Curva da média das glicemias (mg/dL) dos animais submetidos à dieta CT frente ao desafio de glicose intraperitoneal nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.....	72
Gráfico 5.	Curva da média das glicemias (mg/dL) dos animais submetidos à dieta DH frente ao desafio de glicose intraperitoneal no tempo 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.....	72
Gráfico 6.	Área sob a curva (cm^2) e erro padrão dos gráficos de teste de tolerância à glicose dos grupos CT e DH. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p<0,05$) entre o grupo CT e DH ao longo dos 6 meses de avaliação.....	73
Gráfico 7.	Densidade de volume vascular do pâncreas (Vv) de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) ao longo de 3, 4 e 6 meses. As barras representam a média $\pm$ erro padrão, sendo a representação por # indicativo de diferenças significativas entre os grupos CT e DH ($p<0,05$).....	75
Gráfico 8.	Densidade de comprimento vascular do pâncreas (Lv) de camundongos submetidos à dieta CT e DH durante 3, 4 e 6 meses ($n=4$). As barras representam a média $\pm$ erro padrão, # representa diferença significativa entre os grupos CT e DH.....	76
Gráfico 9.	Expressão relativa de RNAm de VEGF (A), FLT1 (B) e KDR (C) no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH). As barras representam a média $\pm$ erro padrão, asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos DH e representação por # entre CT e DH (	

	p<0,05).....	82
Gráfico 10.	Concentração de insulina plasmática (ng/mL) e erro padrão dos animais submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF). A representação por asteriscos evidenciam diferenças significativas entre os grupos DH aos 3 meses e # diferenças entre grupos CT e DH aos 3 e 4 meses (p<0,05). A letra a evidencia que não houve diferença na comparação entre grupos DH aos 4 meses (p>0,05).....	93
Gráfico 11.	Curva da média das glicemias (mg/dL) dos animais submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) frente ao desafio de glicose intraperitoneal no tempo 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos...	94
Gráfico 12.	Área sob a curva (cm ²) e erro padrão dos gráficos de teste de tolerância à glicose dos grupos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) ao longo de 4 meses. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos CT e DH (p<0,05).....	95
Gráfico 13.	Densidade de volume vascular do pâncreas (Vv) de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) ao longo de 4 meses (n=4). As barras representam a média ± erro padrão e # indica diferença significativa entre CT e DH (p<0,05).....	96
Gráfico 14.	Densidade de comprimento vascular do pâncreas (Lv) de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) ao longo de 4 meses (n=4). As barras representam a média ± erro padrão e # indica diferença significativa entre CT e DH (p<0,05).....	97
Gráfico 15.	Expressão relativa de RNAm de VEGF (A), FLT1 (B) e KDR (C) no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) ao longo de 4 meses (n=4). As barras representam a média ± erro padrão, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos CT, asteriscos entre os grupos DH e # entre CT e DH	

($p < 0,05$).....	103
---------------------	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	30
2.1 <i>DIABETES MELLITUS</i> : CLASSIFICAÇÃO E FISIOPATOGENIA	30
2.2 PREVALÊNCIA DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	31
2.3 EVOLUÇÃO DO <i>DIABETES MELLITUS</i> : COMPENSAÇÃO, PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE.....	31
2.4 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF) E SEUS RECEPTORES	33
2.5 EFEITOS BIOLÓGICOS DO VEGFA.....	35
2.6 VEGF NO PÂNCREAS	35
2.7 TERAPIA GÊNICA NO <i>DIABETES MELLITUS</i>	36
3 OBJETIVOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 MODELO EXPERIMENTAL	42
4.2 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
4.3 CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DOS ANIMAIS	43
4.4 MENSURAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA	44
4.5 ESTEREOLOGIA DE VASOS.....	45
4.5.1PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA ANÁLISE ESTEREOLÓGICA	45
4.5.2 MARCAÇÃO DE CD31 POR IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	46
4.5.3SISTEMAS TESTE PARA A QUANTIFICAÇÃO VASCULAR.....	47
4.6 IMUNOLOCALIZAÇÃO TECIDUAL DO VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR)..	50
4.7 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE RNAm	51
4.7.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL.....	51

4.7.2 REMOÇÃO DE IMPUREZAS DO RNA.....	52
4.7.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA	53
4.7.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO PCR EM TEMPO REAL.....	54
4.7.5 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL	54
4.7.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i>	55
4.7.7 DETERMINAÇÃO DO <i>THRESHOLD</i>	57
4.7.8 EXPRESSÃO RELATIVA DO RNA _m	57
4.8 CONSTRUÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL CONTENDO O GENE VEGF	58
4.8.1 CLONAGENS.....	58
4.8.2 PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS EM GEL DE AGAROSE	59
4.8.3 LIGAÇÃO DE INSERTOS EM VETORES PLASMIDIAIS	60
4.8.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E AMPLIFICAÇÃO DO VETOR PLASMIDIAL.....	60
4.8.5 PEQUENA EXTRAÇÃO DE VETOR PLASMIDIAL (MINIPREP)	61
4.8. 6 PREENCHIMENTO DE EXTREMIDADES COESIVAS	61
4.8.7 PRODUÇÃO DO LENTIVÍRUS	62
4.8.8 CONCENTRAÇÃO DO LENTIVÍRUS.....	63
4.8.9 TITULAÇÃO DO LENTIVÍRUS.....	63
4.9 INJEÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL CONTENDO O GENE VEGF NO PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS	64
4.10 IDENTIFICAÇÃO DE GFP POR IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	64
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5 RESULTADOS	68
5.1 PRIMEIRA FASE: PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL E CONFIRMAÇÃO DA HIPÓTESE INICIAL.	68
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DOS ANIMAIS	68
5.1.2 ESTEREOLOGIA VASCULAR PANCREÁTICA	74
5.1.3 IMUNO-LOCALIZAÇÃO TECIDUAL DO VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR).....	76

5.1.4 EXPRESSÃO RELATIVA DO GENES VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR)	81
5.2 SEGUNDA FASE: TERAPIA GÊNICA NO PÂNCREAS	83
5.2.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL CONTENDO O GENE VEGF	83
5.2.1.1 ISOLAMENTO DO GENE VEGFA	83
5.2.1.2 SUBCLONAGEM DO GENE VEGF EM VETOR PLASMIDIAL pBLUESCRIPT	85
5.2.1.3 PREPARO DO VETOR PLL 3.7 PARA INSERÇÃO DO INSERTO VEGF	87
5.2.1.4 CLONAGEM DO VETOR PLL 3.7 CMV-VEGF-IRES2-EGFP	88
5.2.2 INJEÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL NO PÂNCREAS.....	91
5.2.3 PARÂMETROS METABÓLICOS.....	92
5.2.4 ESTEREOLOGIA VASCULAR PANCREÁTICA	95
5.2.5 IMUNO-LOCALIZAÇÃO TECIDUAL DO VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR).....	97
5.2.6 EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAm de VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR)	102
6 DISCUSSÃO	105
7 CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS	117
APÊNDICES	130

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença conhecida desde a antiguidade. As primeiras descrições foram documentadas pelos egípcios, descrevendo uma enfermidade caracterizada por excessiva produção urinária. Porém, foi o médico grego Arateus da Capadócia, no século II, quem conferiu ao termo diabetes o significado de “sifão”, para explicar o que observava em seus pacientes, a “liquefação da carne e dos ossos em urina”.

Há um número crescente de pessoas e animais com obesidade e sobrepeso, portanto um aumento no número de pacientes resistentes à insulina e com risco de desenvolvimento de DM. A resistência à insulina e a hiperinsulinemia são disfunções metabólicas envolvidas na patogênese do diabetes e, quando presentes e associadas à dislipidemia, obesidade e hipertensão arterial sistêmica constituem a chamada síndrome metabólica, que é fator de risco para diversas outras doenças, como por exemplo, cardiovasculares, cerebrovasculares e arteriais periféricas.

O DM constitui umas das principais doenças que afetam homens e animais de companhia, com importância crescente devido ao aumento exponencial de sua prevalência e seu impacto social, econômico e na qualidade de vida de pessoas e animais. A obesidade e o DM tornaram-se um problema de saúde pública mundial. Há cerca de 500 milhões a 1,4 bilhões de pessoas entre sobrepeso e obesidade. Estima-se que existam mais de 347 milhões de pessoas com diabetes no mundo, sendo que projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS) para 2030 estimam que este número possa dobrar. Já na Medicina Veterinária estima-se que 25 a 35% dos cães e gatos estejam com sobrepeso a obesidade, e que de cada 100 a 500 animais 1 seja diabético.

No mundo todo, milhares de pesquisadores procuram encontrar a cura do DM. Neste contexto, pesquisas avançam na tentativa de melhor compreender o papel de cada um dos elementos envolvidos na fisiopatogenia do diabetes, bem como no desenvolvimento de modelos experimentais e possíveis protocolos terapêuticos.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) tem surgido como uma molécula importante em inúmeros mecanismos fisiológicos e patológicos. Em diabéticos, pesquisas sugerem que há redução deste fator em alguns tecidos estudados, sendo esta menor expressão envolvida com o desenvolvimento de hipóxia tecidual e não cicatrização de feridas. Entretanto, o VEGF também aumenta a permeabilidade vascular a macromoléculas e propicia

a quimiotaxia de monócitos. Desta forma, também é descrito como uma molécula pró-inflamatória.

Atualmente muitos recursos são investidos na pesquisa de moléculas que mimetizem ou antagonizem a ação dos fatores de crescimento responsáveis pela vascularização, os quais pertencem principalmente à família do VEGF. Aliada à busca por novas drogas, a biotecnologia avança rapidamente e já permite que organismos/órgãos lesados por excesso ou falta dos fatores de crescimento associados à vascularização sejam tratados por meio de terapia celular e/ou gênica. Neste contexto, o foco deste trabalho foi o pâncreas, pois acreditou-se que o conhecimento do papel do VEGF nos mecanismos fisiopatogênicos seja parte fundamental para a compreensão do desenvolvimento do diabetes. O presente estudo visou inicialmente caracterizar as alterações metabólicas, vascularização e a expressão do VEGF no tecido pancreático de camundongos diabéticos. Em seguida, almejou-se testar a hipótese de que a terapia gênica com o VEGF no pâncreas pudesse contribuir para a revascularização do pâncreas e auxílio em sua função, evitando assim o processo de falência das células B.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS: CLASSIFICAÇÃO E FISIOPATOGENIA

A primeira grande evidência de uma descrição do *Diabetes mellitus* (DM) foi registrada em 1550 a.C. no papiro de Ebers. Posteriormente, dois médicos gregos na Era Romana, Galeno (130-201 d.C.) em Roma, e Arateus da Capadócia descreveram a doença com maior propriedade. Em 1674, Thomas Willis, médico e anatomista inglês, descobriu ao provar a urina de indivíduos diabéticos, que esta era adocicada. Mas apenas em 1776, Matthew Dobson na Inglaterra, conseguiu provar que os indivíduos diabéticos expelem mais açúcar na urina, após ferver a urina e constatar resíduo cristalino. O ponto decisivo na história da descoberta da patogênese do diabetes foi marcado pelo trabalho experimental de Joseph Von Mering e Oscar Minkowski, que em 1889 realizaram pancreatectomia completa em dois cães, cujo resultado observado em menos de um dia foi micção frequente e abundante. Em 1910, Jean Meyer sugeriu que a secreção pancreática que faltava no DM deveria, quando fosse encontrada, ser chamada de “insulina”, em menção à sua origem nas ilhotas pancreáticas, descritas por Paul Langerhans (BARNETT; KRALL, 2005).

O DM é uma desordem metabólica caracterizada pela elevação dos níveis séricos de glicose resultante do defeito na secreção de insulina, ação da insulina ou ambos (ASSOCIATION, 2012). A classificação do diabetes é dada segundo os mecanismos fisiopatogênicos e a necessidade de insulina. O DM pode ser classificado como tipo 1, caracterizado por uma combinação de susceptibilidade genética e destruição imunológica de células beta, resultando em progressiva a completa deficiência insulínica. Já o DM tipo 2 é caracterizado por resistência insulínica e disfunção das células beta com inadequada resposta compensatória, desta maneira o tratamento pode ser baseado no uso de insulina ou em alguns casos controlado através de dieta, exercício e/ou hipoglicemiantes orais (FELDMAN; NELSON, 2004; ASSOCIATION, 2012). Entretanto, na medicina veterinária, o DM é mais comumente classificado pela necessidade insulínica para controle dos níveis glicêmicos e não por seu mecanismo fisiopatológico. Desta forma, classificado em dependente de insulina (DMID) ou não dependente de insulina (DMNID) (FELDMAN; NELSON 2004). A Associação Americana de Diabetes define ainda outros tipos de DM, os de origem em 1)

defeitos genéticos na função da célula B, 2) defeitos genéticos no mecanismo de ação da insulina, 3) doenças exócrinas que interferem na função endócrina, 4) doenças secundárias à endocrinopatias, 5) doenças induzidas por medicamentos, 6) doenças secundárias à infecções e 7) DM gestacional (ASSOCIATION, 2012).

2.2 PREVALÊNCIA DO *DIABETES MELLITUS*

O DM é um dos mais importantes problemas de saúde no mundo, possui incidência crescente, principalmente em países em desenvolvimento (OMS, 2012). Estima-se que o número de pessoas com diabetes aumentou de 153 milhões de pessoas em 1980 para 347 milhões em 2008 (DANAIE et al., 2011). Dentre os 347 milhões de indivíduos, aproximadamente 5 a 10% possuem o DM tipo 1, enquanto aproximadamente 90 a 95% possuem a forma mais comum, o DM tipo 2, influenciado principalmente pela obesidade (OMS, 2012). O DM é considerado a quinta maior causa de morte no mundo (ROGLIC et al., 2005), em 2004 aproximadamente 3,4 milhões de pessoas morreram em decorrência da doença e a OMS projeta que o número de mortes por ano irá dobrar até 2030 (OMS, 2012).

A prevalência de DM em cães e gatos é semelhante, com frequência relatada variando entre 1 a cada 100 indivíduos a 1 a cada 500 indivíduos, ou seja, de 0,002 a 0,01% (PANCIERA et al., 1990). Um estudo populacional recente com 182 mil cães determinou que 13 a cada 10000 cães (0,0013%) desenvolvem diabetes (FALL et al., 2007). Em um hospital norte americano a prevalência de gatos diabéticos atendidos aumentou expressivamente em 30 anos, sendo que em 1970 a prevalência era de 0,08% e em 1999 foi de 1,2% (PRAHL et al., 2007).

2.3 EVOLUÇÃO DO *DIABETES MELLITUS*: COMPENSAÇÃO, PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE

A síndrome metabólica (SM) foi apontada como fator preditor de DM tipo 2 (LAAKSONEN et al., 2002; LORENZO et al., 2003). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF) a definição de SM é a condição em que o indivíduo apresenta obrigatoriamente obesidade central associada a dois ou mais critérios, que podem ser hipertensão, dislipidemia e hiperglicemia (ALBERTI et al., 2005). A obesidade é um importante fator de impacto para a alta prevalência de DM tipo 2, por reduzir a sensibilidade insulínica em tecidos periféricos com consequente aumento de secreção de insulina pelas células B (BERGMAN, 2005). Acredita-se que a resistência insulínica também aumente com a idade, devido ao aumento da adiposidade, redução da massa muscular, mudanças no hábito alimentar e redução na atividade física (SCHEEN, 2005).

A hiperglicemia crônica tem efeitos adversos sobre a função da ilhota, pois há uma dessensibilização à glicose, exaustão das células B e redução da secreção da insulina, bem como do estoque desta insulina, processo denominado de glicotoxicidade (SAKO; GRILL, 1990). A glicose leva à ativação da via Fas, através da ativação do receptor de superfície celular Fas (CD95), e estimula a produção da citocina interleucina 1B (IL1B), via e fator ligados à proliferação e apoptose (MAEDLER et al., 2002). A hiperglicemia tem duplo efeito sobre a célula B, pois inicialmente induz proliferação deste grupo celular e apoptose a longo prazo (MAEDLER et al., 2001). Pick e colaboradores(1998), baseados na avaliação da massa de células B e a taxa de replicação dessas células em ratos diabéticos e não diabéticos, demonstraram que as mudanças observadas na massa celular não ocorrem devido a uma falência na proliferação celular, mas a uma mudança no balanço entre a neogenese e a apoptose de células B, predominando a via apoptótica.

A expressão de Fas induzida pelas citocinas na célula B requer a ativação e transcrição do fator nuclear-kB (NFkB) (DARVILLE; EIZIRIK, 2001). O NFkB entra no núcleo, e afeta a transcrição do gene envolvido na resposta inflamatória, portanto, o NFkB é um componente essencial da sinalização pela citocina na célula B. As espécies de oxigênio reativas causam dano direto à este grupo celular pela oxidação de ácidos nucléicos e proteínas, e inativação de genes envolvidos na proteção (RABINOVITCH; SUAREZ; POWER, 1992). Ferramentas potentes para bloquear o efeito de IL 1B envolve a inibição da via c-Jun quinase N-terminal (JNK) e também o uso do antagonista do receptor IL 1 (IL 1Ra) (BONNY et al., 2001). O IL 1Ra protege as ilhotas dos efeitos deletérios da glicose (MAEDLER et al., 2002) e do IL 1B (TÉLLEZ et al., 2005). A administração in vivo de IL 1Ra protege ratos da diabetes induzida por dieta (SAUTER et al., 2008) e pode melhorar o controle glicêmico e a função de células B (LARSEN et al., 2007).

A hiperglicemia afeta negativamente a função da célula B, desencadeando o processo de apoptose, falência e redução da quantidade de insulina secretada (KAISER; LEIBOWITZ; NESHER, 2003; DONATH; HALBAN, 2004). Desta forma, no momento do diagnóstico do DM tipo 2 já ocorreu perda de 60% das células B pancreáticas (BUTLER et al., 2003).

2.4 FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF) E SEUS RECEPTORES

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) foi descoberto em 1983 por Senger e colaboradores, que inicialmente o denominou de fator de permeabilidade vascular, devido a sua propriedade notada em alguns tumores de promover extravasamento vascular.

A família VEGF compreende sete glicoproteínas denominadas VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF e fator de crescimento da placenta (PIGF) (HOUCK et al., 1991; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; SUTO et al., 2005). Em mamíferos o VEGFA, B, C e o PIGF são necessários para a formação de vasos sanguíneos, enquanto o VEGFC e D regulam a formação de vasos linfáticos (JUSSILA; ALITALO, 2002; TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005). Além disso, a família do poxvírus codifica homólogos de VEGFA denominados VEGFE, que mostram um elevado grau de identidade estrutural com o VEGFA (MERCER et al., 2002). Diversas proteínas semelhantes ao VEGF isoladas em veneno de cobra são chamadas atualmente de VEGFF, por possuírem atividade biológica semelhante a isoforma 165 do VEGFA (KOMORI et al., 1999; YAMAZAKI et al., 2003). A família do VEGF é constituída por moléculas semelhantes (isoformas), codificadas por um único gene, que passa por *splicing* alternativo e as proteínas por modificações pós-traducionais (MULLER et al., 1997; LEE et al., 2005). O gene VEGF em humanos é localizado no braço curto do cromossomo 6, em camundongos no cromossomo 17 e em cães no cromossomo 12. Em humanos o gene VEGF é composto de oito exons, que produzem diferentes isoformas do VEGFA nomeadas de acordo com seu número de aminoácidos como exemplificado na figura 1, sendo as principais: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, e VEGF₂₀₆, diferenciadas pela forma de ligação à heparina e neurofilina (BATES; HARPER, 2002; LANGE et al., 2003).

Figura 1. Esquema de representação das principais diferenças entre as isoformas do VEGFA (adaptado de Grunewald et al., 2010).

Os efeitos biológicos do VEGF resultam da ligação com diferentes receptores tirosina-quinase do tipo V, como o VEGFR1 (FLT1, *Fms-like tyrosine kinase 1*), VEGFR2 (KDR ou Flk1, *Kinase insert domain containing region*), VEGFR3 (Flt4, *Fms-like tyrosine kinase 4*) (SHIBUYA et al., 1990; DE VRIES et al., 1992; TERMAN et al., 1992; KAIPAINEN et al., 1995), neurofilina 1 e 2 (NRP1 e 2) (NEUFELD; KESSLER; HERZOG, 2002) e proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPG) (PARK; KELLER; FERRARA, 1993). O VEGFA, B e PIGF se ligam ao FLT1. O KDR é estimulado pelo VEGFA, C e D, enquanto o Flt4 é específico para o VEGFC e D. A família VEGF também interage com as NRP e HSPG (CÉBE-SUAREZ; ZEHNDER-FJÄLLMAN; BALLMER-HOFER, 2006).

2.5 EFEITOS BIOLÓGICOS DO VEGFA

O VEGFA é o melhor caracterizado e estudado dentre os membros da família VEGF. Após se ligar ao domínio extracelular do receptor, ocorre dimerização e autofosforilação do domínio intracelular, em seguida uma cascata de sinalização é ativada assim como diversas proteínas (CROSS et al., 2003).

O VEGFA é o mais potente mediador da neovascularização. A neovascularização é a formação de novos vasos sanguíneos, este processo é orquestrado por dois diferentes mecanismos denominados vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é o processo de formação dos vasos sanguíneos que ocorre principalmente na fase embrionária, quando há a diferenciação de células progenitoras endoteliais, os angioblastos, a partir de células precursoras, os hemangioblastos. Em contraste, a angiogênese é o desenvolvimento e remodelamento de um novo vaso sanguíneo a partir de um vaso pré-existente (RISAU; FLAMME, 1995). A manutenção da homeostase vascular depende do balanço de fatores pró e anti-angiogênicos fundamentais como mediadores da neovascularização em eventos ligados à saúde e à doença (CARMELIET, 2003; FERRARA, 2004). Dentre as diferentes isoformas do VEGFA, sabe-se que, o VEGF165 tem potente ação pró- angiogênica, enquanto a isoforma VEGF165b tem potente ação anti-angiogênica (KONOPATSKAYA et al., 2006).

O VEGFA modula uma diversidade de processos ligados à angiogênese, como a cicatrização de feridas, ovulação, manutenção da pressão sistêmica, crescimento ósseo, formação de endométrio, corpo lúteo e placenta, e neuroproteção (BROWN et al., 1992; FERRARA et al., 1998; GERBER et al., 1999). Entretanto, sua expressão também participa de processos envolvidos com a patogênese de diversas doenças, incluindo doenças autoimunes, neovascularização ocular, degeneração macular, retinopatias, doenças cardiovasculares, distúrbios de cicatrização e neoplasias (DUH; AIELLO, 1999; SVENSSON et al., 2002; CARMELIET, 2003; CARVALHO; BLANK; SHOENFELD, 2007; KERBEL, 2008).

2.6 VEGF NO PÂNCREAS

O VEGFA participa do desenvolvimento pancreático por atuar diretamente na vasculogênese e angiogênese no período embrionário (LAMMERT; CLEAVER; MELTON, 2001). A deleção deste fator em pâncreas de camundongos evidenciou que há drástica alteração na morfologia das células endoteliais dos capilares, notando-se redução no corpo celular e menor fenestração. Além disso, o VEGFA é importante para a regulação da glicemia, visto que frente ao desafio de glicose intraperitoneal os camundongos com deleção no gene VEGF pancreático apresentaram deficiência na secreção de insulina e regulação da glicemia quando comparados a camundongos selvagens (LAMMERT et al., 2003; WATADA, 2010). Em estudo recente *in vitro*, foi demonstrado que ilhotas pancreáticas submetidas à altas concentrações de glicose sofreram redução de 20% do VEGF quanto ao RNAm e 42% em relação à proteína, enquanto fatores anti-angiogênicos como a trombospondina-1 e endostatina tiveram sua expressão gênica elevada em cerca de 17% e proteica cerca de 60% (DUBOIS et al., 2010). Estes dados sugerem que o desbalanço entre os fatores pró e anti-angiogênicos podem exacerbar a falência de células B pancreáticas.

2.7 TERAPIA GÊNICA NO *DIABETES MELLITUS*

A terapia gênica (TG) teve seu início na década de 70, momento em que os cientistas primeiro a intitularam de “cirurgia gênica” para o tratamento de doenças hereditárias em que houvesse um gene defeituoso. É uma ciência recente que começou a ser aplicada nos finais dos anos 80 associada às técnicas e avanços da medicina e biologia molecular. Em 1990, foi realizado o primeiro estudo clínico em uma criança de quatro anos, Ashanthi DeSilva portadora de uma doença genética rara denominada imunodeficiência severa combinada, causada por defeito no gene adenosina desaminase (ADA). Em 2003, a China lançou o primeiro tratamento com TG, utilizando o adenovírus com p53 contra o câncer, disponível para qualquer parte do mundo (HAN, 2007). Até o momento cerca de 1786 protocolos clínicos foram aprovados, sendo que cerca de 63 já estão em fase final de estudo, o que mostra que a TG tende a crescer, pois evolui rapidamente e o seu futuro é beneficiar diversos pacientes com as mais diversas enfermidades (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2012).

A TG é baseada na transferência do material genético para tecidos ou células-alvo. O objetivo destes genes inseridos é recuperar a função de genes que não se expressam ou deixaram de se expressar, atribuir uma nova atividade gênica ou aumentar a atividade dos genes ativos. Desta forma, a terapia gênica permite tratar a maioria das doenças, sendo elas genéticas ou adquiridas, incluindo as não responsivas a tratamentos convencionais (HAN, 2007).

Diversos estudos recentes utilizam a TG como foco para o tratamento de DM. A transdução por vetores virais ou não virais podem ser técnicas para tratar o DM do tipo 1 de diferentes maneiras, seja com objetivo profilático de suprimir as células T autorreativas, desta forma impedindo a destruição das ilhotas pancreáticas, ou com intuito de tratamento pela substituição do gene da insulina (WONG; HAWTHORNE; MANOLIOS, 2010). Em 1983, as células corticotróficas foram escolhidas para expressão da insulina por expressarem as enzimas necessárias para a conversão de pró-insulina em insulina madura (MOORE et al., 1983). Desde então, questões como desenho do vetor, imunotoxicidade e expressão em células que possuem enzimas conversoras do pró-hormônio em hormônio vem sendo as principais barreiras encontradas para esta terapia (WONG; HAWTHORNE; MANOLIOS, 2010). No desenho de vetores a sequência da pró-insulina vem sendo modificada para permitir a clivagem pela furina, abundante e não específica endoprotease presente no complexo de Golgi (TIAN et al., 2008). Após transpassada a barreira da conversão em hormônio ativo, a busca da célula não endócrina ideal para expressar a insulina é questão atual, sendo as principais células utilizadas, as células epiteliais, hepatócitos, células tronco e células musculares (XU et al., 2007; OLSON et al., 2008; TIAN et al., 2008; NIESSEN et al., 2012). Elsner e colaboradores (2012) recentemente demonstraram que a transdução de células hepáticas com vetor lentiviral contendo a pró-insulina foi eficiente no tratamento de ratos diabéticos ao longo de 1 ano de acompanhamento.

As principais pesquisas de TG voltadas ao tratamento do DM tipo 2 se desenvolvem acerca do uso do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP1), uma incretina produzida pelo intestino, caracterizada pela primeira vez em 1968 (UNGER et al., 1968). O GLP1 é alvo atual de diversas pesquisas por estimular a secreção de insulina, inibir a secreção de glucagon, aumentar proliferação de células B pancreáticas e diminuir sua apoptose, promover a saciedade e diminuir o esvaziamento gástrico (TURTON et al., 1996; IMERYÜZ et al., 1997; SANDHU et al., 1999; CHANG et al., 2003; BREGENHOLT et al., 2005; DOYLE; EGAN, 2007). Estudos recentes demonstraram expressão e secreção de GLP1 com melhora da homeostase glicêmica após a transdução por vetores adenovirais ou plasmídeos por via

intravenosa (CHOI et al., 2005; LIU et al., 2007) ou intraperitoneal (GADDY et al., 2010; RIEDEL et al., 2010).

O estudo da terapia gênica envolvendo o gene VEGF no pâncreas é focado no transplante de ilhotas, principalmente visando o tratamento do DM tipo 1. O transplante de ilhotas pancreáticas é limitado pela possível ocorrência de falência dessas células, devido a pobre revascularização, rejeição imune do enxerto e resposta inflamatória inespecífica (RYAN et al., 2002). A destruição de ilhotas após o transplante pode ser prevenida através de engenharia genética nas células B por promover a revascularização e interceptar as vias apoptóticas e inflamatórias, de forma a expressar proteínas desejadas próximo às ilhotas (GORDEN et al., 1997). Zhang e colaboradores (2004) demonstraram que o transplante de células da ilhota com maior expressão de VEGF, devido à transdução por adenovírus contendo o gene VEGF, foi capaz de restaurar a normoglicemia em ratos diabéticos.

Diversos estudos de terapia gênica focam nas consequências da hiperglicemia crônica, visto que esta pode levar a lesões micro e macrovasculares (ASSOCIATION, 2012). O diabetes tem sido demonstrado como um processo que impede a angiogênese. Ko e colaboradores (2011) demonstraram melhora na cicatrização de feridas utilizando plasmídeos contendo o gene VEGF e o fator de crescimento epidermal. Estudos prévios com uso do gene VEGF, do fator estimulador de colônias de macrófagos e fator de crescimento de hepatócitos demonstraram melhora na regeneração nervosa e vascularização de membros com doença vascular periférica (IEDA et al., 2007; SACRAMENTO et al., 2009; PEREIRA LOPES et al., 2011).

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

O processo de falência das células B em animais diabéticos é bem conhecido. Hipotetizou-se que a expressão gênica e proteica do VEGFA e seus receptores FLT1 e KDR tenham expressões diferentes no pâncreas de camundongos diabéticos e não diabéticos, e que estejam diretamente relacionadas a este processo de falência. Sugere-se que a terapia gênica com VEGF possa auxiliar na preservação das células B pancreáticas remanescentes, bem como melhorar sua função.

Para testar esta hipótese foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Caracterizar as alterações metabólicas relacionadas ao metabolismo da glicose em camundongos diabéticos induzidos por dieta hipercalórica;
- b) Caracterizar a expressão proteica e quantificar a expressão gênica de VEGFA, FLT1 e KDR no pâncreas de camundongos diabéticos e não diabéticos;
- c) Estimar as variáveis estereológicas referentes à vascularização: densidade de volume vascular e densidade de comprimento vascular no pâncreas de camundongos diabéticos e não diabéticos;
- d) Transduzir células pancreáticas *in vivo* com vetor lentiviral contendo o gene VEGF,
- e) Avaliar o efeito do VEGF após a transdução em células pancreáticas na homeostase glicêmica, variáveis estereológicas e na expressão gênica e proteica do VEGF e seus receptores no pâncreas de camundongos diabéticos e não diabéticos.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Para realização deste trabalho foram utilizados 50 camundongos machos de 2 meses de idade, da linhagem C57bl/6, alojados até os 8 meses de idade sob condições de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, ciclo claro:escuro de 12:12 h (luz 7-19h), água e alimentação *ad libitum*. O DM foi induzido com dieta hipercalórica (DH) rica em gordura e sacarose após a maturidade sexual aos 2 meses de idade até a instalação do quadro diabético e a realização dos experimentos. O grupo controle (CT) foi tratado com dieta padrão, ambas de acordo com as normativas para roedores de laboratório publicadas pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN-93, (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993))

Quadro 1. Valores nutricionais e composição das rações da dieta controle (CT) e do grupo com dieta hipercalórica (DH), segundo o padrão AIN-93.

CT		DH	
Kcal/g	3,81	Kcal/g	4,71
Proteína%	14,9	Proteína%	13,7
Lipídio%	9,4	Lipídio%	42,0
Carboidrato%	75,7	Carboidrato%	44,2
(8% de sacarose)		(16% de sacarose)	

4.2 DELINEAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram divididos em duas fases: a primeira fase para caracterização do modelo animal e comprovação da hipótese e a segunda fase para execução da proposta de tratamento com VEGFA. A primeira fase foi constituída de três grupos experimentais:

Grupo 3 meses de dieta (5 meses de idade):

- CT- animais com dieta controle (n=5)
- DH- animais com dieta hipercalórica (n=5)

Grupo 4 meses de dieta (6 meses de idade):

- CT- animais com dieta controle (n=4)
- DH- animais com dieta hipercalórica (n=4)

Grupo 6 meses de dieta (8 meses de idade):

- CT- animais com dieta controle (n=5)
- DH- animais com dieta hipercalórica (n=5)

A segunda fase foi constituída de dois grupos experimentais:

Grupo 4 meses de dieta (6 meses de idade):

- CTPLL- animais com dieta controle e com injeção do vetor lentiviral sem gene terapêutico (n= 4)
- DHPLL- animais com dieta hipercalórica e com injeção do vetor lentiviral sem gene terapêutico (n= 4)

Grupo 4 meses de dieta (6 meses de idade):

- CTVEGF- animais com dieta controle e com injeção do vetor lentiviral com gene terapêutico (n= 4)
- DHVEGF- animais com dieta hipercalórica e com injeção do vetor lentiviral com gene terapêutico (n= 4)

4.3 CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DOS ANIMAIS

Os parâmetros metabólicos foram avaliados mensalmente a partir do início da dieta, para tanto, foram realizadas dosagens de insulina e teste de tolerância à glicose (TTG). Ao longo da primeira fase, para caracterização do modelo experimental, o peso corpóreo dos animais e o consumo de ração foram acompanhados semanalmente e os dados apresentados

mensalmente.

Após jejum alimentar de 6 horas e água *ad libitum*, a coleta de sangue para dosagem de insulina foi realizada por lancetagem da veia superficial temporal (MEDIPOINT, 2012). O tubo heparinizado contendo sangue foi submetido à centrifugação de 3000 rpm durante 10 minutos à 4°C e o plasma separado foi congelado à -20°C.

No TTG, após jejum alimentar de 6 horas foi aplicada glicose na dose de 1 grama por quilograma de peso, por via intraperitoneal e coletada uma gota de sangue na extremidade da cauda nos momentos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, para que fosse determinada a glicemia.

Com o objetivo de não estressar excessivamente os animais e evitar interferências nos testes, os 2 procedimentos foram realizados com intervalo de 4 dias.

4.4 MENSURAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA

O protocolo para realização de ELISA para mensuração plasmática de insulina murina foi realizado conforme descrição do fabricante (Cat.EZRMI-13k, Millipore®, EUA). Para quantificação da insulina total a placa foi lavada com 300 µL do tampão de lavagem (Tris 50mM e tween20) três vezes, seguida do acréscimo de 10 µL do tampão de ensaio (EDTA 0,025M, sal de fosfato 0,05M, ácido de sódio e BSA 1%) nos poços do branco e amostras a serem dosadas, e 10 µL de solução matriz no branco, pontos da curva e nos pontos de controle a fim de deixar os pontos com constituintes semelhantes ao da matriz plasmática. Foram pipetados na placa, nos poços correspondentes à curva, 10 µL em duplicata de cada ponto da curva em ordem crescente 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10 ng/mL, 10 µL dos controles 1 e 2 (controles internos fornecidos pelo fabricante) e 10 µL de cada amostra a ser avaliada. Em seguida, foram acrescentados 80 µL do anticorpo de detecção em todos os poços, vedada a placa e incubada por 2 horas à temperatura ambiente em agitador orbital à 450 rpm.

Após o período de incubação o conteúdo de cada poço da placa foi removido e lavado três vezes com 300 µL de tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL da solução enzimática estreptavidina conjugada com *horseradish* peroxidase e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação orbital de 450rpm. Após a incubação o conteúdo foi removido e a placa lavada 6 vezes com 300 µL do tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL da solução substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e a placa protegida da luz foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente em agitador orbital sob agitação de 450rpm.

Em seguida, foram adicionados 100 μ L de reagente de finalização (HCl 0,3M) e a absorbância determinada utilizando o comprimento de onda de 450 nanômetros. Os resultados foram obtidos na unidade de ng/mL pelo programa SoftMax Pro.

4.5 ESTEREOLOGIA DE VASOS

A avaliação quantitativa da estrutura de um órgão e componentes celulares a partir de secções de tecido por meio de estereologia representa uma ferramenta poderosa na pesquisa. A estereologia é baseada nas considerações geométricas e estatísticas e permite a obtenção de estimativas de volumes, superfícies, comprimentos e o número das estruturas de interesse (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011). O desafio da estereologia é interpretar o arranjo estrutural tridimensional interno com base na análise de cortes da estrutura que mostram apenas uma informação bidimensional (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

4.5.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA ANÁLISE ESTEREOOLÓGICA

Para que fossem realizadas as análises estereológicas, foram retirados íntegros o pâncreas de cada animal e fixados em solução de formol 4% tamponado em PBS por 24 horas. Em seguida iniciou-se a fase de inclusão, onde os tecidos foram mantidos em álcool 70% durante 1 hora, seguidos de fases de desidratação, onde foram utilizados álcool 80%, 90%, 100% (I) e 100% (II), por 1 hora cada. Após desidratação as amostras foram clareadas em Xilol (I e II), por uma hora cada; e embebidos em parafina pura (I e II) *overnight* e parafina de inclusão (III). O bloco obtido continha o pâncreas inteiro em seu interior. Para avaliação esterológica foram realizados cortes seriados (figura 2) de 5 μ m de espessura em micrótomo (Leica Microsystems RM2235), sendo que 1 a cada 20 secções obtidas foi colocada em lâminas silanizadas.

Figura 2. Representação esquemática da obtenção de cortes seriados ao longo de todo o órgão.

As lâminas foram previamente preparadas em banhos sucessivos em 5 meios diferentes: primeiramente mantidas durante 1 minuto em solução contendo 10 mL de 3-aminopropiltietoxi-silano (APES; Fisher Scientific, EUA) e 190 mL de acetona; 20 segundos em 200 mL de acetona (I e II) e mergulhadas em 200 mL de água destilada (I e II).

4.5.2 MARCAÇÃO DE CD31 POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes teciduais foram desparafinizados em xilol (I e II), reidratados em uma série de etanol em concentrações decrescentes (absoluto I e II, 90%, 70%, 50%) e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada após tratamento das lâminas com 20µg/mL de proteinase K em PBS (Life Technologies, EUA), durante 30 minutos sob temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas por 5 minutos com água. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com Dual Block (DAKO, S200389, EUA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas por 5 minutos com água e imersas em PBS tween20 0,1%. Para redução das ligações inespecíficas, as lâminas foram incubadas com solução bloqueadora de proteínas, 10% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS tween20 0,1% por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas por 16 horas à 4°C com anticorpo anti-CD31 na diluição 1:200 (Abcam, ab56299, EUA). Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS tween20 0,1% três vezes por 5 minutos cada. Em seguida, foi aplicado o segundo anticorpo biotilado (DAKO, K0690, EUA) por 30 minutos, lavadas com PBS tween20 0,1% três vezes por 5 minutos, e posteriormente incubadas com complexo estreptavidina conjugada a peroxidase *horseradish* (DAKO, K0690, EUA), por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi evidenciada por

incubação com diaminobenzidina (DAB, DAKO, K3468, EUA) por 1 minuto, aproximadamente. Após lavagem em água destilada 3 vezes de 5 minutos cada, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina durante 10 segundos, lavadas em água corrente durante 10 minutos, novamente desidratadas em ordem crescente de etanol e montadas com solução selante Entellan (Merck, Alemanha) e lamínula.

4.5.3 SISTEMAS TESTE PARA A QUANTIFICAÇÃO VASCULAR

A morfometria mede estruturas seccionadas em imagens que são bidimensionais, têm largura e comprimento, entretanto não possuem espessura. Por outro lado, a estereologia é um método que obtém informações quantitativas em estudo tridimensional, de largura, comprimento e espessura. Os sistemas testes empregados na estereologia são constituídos de linhas teste, pontos teste e áreas teste, de comprimento (L_T), número (P_T) e área (A_T) conhecidos, respectivamente. Estes sistemas são empregados para a obtenção de informações necessárias para a estimativa de variáveis estereológicas como densidade de volume (V_v), densidade de comprimento (L_v) e densidade de superfície (S_v) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Para responder à pergunta de quantas micrografias deveriam ser analisadas (P_p) para termos um resultado significativo, foi utilizada a “equação de Hally” (MANDARIM-DE-LACERDA, 2011):

$$EPR = \frac{\sqrt{1 - V_v \text{ (piloto)}}}{\sqrt{P_p}}$$

Sendo EPR o erro padrão relativo, cujo valor considerado é 0,05. Algumas micrografias foram avaliadas no projeto piloto e consideramos que o V_v do projeto inicial é de 5%. Assim sendo:

$$0,05 = \frac{\sqrt{1 - 0,05}}{\sqrt{Pp}} \quad Pp = \frac{0,97}{0,0025} \quad Pp = 388$$

Mas, se devemos contar 388 pontos sobre uma estrutura que ocupa apenas 5% da fotomicrografia, na verdade devemos contar 7760 pontos teste, visto que desta forma 5% dos pontos cairão sobre a estrutura. Se utilizarmos um sistema teste de 81 pontos, devemos contar aproximadamente 95 fotomicrografias por grupo de estudo.

No presente estudo, 2 campos microscópicos de cada uma das secções do pâncreas foram escolhidas aleatoriamente, perfazendo um total de 15 a 20 campos por animal. Assim em cada grupo foram analisados cerca de 100 campos.

As imagens obtidas foram analisadas após sobreposição da área teste pelo programa Stepanizer (TSCHANZ; BURRI; WEIBEL, 2011). Desta forma, os vasos foram contados dentro de uma área conhecida, chamada área teste (A_T). De forma a evitar a superestimação dos vasos, foram consideradas 2 linhas de proibição (contínuas) para contagem dos vasos que tocam estas linhas, e 2 linhas de permissão (pontilhadas) (figura 3).

Figura 3. Representação de uma área teste (A_T) com as linhas de proibição e permissão e a esquematização de contagem dos vasos marcados com anticorpo anti-CD31 dentro da A_T na interface do programa Stepanizer.

A variável densidade de comprimento vascular do pâncreas (L_v), cujo resultado é expresso em mm/mm^3 , foi estimada utilizando a fórmula:

$$L_v = 2 * Q_A = 2 * (N/A_T)$$

Onde,

Q_A - densidade numérica por área

N - número de vasos dentro da área teste

A_T - área teste ($37.709,60 \mu\text{m}^2$)

A variável densidade de volume vascular do pâncreas (V_v), cujo resultado é expresso em porcentagem (%), foi estimada utilizando a fórmula:

$$V_v = P_p/P_T$$

Onde,

P_p - número de pontos teste que tocam vasos

P_T - número total de pontos teste contidos no sistema teste (81)

Figura 4. Representação de uma área teste (A_T) com 81 pontos teste e a esquematização de contagem dos vasos marcados com anticorpo anti-CD31 que tocam estes pontos.

4.6 IMUNOLocalização Tecidual DO VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR)

As menções contidas em material e métodos, resultados, discussão e conclusão neste projeto referem-se ao VEGFA, sendo em diante chamadas apenas de VEGF.

Os cortes teciduais (5 μ m para VEGF e KDR e 3 μ m para FLT1) foram desparafinizados em xilol (I e II), reidratados em uma série de etanol em concentrações decrescentes (absoluto I e II, 90%, 70%) e água destilada. Em seguida incubadas em tampão citrato à temperatura ambiente e em microondas (3 x 5 minutos) para exposição de epítopos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com Dual Block

(DAKO, S200389, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Para redução das ligações inespecíficas, as lâminas foram lavadas com solução de tampão fosfato com Triton X-100 0,3% e incubadas com solução bloqueadora de proteínas (DAKO, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas por 16 horas à 4°C com anticorpos contra as proteínas em estudo, sendo que a diluição do anticorpo anti-VEGF foi 1:200 (Santa Cruz, SC 152, EUA), anti-FLT1 1:600 (Santa Cruz, sc316, EUA) e anti-KDR 1:500 (Santa Cruz sc315, EUA). Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução de tampão fosfato com Triton X-100 0,3% (3 x 5 minutos), foi aplicado o segundo anticorpo biotilado (DAKO, K0690, EUA) por 15 minutos à temperatura ambiente, novamente as lâminas foram lavadas com solução de tampão fosfato com Triton X-100 0,3% (3 x 5 minutos) e posteriormente incubadas em um complexo estreptavidina conjugada a peroxidase *horseradish* (DAKO, K0690, EUA), por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi evidenciada por incubação com DAB (DAKO, K3468, EUA) por 5 minutos, aproximadamente. Após lavagem em água destilada por 5 minutos, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina durante 10 segundos, lavadas em água corrente durante 10 minutos, novamente desidratadas em ordem crescente de etanol e montadas com solução selante Entellan (Merck, Alemanha) e lamínula.

4.7 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DE RNAm

4.7.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

Fragmentos de aproximadamente 10 mg foram obtidos de pâncreas, que foram imediatamente submersos em nitrogênio líquido e colocados em 1 mL de Trizol[®] (Life Technologies, EUA) em cada tubo de polipropileno de 1,5 mL e homogeneizado vigorosamente com uso do homogeneizador de tecidos (Polytron[®], EUA). As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos, a 11500 rpm e temperatura de 4°C. Foi retirada parte líquida, sendo descartado o pellet formado. As amostras foram mantidas por 5

minutos a temperatura ambiente (15 a 30°C). Após este período, foram acrescentados de 200 µL de clorofórmio e agitadas em vórtex durante 10 segundos. A agitação foi seguida de uma nova incubação à temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugação à 11500 rpm por 15 minutos à temperatura de 4°C. O clorofórmio foi responsável pela separação da amostra em duas fases, sendo uma orgânica ou aquosa e outra inorgânica. O RNA total permaneceu solubilizado exclusivamente na fase aquosa, representada pelo sobrenadante transparente resultante da centrifugação.

Na etapa de precipitação do RNA total, a fase aquosa obtida anteriormente foi transferida para um novo tubo de polipropileno e acrescida de álcool isopropílico na proporção de 0,5 mL de isopropanol para cada 1 mL de Trizol utilizado na homogeneização. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada à 11500 rpm durante 10 minutos à temperatura de 4°C. O álcool isopropílico foi o responsável pela precipitação do RNA total. Desta forma, dependendo da quantidade de RNA total contido na amostra, pôde-se observar um pellet no fundo do tubo após a centrifugação.

Na etapa de lavagem do RNA total, o sobrenadante foi removido e acrescido de 1 mL de etanol a 75% por tubo para cada 1ml de Trizol[®] utilizado na homogeneização. O tubo contendo etanol foi invertido algumas vezes para lavagem da amostra seguida de centrifugação à 9000 rpm durante 5 minutos à temperatura de 4°C.

Na etapa de dissolução do RNA total, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo o pellet foi seco à temperatura ambiente durante 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em 100 µL de água deionizada livre de RNases.

4.7.2 REMOÇÃO DE IMPUREZAS DO RNA

Após extração do RNA pelo método Trizol[®] (Life Technologies, EUA) e ressuspensão do RNA total em 100 µL de água, seguiu-se com o protocolo de remoção de sais e enzimas de degradação denominado RNA *Clean up* (RNeasy Mini kit, Qiagen, EUA).

Foram adicionados a cada tubo 350 μ L de tampão RLT contendo guanidina, em seguida a solução foi homogeneizada e adicionados 250 μ L de etanol 100%. Após homogeneização, os 700 μ L de cada tubo foram transferidos para colunas com membrana de sílica acopladas a tubos coletores e centrifugadas durante 15 segundos à 10000 rpm. O RNA foi ligado à membrana da coluna e o líquido no tubo coletor contendo possíveis proteínas foi dispensado. Em seguida foram adicionados à coluna 500 μ L de tampão RPE (fórmula de propriedade do fabricante) para lavagem do ácido nucleico e novamente ocorreu centrifugação durante 15 segundos à 10000 rpm. O líquido no tubo coletor foi desprezado e adicionados novos 500 μ L de tampão RPE à coluna e submetida à centrifugação durante 2 minutos à 10000 rpm para novamente lavar a membrana na coluna. A coluna foi sobreposta em novo tubo de 1,5 mL, adicionados 30 μ L de água deionizada livre de RNases à coluna e submetida à centrifugação durante 1 minuto à 10000 rpm para dissolução do RNA ligado à membrana.

As concentrações de RNA total foram determinadas em espectrofotômetro (Eppendorf, Alemanha), sendo aceitas relações à densidade óptica de 260/280nm entre 1,8 a 2,0. Antes do início da construção de cDNA as amostras foram incubadas durante 10 minutos à 60°C para linearização das fitas de RNA e facilitação da ligação dos complexos de polimerização.

4.7.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para a construção de cDNA foi utilizado o *kit Sensiscript RT*[®] (Qiagen, cat205213, EUA), cujo protocolo iniciou-se pela adição de 1 μ g de RNA total e água deionizada livre de RNases para um volume final de 7 μ L em microtubo estéril. Em seguida adicionou-se 1 μ L de tampão DNase 10X e 1 μ L de DNase I[®] (Life Technologies, cat18068-015, EUA). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, para a inativação da atividade DNase foi acrescido 1 μ L de EDTA 25mM e a solução foi incubada a 65°C durante 10 minutos.

Após a última incubação adicionou-se à solução 2 µL de Oligo dT¹⁸ 10µM (IDT, EUA), 2 µL de dNTP 5mM, 2 µL de água dionizada livre de RNases, 1 µL de RNase Out[®] 40U/µL (Life Technologies, cat10777-019, EUA), 2 µL de tampão para atividade da sensiscript e 1 µL da enzima sensiscript. As reações foram homogeneizadas e incubadas à 37°C durante 60 minutos. Após este processo as amostras foram armazenadas à -20°C para posterior análise de expressão gênica.

4.7.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO PCR EM TEMPO REAL

As reações de PCR foram realizadas em um fluorometro automatizado (ABI PRISM[™] 7500, Life Technologies, USA), usando placas ópticas de 96 poços. O sistema adotado para a detecção da expressão gênica do VEGF e seus receptores foi o sistema Taqman, que por utilizar uma sonda fluorescente possibilita a detecção de um produto específico da PCR conforme esse se acumula durante os ciclos da reação. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída no sistema Taqman contendo um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após a sequência de um dos *primers* e é clivada através da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal do corante *reporter*. Moléculas adicionais do corante *reporter* são clivadas de suas respectivas sondas em cada ciclo, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de *amplicon* produzido.

4.7.5 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Inicialmente, os cDNAs foram diluídos em água livre de RNases na proporção de 1:2. Em seguida, foi preparado um mix para cada gene estudado, sendo acrescentados 6,25 µL de TaqMan® PCR MasterMix (Life Technologies, EUA), 3,25 µL de água deionizada livre de RNases e 0,5 µL conjunto de primer e sonda. Foram pipetados 10 µL deste mix em cada poço correspondente na placa e acrescentados 2,5 µL da respectiva amostra de cDNA. Após pipetar todas as amostras nos poços, a placa foi coberta por um adesivo óptico específico, submetida à centrifugação rápida (inferior a 10 segundos) e levada ao aparelho de PCR. A reação de amplificação foi iniciada por 2 minutos à 50°C ativando a uracil N- glicosilase que degrada os resíduos de RNA e 10 minutos à 95°C para ativação da polimerase, seguida por 40 ciclos de denaturação das fitas de cDNA à 95°C por 15 segundos e extensão à 60°C por 1 minuto.

4.7.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PRIMERS

Foram adquiridos primers cujas sequências foram construídas e testadas pela empresa Life Technologies, desta forma a sequência da sonda e primer senso não foram fornecidas. Os *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real para VEGF (Mm01281449_m1), FLT1 (Mm01210870_m1), KDR (Mm01222427_m1) e o gene de referência beta actina (Mm00607939_s1) foram comprados e listados no quadro 2.

Quadro 2. Primers para VEGF, FLT1, KDR e beta actina murino para PCR em tempo real.

Gene	Sequência	Genbank	Tamanho Amplicon (pb)
VEGF	Senso não fornecida	AW913188.1	81
	Antisenso TTGCAGATGTGACAAGCCAAGGCGG	BC061468.1	
FLT1	Senso não fornecida	AK004721.2	110
	Antisenso TCCACCTCCATGTTTGAGGACTATC		
KDR	Senso não fornecida	BC020530.1	117
	Antisenso TGAATTTGTTCCCTATAAGAGCAAA		
Beta actina	Senso não fornecida	AK078935.1	115
	Antisenso ACTGAGCTGCGTTTTACACCCTTTC		

A eficiência dos *primers* foi testada para verificar se os pares de primers apresentavam eficiência próxima a 100%. A eficiência de amplificação da PCR é a taxa na qual um *amplicon* de PCR é gerado, se este dobrar em quantidade a cada ciclo durante a fase geométrica da amplificação da PCR, então a PCR apresentou 100% de eficiência. O *slope* de uma curva padrão é comumente usado para estimar a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real. Uma curva padrão de PCR em tempo real é representada como um gráfico de regressão linear semi-log do valor CT em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucléico. Um *slope* da curva padrão de -3,32 indica uma reação de PCR com 100% de eficiência, ou seja, produziu um aumento de 10 vezes no *amplicon* da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_2 10 = 3,3219$).

Uma curva padrão foi construída com pool de cDNA do grupo controle sendo os pontos da curva 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, representando respectivamente as quantidades de cDNA, 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625, 0,03125 µg. As reações foram otimizadas conforme descritas no item 4.7.5.

Após obtido o *slope* da curva, foi calculada a estimativa de eficiência (E) do ensaio:

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

A partir deste cálculo foi possível confirmar eficiências de todos os primers entre 98-100%.

4.7.7 DETERMINAÇÃO DO *THRESHOLD*

O *threshold* é o ponto de sinal *reporter* que é usado para determinação dos ciclos *threshold* nos ensaios de Real Time. O *threshold* deve ser ajustado dentro da região de crescimento exponencial de uma curva de amplificação. O número do ciclo no qual o sinal fluorescente associado a um acúmulo de *amplicon* cruza o *threshold* é referido como ciclo *threshold*.

Para determinação dos *thresholds* que possibilitaram a comparação entre todos os grupos, a primeira reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando os grupos de dieta controle e hipercalórica após 3 meses. A análise do ciclo *threshold* médio de cada amostra foi realizado por meio do programa LingReg PCR (RAMAKERS et al., 2003). Em seguida, foi obtida a média de todos os ciclos *threshold* de um mesmo grupo para cada gene. Após determinado o ciclo *threshold* médio ideal, novamente no programa ABI PRISM™ 7500 (Life Technologies, USA) foram determinados os *thresholds*, de forma que o *threshold* ideal é o ponto que cruza o ciclo *threshold* médio deixando 50% das curvas à sua direita e 50% à sua esquerda.

Os *thresholds* do VEGF, FLT1 e KDR, foram respectivamente, 0,0941945; 0,0459555 e 0,0282682.

4.7.8 EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAm

A quantificação relativa dos genes alvos VEGF, FLT1 e KDR foi realizada normalizando-se os sinais desses genes com o sinal do gene de referência beta actina. O cálculo de quantificação relativa dos genes alvos é feito através da fórmula de Livak e colaboradores (2001), na qual se utiliza os valores de ciclos *thresholds*, que indicam o ciclo de melhor eficiência de amplificação de cada amostra:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-((CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene endógeno}) - \text{calibrador})}$$

Onde,

CT- ciclo *threshold*

Calibrador- amostra controle utilizada como base para resultados de expressão comparativa

4.8 CONSTRUÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL CONTENDO O GENE VEGF

4.8.1 CLONAGENS

Nos ensaios de restrição para que insertos fossem retirados ou inseridos de seus vetores foram utilizadas as enzimas de restrição (New England Biolabs, EUA) listadas no quadro 3. As reações foram realizadas contendo 10 µg de DNA, 10 unidades de cada enzima, tampão de atividade ótima das enzimas, completadas com água para volume final de 30 µL e incubadas por 3 horas à 37°C.

Quadro 3. Vetores e enzimas de restrição utilizadas para construção do lentivírus contendo o gene de interesse.

Vetor	Enzima	Sequência de clivagem
pBluescript SK	EcoRI	5'G/AATTC3' 3'CTTAA/G5'
pBluescript SK	EcoRV	5'GAT/ATC3' 3'CTA/TAG5'
pBluescript SK	XbaI	5'T/CTAGA3' 3'AGATC/T5'
PLL 3.7	NheI	5'G/CTAGC3' 3'CGATC/G5'
PLL 3.7	BamHI	5'G/GATCC3' 3'CCTAG/G5'

4.8.2 PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS EM GEL DE AGAROSE

A banda contendo o fragmento a ser extraído foi cortada do gel de agarose sob luz ultravioleta. O material foi pesado e acrescido com solução QG (fórmula de propriedade do fabricante Qiagen, Qiaquick Gel Extraction kit, EUA) em 3X o seu volume. Em seguida, o material foi incubado durante 10 minutos à 50°C. Após o período de incubação, foi adicionado isopropanol em 1X o volume. Foram adicionados em cada ciclo de purificação, 750 µL da solução a uma coluna de membrana de sílica e centrifugada a 10000 rpm durante 1 minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com 500 µL de QG sob centrifugação a 10000 rpm durante 1 minuto. A esta coluna foram acrescidos 750 µL de solução de lavagem e novamente centrifugada a 10000 rpm durante 1 minuto. A coluna foi centrifugada sem solução a 10000 rpm durante 1 minuto, colocada em novo tubo de polipropileno, adicionado 30 µL de água e centrifugada a 12000 rpm durante 1 minuto.

4.8.3 LIGAÇÃO DE INSERTOS EM VETORES PLASMIDIAIS

Os vetores foram ligados aos seus insertos seguindo a relação molar de 1:3; acrescidos de 2 μL de 10X tampão T4 ligase DNA, completado o volume para 19 μL com água livre de nucleases, em seguida acrescentado 1 μL de T4 DNA ligase (New England Biolabs, EUA). A reação foi homogeneizada gentilmente e incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida a reação foi mantida em gelo até o início do protocolo de transformação bacteriana.

4.8.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E AMPLIFICAÇÃO DO VETOR PLASMIDIAL

Após a ligação do inserto no vetor, em tubo de polipropileno foram pipetados 10 μL da reação de ligação e 70 μL de solução de estabilização *Tuber borchii fruiting body-1* (TBF-1). Em ambiente estéril esta solução foi colocada em contato com bactérias DH5- α quimicamente competentes, o preparado foi mantido durante 30 minutos no gelo, seguido de 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio SOC e incubado sob agitação de 300 rpm, durante 1 hora à 37°C. A solução após o crescimento bacteriano foi centrifugada a 5000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso no meio SOC restante no tubo. Após ressuspenso, o conteúdo foi plaqueado em meio Agar contendo antibiótico e incubado em estufa *overnight* à 37°C. Após este período as colônias de interesse foram selecionadas e realizado pré-inóculo em 5 mL de meio Luria-Bertani broth (LB) e antibiótico. O pré-inóculo foi incubado sob agitação de 200 rpm *overnight* à 37°C para posterior extração do vetor plasmidial.

4.8.5 PEQUENA EXTRAÇÃO DE VETOR PLASMIDIAL (MINIPREP)

Após a transformação das bactérias DH5- α , seleção utilizando antibiótico específico, os vetores potencialmente clonados foram submetidos ao protocolo de miniprep para lise da bactéria e purificação do ácido nucleico

Inicialmente foram transferidos 1,5 mL do cultivo de bactérias para um tubo de polipropileno e centrifugado em 12000 rpm durante 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspense em 100 μ L de solução I (50mM glicose, 25mM tris-HCl, 10mM EDTA) com RNase (10mg/mL), a fim de conferir turgidez à bactéria, homogeneizado e deixado por 10 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 μ L da solução II (0,2N NaOH, 1% (w/v) SDS), os tubos foram invertidos 2 vezes e incubados 5 minutos em temperatura ambiente. Após este procedimento, foram adicionados 200 μ L da solução III de lise (5M acetato de potássio e ácido acético) e homogeneizado por inversão 8 vezes, seguido de incubação em gelo durante 30 minutos. Passado o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi passado para novos tubos contendo 400 μ L de isopropanol gelado, os tubos foram invertidos 4 vezes e centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. . O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 μ L etanol 70% gelado e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a precipitação do vetor plasmidial, o sobrenadante foi descartado e os tubos secados centrífuga à vácuo (Speed vac, Thermo, EUA) durante 10 minutos. O vetor foi ressuspense em 20 μ L de água estéril e determinada sua concentração em aparelho de espectofotometria (Nanodrop ND 1000, Thermo, EUA).

4.8. 6 PREENCHIMENTO DE EXTREMIDADES COESIVAS

Para a conversão de extremidades coesivas em extremidades cegas foi utilizada a T4 DNA polimerase (Quick Blunting kit, E1201L, NEB, EUA) que possui atividade polimerase 5'→3' e exonuclease 3'→5'. Em tubo de polipropileno foram adicionados 10 µL de DNA, 2,5 µL de tampão 10X Blunting, 2,5 µL de dNTP 1mM, 1 µL da enzima e 9 µL de água deionizada autoclavada.

4.8.7 PRODUÇÃO DO LENTIVÍRUS

Em fluxo laminar estéril foram plaqueadas 2×10^6 células da linhagem *Human Embryonic Kidney* (HEK293T) em placas de poliestireno de 10mm de diâmetro e incubadas em estufa úmida à 37°C e 5% CO₂ durante 24 horas. Após 1 dia de cultivo, em tubo de polipropileno foi preparada, para cada placa, solução I contendo 10 µg do plasmídeo pMDLg/pRRE, o qual contém a sequência de proteínas que compõem matriz e capsídeo (GAG) e a de proteínas de atividade enzimática e auxílio na infecção viral-transcriptase, protease e integrase (POL), 5 µg do plasmídeo pRSV Rev contendo o gene para a proteína reguladora da expressão do virion (REV) que interage com a sequência RRE presente no primeiro plasmídeo e atua na interação do vírus com o núcleo da célula, 6 µg do plasmídeo pCI-VSVG contendo a sequência da proteína G, componente do envelope do vírus da estomatite vesicular (VSVG), 20 µg de PLL 3.7 CMV-VEGF-IRES-GFP, 62 µL de cloreto de cálcio 2M e água para um volume final de 500 µL. Em outro tubo foi preparada a solução II contendo 500 µL de HBSS. A solução I foi gotejada sobre a II concomitantemente à homogeneização delicada do tubo para formação de complexos contendo fosfato de cálcio e DNA. Em seguida, para que os complexos fossem agregados a solução foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em cada placa foi retirado o meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* contendo 10% de soro fetal bovino (DMEM- SFB 10%; GIBCO, EUA) e adicionados 9 mL de meio novo, seguido de 1 mL da solução preparada gotejada lentamente em pontos equidistantes. Após 4 horas o meio de cultivo de cada poço foi desprezado e adicionados novos 6 mL de DMEM- SFB 10%. Após 24 horas, em sala de cultivo nível de segurança II, foram coletados os 6 mL de meio de cultivo e filtrados em

filtro de 0,45 μm . Foram adicionados 10 mL de DMEM- SFB 10% por placa, incubados por 24 horas à 37°C. Seguido este último período, o meio foi coletado, filtrado e adicionado ao conteúdo filtrado anteriormente.

4.8.8 CONCENTRAÇÃO DO LENTIVÍRUS

Em tubos foram adicionados 4 mL de sacarose 20% e 26 mL do filtrado contendo partículas virais em meio DMEM- SFB 10%, centrifugados à 14000 rpm durante 2 horas à 4°C (Sorvall, Rotor SLA 600, Thermo Scientific, EUA). O sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo restando cerca de 1 mL de meio. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultivo restante em três sequências de passagem em homogeneizador e centrifugação à 4000 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente. Após termino da concentração do lentivírus, o conteúdo foi armazenado em alíquotas de 20 μL à -80°C.

4.8.9 TITULAÇÃO DO LENTIVÍRUS

Em placas de cultivo de 24 poços foram plaqueadas 3×10^4 células HEK por poço, incubadas durante 24 horas em estufa úmida à 37°C e 5% CO_2 . Após este período foram adicionados por poço em duplicata 0,1 μL , 1 μL , 5 μL , 10 μL e 20 μL de vetor lentiviral, sendo o volume final por poço de 250 μL de DMEM-SFB 10% contendo 8 $\mu\text{g/mL}$ de polibreno. Após 16 horas de cultivo foram adicionados 250 μL de DMEM-SFB 10%. No terceiro dia de cultivo 20 imagens foram capturadas por diluição sob luz fluorescente e sob contraste de fase Hoffman (Olympus IX70, EUA). Para cálculo do título, inicialmente foi calculada a relação entre células GFP positivas e o número total de células, seguido do cálculo da média entre as relações obtidas. Em seguida, para cálculo do título expresso em unidades de transdução por μL (TU/ μL), a média da

relação entre células GFP e células total, foi multiplicada pelo número de células por poço e divididas pelo volume de lentivírus adicionado (0,1; 1; 5; 10 ou 20 μ L).

4.9 INJEÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL CONTENDO O GENE VEGF NO PÂNCREAS DE CAMUNDONGOS

Os camundongos após 2 meses submetidos às dietas CT e DH foram anestesiados com uma mistura de xilazina 5mg/kg (Syntec, Brasil) e quetamina 60 mg/kg (Vetnil, Brasil). Em seguida, os animais foram tricotomizados na região abdominal e realizada assepsia com solução de clorexidine na área da incisão. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, realizada incisão mediana na pele em cerca de 1 cm até atingir a lâmina externa da bainha do músculo reto do abdome. Em seguida, foi realizada incisão na linha alba em cerca de 1 cm e acessada a cavidade abdominal. Com auxílio de microscópio oftálmico, foram injetados 80 μ L do vetor lentiviral acrescidos de polibreno 4 μ g/ml, no tecido pancreático em aproximadamente 20 pontos equidistantes distribuídos ao longo do órgão. Os planos foram fechados, sendo inicialmente a musculatura fechada com fio nylon 6.0 com sutura simples contínua, seguida de sutura simples separada na pele.

4.10 IDENTIFICAÇÃO DE GFP POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para confirmação da correta injeção e expressão do gene de interesse, foi realizado inicialmente um estudo piloto, no qual o animal foi sacrificado após 7 dias da injeção do vetor lentiviral contendo VEGF e GFP; seu pâncreas foi coletado e embocado de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.1. Em seguida, os cortes teciduais de 5 μ m foram desparafinizados em xilol (I e II), reidratados em uma série de etanol em concentrações decrescentes (absoluto I e II, 90%, 70%) e água destilada. Em seguida incubadas em solução de citrato de sódio 10mM e ácido cítrico 0,5mM (pH 6,0)

durante 30 minutos para exposição de epítomos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com Dual Block (DAKO, S200389, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Para redução das ligações inespecíficas, as lâminas foram lavadas com solução de tampão fosfato com Triton X-100 0,3% e incubadas com solução bloqueadora de proteínas (DAKO, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas por 16 horas à 4°C com o anticorpo anti-GFP (A6455, Life Technologies, EUA). Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução de tampão fosfato com Triton X-100 0,3% (3 x 5 minutos), foi aplicado o segundo anticorpo ligado a peroxidase *horseradish* (DAKO, K4011, EUA), por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi evidenciada por incubação com DAB (DAKO, K3468, EUA) por 5 minutos, aproximadamente. Após lavagem em água destilada por 5 minutos, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina durante 10 segundos, lavadas em água corrente durante 10 minutos, novamente desidratadas em ordem crescente de etanol e montadas com solução selante Entellan (Merck, Alemanha) e lamínula.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente os dados foram analisados quanto às suas normalidades pelo teste de normalidade Anderson-Darling (Minitab 13, Pensilvânia, EUA). Os dados foram de distribuição paramétrica, portanto, foi aplicado o teste One Way ANOVA seguido do pós teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls (GraphPad Prism 5 Software Inc., San Diego, EUA) para comparações entre mais de 3 grupos. Para a comparação entre 2 médias fez-se uso do teste t de Student (Minitab 13, Pensilvânia, EUA). Os resultados foram apresentados por média $\pm$ erro padrão, sendo considerados resultados significativos quando $p < 0.05$. Os resultados obtidos pela aplicação do teste de tolerância à glicose gerou uma curva de resposta, cuja área sob esta curva foi calculada pelo programa estatístico GraphPad Prism 5 (EUA).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 PRIMEIRA FASE: PADRONIZAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL E CONFIRMAÇÃO DA HIPÓTESE INICIAL

5.1.1 CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DOS ANIMAIS

O consumo médio diário de ração por animal não variou significativamente ($p>0,05$) entre o grupo CT e DH ao longo dos 6 meses de acompanhamento (gráfico 1).

Gráfico 1. No eixo Y consumo médio de ração diária por animal por dia do grupo controle (CT) e grupo com dieta hipercalórica (DH), sendo no eixo X a representação dos 6 meses do estudo.

Foi observado que houve variação significativa ($p < 0,05$) quanto ao peso dos animais nos 3 primeiros meses submetidos a dieta CT, sendo que o peso permaneceu constante nas observações aos 4, 5 e 6 meses neste grupo. A comparação entre o grupo DH ao longo de 6 meses, evidenciou que houve significativo ($p < 0,05$) ganho de peso no primeiro mês em relação aos demais (gráfico 2). A comparação entre o grupo CT e DH evidenciou que ambos diferem significativamente ($p < 0,05$) quanto ao peso apresentado aos 2, 3, 4 e 6 meses do estudo (gráfico 2).

Gráfico 2. Peso médio dos animais do grupo controle (CT) e grupo com dieta hipercalórica (DH) ao longo de 6 meses. # representa os meses em que houve diferença significativa entre os grupos CT e DH ($p < 0,05$).

A avaliação dos dados obtidos após mensuração da insulina plasmática permite observar que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos CT e DH aos 2, 3, 4 e 5 meses. A análise estatística entre o grupo DH ao longo de 6 meses, evidenciou que há importante queda da insulinemia após 4 meses, sendo significativa ($p < 0,05$) a diferença dos resultados obtidos aos 2 e 3 meses, quando comparados aos 4, 5 e 6 meses. Já a avaliação entre o grupo CT ao longo dos 6 meses não foi constatada diferença significativa ($p > 0,05$) (gráfico 3).

Gráfico 3. Concentração média de insulina plasmática (ng/mL) e erro padrão dos animais controles (CT) e com dieta hipercalórica (DH) ao longo de 6 meses. Representação por asteriscos comparam o grupo DH e # as diferenças significativas entre o grupo CT e DH ao longo de 6 meses ($p < 0,05$).

O TTG foi realizado mensalmente, após a injeção intraperitoneal de glicose no grupo CT, a maior glicemia foi encontrada após 15 minutos, seguida de queda gradativa até os 120 minutos da análise (gráfico 4).

Gráfico 4. Curva da média das glicemias (mg/dL) dos animais submetidos à dieta CT frente ao desafio de glicose intraperitoneal nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Após a injeção intraperitoneal de glicose no grupo DH, as maiores glicemias foram encontrada após 15 e 30 minutos, seguida de queda gradativa até os 120 minutos da análise (gráfico 5).

Gráfico 5. Curva da média das glicemias (mg/dL) dos animais submetidos à dieta DH frente ao desafio de glicose intraperitoneal no tempo 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

A partir dos dados obtidos após o TTG, a área sob a curva foi calculada para a melhor interpretação da resposta frente ao desafio da glicose. O grupo CT difere significativamente ($p<0,05$) do grupo DH em relação à área sob a curva obtida após o teste de tolerância à glicose aos 4, 5 e 6 meses (gráfico 6).

Gráfico 6. Área sob a curva (cm^2) e erro padrão dos gráficos de teste de tolerância à glicose dos grupos CT e DH. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p<0,05$) entre o grupo CT e DH ao longo dos 6 meses de avaliação.

5.1.2 ESTEREOLOGIA VASCULAR PANCREÁTICA

As variáveis estereológicas Vv e Lv foram estimadas no pâncreas dos animais de todos os grupos experimentais. A figura 5 (A e B) demonstram fotomicrografias da marcação de vasos sanguíneos com o anticorpo monoclonal anti-CD31.

Figura 5. Fotomicrografias do pâncreas de camundongos, imuno marcação anti-CD31 em área de ilhota pancreática (A) e região acinar (B). Barras de 50µm.

Quando comparados os grupos CT com os DH quanto à variável Vv, foram observados que os dados de CT (5,3%) diferiram significativamente ($p < 0,05$) do grupo DH (3,9%) aos 3 meses, assim como, CT (4,4%) em relação ao DH (3,3%) aos 4 meses, e CT (4,4%) e DH (3,1%) aos 6 meses. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos CT aos 3, 4 e 6 meses e entre os grupos DH aos 3, 4 e 6 meses (gráfico 7).

Gráfico 7. Densidade de volume vascular do pâncreas (Vv) de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) ao longo de 3, 4 e 6 meses. As barras representam a média $\pm$ erro padrão, # representa diferenças significativas entre os grupos CT e DH ($p < 0,05$).

Após a comparação entre os grupos quanto a variável Lv do pâncreas, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre os grupos CT e DH aos 3 meses (gráfico 8).

Gráfico 8. Densidade de comprimento vascular do pâncreas (Lv) de camundongos submetidos à dieta CT e DH durante 3, 4 e 6 meses (n=4). As barras representam a média $\pm$ erro padrão, # representa diferença significativa entre os grupos CT e DH.

5.1.3 IMUNO-LOCALIZAÇÃO TECIDUAL DO VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR)

Os sinais do VEGF, FLT1 e KDR foram detectados no pâncreas de camundongos submetidos à dieta CT e/ou DH, por meio da imuno-histoquímica, ao longo de 3, 4 e 6 meses do estudo. A avaliação de expressão da proteína VEGF, por meio desta técnica, permite a observação de que esta molécula é menos expressa no citoplasma no grupo submetido à DH, quando comparado à dieta CT, nos 3 períodos de avaliação. Já aos 3 meses nota-se uma queda importante na expressão de VEGF na região acinar no grupo DH, sendo o sinal mais forte no grupo CT. Porém, neste período ainda não é evidente a diferença entre o sinal de VEGF nas ilhotas (figura 6-A e B). Aos 4 meses foi observada uma significativa redução na expressão de VEGF nas ilhotas pancreáticas do grupo DH em relação ao CT (figura 6- C e D). Quando avaliada a

expressão de VEGF no grupo DH aos 6 meses, não foram observadas quedas significativas de expressão em relação aos 4 meses (Figura 6- D e F).

O sinal do receptor FLT1 mostra-se constante entre os grupos CT e DH aos 3, 4 e 6 meses. Entretanto, observa-se uma discreta redução de expressão no grupo DH aos 6 meses em relação aos demais períodos (figura 7- F). O estudo de imuno-localização do receptor FLT1 evidencia que este se encontra fora e dentro do compartimento nuclear em todos os períodos de estudo ou ao redor da carioteca, fato que justifica a confirmação deste dado em cortes de 3µm ao invés de 5 µm, exclusivamente para este anticorpo.

A expressão do receptor KDR na região acinar aos 3 meses segue o padrão observado no estudo com VEGF, sendo que nesta região o sinal do receptor é mais fraco no grupo DH em relação ao CT. Entretanto, a avaliação das ilhotas pancreáticas evidencia que a exposição à DH levou a um aumento de expressão de KDR nesta porção do pâncreas, quando comparado com o grupo CT (figura 8- A e B). Entretanto, aos 4 meses foi observada queda de expressão de KDR na região acinar e ilhota pancreática no grupo CT e DH (figura 8- C e D). Nota-se aos 6 meses, semelhante expressão do receptor na ilhota pancreática e redução de expressão na região acinar do grupo DH em relação ao CT (figura 8- E e F).

Figura 6. Fotomicrografias da expressão da proteína VEGF no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) ao longo de 3 (A), 4 (C) e 6 meses (E), e dieta hipercalórica (DH) ao longo de 3 (B), 4 (D) e 6 meses (F). Legenda: **ip**, ilhota pancreática; **ra**, região acinar; **CN**, controle negativo. Barras: 50µm.

Figura 7. Fotomicrografias da expressão da proteína FLT1 no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) ao longo de 3 (A), 4 (C) e 6 meses (E), e dieta hipercalórica (DH) ao longo de 3 (B), 4 (D) e 6 meses (F). Legenda: **ip**, ilhota pancreática; **ra**, região acinar; **CN**, controle negativo. Barras: 50µm.

Figura 8. Fotomicrografias da expressão da proteína KDR no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) ao longo de 3 (A), 4 (C) e 6 meses (E), e dieta hipercalórica (DH) ao longo de 3 (B), 4 (D) e 6 meses (F). Legenda: **ip**, ilhota pancreática; **ra**, região acinar; **CN**, controle negativo. Barras: 50µm.

5.1.4 EXPRESSÃO RELATIVA DO GENES VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR)

A análise de expressão gênica só foi possível aos 3 e 4 meses, devido a má qualidade do RNA obtido na extração aos 6 meses os dados não foram incluídos no estudo.

A observação do gráfico sugere que o grupo CT possua maior expressão de VEGF em relação ao grupo DH aos 3 e 4 meses, e FLT1 aos 4 meses. Entretanto, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos CT e DH quanto a análise da expressão de RNAm de VEGF e FLT1 aos 3 e 4 meses de dieta (gráfico 9-A e B).

Na análise de expressão do RNAm de KDR foi observada queda significativa entre os grupos DH, sendo notada maior expressão no grupo DH aos 3 meses em relação aos 4 meses (gráfico 9-C). Já a comparação entre os grupos CT e DH evidenciou que o grupo CT aos 4 meses possui maior expressão deste receptor em relação ao DH no mesmo período.

Gráfico 9. Expressão relativa de RNAm de VEGF (A), FLT1 (B) e KDR (C) no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH). As barras representam a média $\pm$ erro padrão, asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos DH e # entre CT e DH, $p < 0,05$.

5.2 SEGUNDA FASE: TERAPIA GÊNICA NO PÂNCREAS

5.2.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL CONTENDO O GENE VEGF

5.2.1.1 ISOLAMENTO DO GENE VEGFA

O alinhamento das sequências de VEGFA humano (GenBank AF486837.1) e murino (GenBank M95200.1) mostrou 90% de homologia (figura 9). Desta forma, devido a alta conservação de bases nitrogenadas entre as duas espécies foi possível utilizar o vetor plasmidial contendo a sequência de VEGFA humano, que foi gentilmente cedido pelo professor Dr Sang Won Han do Centro de Investigação em Terapia Gênica (CINTERGEN-UNIFESP, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil).

Figura 9. Alinhamento das sequências de RNAm de VEGFA das espécies humana e murina.

A partir da clivagem com as enzimas Eco RI e Eco RV, como indicado no mapa do vetor cedido, o gene VEGFA foi isolado, contendo 576 pares de bases (pb).

Figura 10. Mapa do vetor plasmidial gT-VEGF indicando o sítio de restrição enzimática para isolamento da sequência VEGFA.

5.2.1.2 SUBCLONAGEM DO GENE VEGF EM VETOR PLASMIDIAL pBLUESCRIPT

Para que o gene VEGF isolado apresentasse extremidades compatíveis com o vetor lentiviral utilizado, foi necessária sua subclonagem no vetor plasmidial pBluescriptSK (pBSK), o qual foi clivado com as mesmas enzimas de restrição, EcoRI e EcoRV. Desta forma, a figura 11 mostra a região de restrição no vetor e a figura 12 evidencia o gel de agarose 1% com marcador molecular HindIII e o vetor linearizado após digestão.

Figura 11. Sítios de restrição de EcoRI e EcoRV no sítio de múltipla clonagem (SMC) do vetor plasmidial pBluescriptSK.

Figura 12. Gel de agarose 1% com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII evidenciando o vetor pBluescript (pBSK) linearizado (aproximadamente 2961pb).

O protocolo seguiu-se com a ligação do inserto VEGF no vetor pBSK na proporção molar de 1 vetor: 3 inserto, ou seja, de 50ng do vetor para cada 30ng do inserto. As bactérias DH5- α quimicamente competentes foram transformadas e plaqueadas com IPTG e Xgal, em seguida as colônias brancas foram selecionadas, realizado pré-inóculo e miniprep. A figura 13 mostra o primeiro poço com o vetor

pBSK como controle e que todas as colônias selecionadas tiveram a inserção de VEGF, visto que o vetor possui 2961pb e o vetor com inserto possui 3537pb.

Figura 13. Gel de agarose 1% evidenciando o vetor pBSK (2961pb) e o gene VEGF inserido no pBSK (3537pb).

5.2.1.3 PREPARO DO VETOR PLL 3.7 PARA INSERÇÃO DO INSERTO VEGF

O vetor PLL 3.7 para construção do vetor lentiviral contendo VEGF foi gentilmente cedido por Zanetti & Han (2012, dados ainda não publicados, CINTERGEN-UNIFESP, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil), o vetor continha as sequências de CMV-Neo-IRES2-EGFP. Inicialmente, este vetor foi digerido com a enzima de restrição BamHI, e após linearização e verificação em gel de agarose 1% (figura 14-A) realizado ensaio para que as bases coesivas fossem completadas e as extremidades ficassem simétricas. Após este procedimento foi realizado ensaio de restrição com a enzima NheI, desta forma, foi possível retirar o inserto neo, para que fosse substituído pelo VEGF. Assim foi mantida a sequência do PLL 3.7 contendo

CMV, IRES2 e GFP (figura 14-B). Como o promotor CMV é do tipo constitutivo, ele deve ser expresso em todos os tipos celulares, inclusive nas células do pâncreas, e o uso bicistrônico do GFP através da sequência IRES2 permite sua expressão concomitante a expressão do VEGF, e portanto, permite a marcação fluorescente das células transduzidas.

Figura 14. Gel de agarose 1% A) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII evidenciando o vetor PLL 3.7 CMV-Neo-IRES2-EGFP (1) e o mesmo vetor após digestão com BamHI (2) e B) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII evidenciando o vetor PLL 3.7 CMV-IRES2-EGFP (8295pb) e o inserto Neo (1015pb) retirado após digestão com NheI (1).

5.2.1.4 CLONAGEM DO VETOR PLL 3.7 CMV-VEGF-IRES2-EGFP

O vetor pBSK que continha o inserto VEGF foi clivado com XbaI, enzima compatível com a extremidade coesiva criada após a digestão do vetor PLL 3.7 CMV-Neo-IRES2-EGFP com NheI para retirada do inserto Neo. Em seguida, o vetor pBSK foi digerido com EcoRV para retirada do inserto VEGF (figura 15-A), assim a

extremidade simétrica criada pela digestão com EcoRV foi compatível com a extremidade criada após completar as bases da digestão com BamHI no PLL 3.7. As bandas de VEGF foram purificadas do gel e foi confeccionado um gel de agarose para verificar o produto da digestão do PLL3.7 CMV-IRES2-EGFP com BamHI e NheI, e o resultado da purificação do inserto VEGF com EcoRV e XbaI (figura 15-B).

Figura 15. Gel de agarose 1% A) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII evidenciando o vetor pBSK (2961pb) digerido com XbaI e EcoRV para retirada do inserto VEGF (1) e B) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII evidenciando a purificação do vetor PLL3.7 CMV-IRES2-EGFP (1; 8295pb) e do inserto VEGF (2; 576pb).

O inserto VEGF foi inserido no vetor PLL 3.7 entre os insertos CMV e IRES2-EGFP, seguindo a proporção molar de 1 vetor: 5 inserto, representando 50ng do vetor para cada 18,79ng do inserto. As bactérias DH5- α quimicamente competentes foram transformadas e plaqueadas. Em seguida as colônias foram selecionadas, realizado pré-inóculo e miniprep. Foi realizado ensaio de restrição com a enzima NcoI para confirmação da clonagem, desta forma, a correta inserção do inserto VEGF e posterior restrição, produziu fragmentos de 4554, 2845, 1088, 323 pb (figura). Após a confirmação da clonagem de algumas colônias através de ensaio de restrição, uma colônia foi utilizada como plasmídeo de transferência para a transfecção nas células

HEK293T para a produção da partícula lentiviral. O vetor clonado foi então denominado PLL-CMV-VEGF-IRES2-EGFP.

Figura 16. Gel de agarose 1% 1) com marcador de peso molecular λ DNA/HindIII e 3) marcador molecular de 100 pb evidenciando 2) o vetor PLL-CMV-VEGF-IRES2-EGFP com a correta inserção de VEGF após a digestão com a enzima NcoI e correspondentes fragmentos 4554, 2845, 1088, 323 pb.

Foram utilizadas alíquotas do lentivírus concentrado para transdução de células HEK293T (figura 17) e determinação do título expresso em unidades de transfecção por μ L (TU/ μ L). Foi encontrada boa capacidade de transdução entre 5 e 10 μ L de lentivírus utilizado, e a partir da contagem de células nestes poços, foi determinado o título de lentivírus contendo o gene VEGF, que foi de $1,6 \times 10^3$ TU/ μ L.

Figura 17. Titulação lentiviral em células HEK utilizando 0,1; 1, 5 10, 15 e 20 μ L de lentivírus, correspondendo à A, B, C, D, E e F, respectivamente. A letra seguida do número 1 indica a fotomicrografia sob contraste de fase e 2 sob luz fluorescente.

5.2.2 INJEÇÃO DO VETOR LENTIVIRAL NO PÂNCREAS

Embora as injeções tenham sido feitas em pontos equidistantes ao longo de todo o pâncreas, a análise de diferentes fotomicrografias demonstraram maior captação e expressão do vetor em ilhotas pancreáticas, sendo o sinal mais forte na área periférica

da ilhota (figura 18-A). A figura 18-B demonstra a marcação em região acinar, entretanto, fotomicrografias como esta são raras, sendo predominante a marcação em ilhotas pancreáticas.

Figura 18. Fotomicrografias do pâncreas de camundongos, imuno marcação anti-GFP em ilhota pancreática (A) e região acinar (B). Barras de 50 μ m.

5.2.3 PARÂMETROS METABÓLICOS

Os dados obtidos no acompanhamento metabólico dos grupos CT e DH aos 3 e 4 meses já apresentados na primeira fase do estudo (item 5.1.1) foram reapresentados neste item para que fosse possível comparar os grupos pré tratamento e pós tratamento dentro do mesmo período de avaliação.

A avaliação dos dados obtidos após mensuração da insulina plasmática permite observar que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos CT e DH aos 3 e 4 meses. Houve redução significativa ($p < 0,05$) da insulinemia após 1 mês de terapia gênica nos grupos DHPLL e DHVEGF em relação ao DH. Embora, graficamente a insulinemia no grupo DHVEGF aos 4 meses tenha sido superior aos demais grupos, a comparação entre os grupos DH, DHPLL e DHVEGF não evidenciou diferença significativa ($p > 0,05$) após 2 meses da terapia gênica (gráfico 10).

Gráfico 10. Concentração de insulina plasmática (ng/mL) e erro padrão dos animais submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF). A representação por asteriscos evidencia diferenças significativas entre os grupos DH aos 3 meses e # diferenças entre grupos CT e DH aos 3 e 4 meses ($p < 0,05$). A letra a evidencia que não houve diferença na comparação entre grupos DH aos 4 meses ($p > 0,05$).

O TTG foi realizado aos 3 e 4 meses, após a injeção intraperitoneal de glicose nos grupos que compuseram a segunda fase do estudo, as maiores glicemias foram encontrada após 15 minutos, seguida de queda gradativa até os 120 minutos da análise (gráfico 11).

Gráfico 11. Curva da média das glicemias (mg/dL) dos animais submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) frente ao desafio de glicose intraperitoneal no tempo 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Aos 4 meses foi observado que os grupos CT e CTVEGF tiveram seus valores de área sob a curva significativamente ($p < 0,05$) menor quando comparado ao grupo DH e DHVEGF (gráfico 12).

Gráfico 12. Área sob a curva (cm^2) e erro padrão dos gráficos de teste de tolerância à glicose dos grupos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) ao longo de 4 meses. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos CT e DH ($p < 0,05$).

5.2.4 ESTEREOLOGIA VASCULAR PANCREÁTICA

Os dados de análise estereológica vascular dos grupos CT e DH aos 4 meses (gráficos 7 e 8) foram reapresentados nos gráficos 13 e 14 para que fosse possível comparar os grupos pré tratamento e pós tratamento dentro do mesmo período de avaliação.

Quanto à variável V_v , foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos CT (4,4%) e DH (3,3%) aos 4 meses. Entretanto não foram observadas diferenças nas comparações entre CT, CTPLL (4,0%) e CTVEGF (4,6%), e entre DH (3,3%), DHPLL (3,3%) e DHVEGF (4,2%), como demonstrado no gráfico 13.

Gráfico 13. Densidade de volume vascular do pâncreas (Vv) de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) ao longo de 4 meses (n=4). As barras representam a média $\pm$ erro padrão e # indica diferença significativa entre CT e DH ($p<0,05$).

A variável Lv do pâncreas no grupo DHPLL é significativamente ($p<0,05$) inferior ao grupo CTPLL (gráfico 14).

Gráfico 14. Densidade de comprimento vascular do pâncreas (Lv) de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) ao longo de 4 meses (n=4). As barras representam a média $\pm$ erro padrão e # indica diferença significativa entre CT e DH ($p < 0,05$).

5.2.5 IMUNO-LOCALIZAÇÃO TECIDUAL DO VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR)

A avaliação de expressão da proteína VEGF permite a observação de que esta molécula aos 4 meses é menos expressa no citoplasma do grupo submetido à DH, DHPLL e DHVEGF quando comparado à dieta CT, CTPLL e CTVEGF. Neste estudo, a expressão de VEGF se manteve inalterada e constante nas ilhotas pancreáticas dos grupos DH, DHPLL e DHVEGF. Sugere-se que em algumas regiões acinares há discreto aumento de sinal da molécula no grupo DHVEGF em relação ao grupo DH e DHPLL (figura 19).

O sinal do receptor FLT1 aos 4 meses mostra-se constante entre os grupos CT, CTPLL e DH, DHPLL e DHVEGF (figura 20- C, D, G, H e I). Entretanto, sugere-se um

aumento na expressão do receptor FLT1 na ilhota pancreática do grupo CTVEGF em relação aos demais grupos (figura 20- J).

Neste estudo, foi observada discreta redução de expressão do receptor KDR na ilhota pancreática do grupo CTPLL e DHVEGF em relação aos grupos, CT, DH, DHPLL e CTVEGF (figura 21).

As fotomicrografias da expressão proteica de VEGF, FLT1 e KDR dos grupos CT e DH aos 4 meses (figura 6-C e D, 7-C e D, e 8-C e D) foram reapresentados nas figuras 19, 20 e 21 para comparação com os grupos tratados CTPLL, DHPLL, CTVEGF e DHVEGF aos 4 meses.

Figura 19. Fotomicrografias da expressão da proteína VEGF no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT, **C**) e hipercalórica (DH, **D**) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL, **G**, e DHPLL, **H**), com vetor com gene VEGF (CTVEGF, **I** e DHVEGF, **J**) ao longo de 4 meses. Legenda: **ip**, ilhota pancreática; **ra**, região acinar; **CN**, controle negativo. Barras: 50 μ m.

Figura 20. Fotomicrografias da expressão da proteína FLT1 no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT, **C**) e hipercalórica (DH, **D**) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL, **G**, e DHPLL, **H**), com vetor com gene VEGF (CTVEGF, **I** e DHVEGF, **J**) ao longo de 4 meses. Legenda: **ip**, ilhota pancreática; **ra**, região acinar; **CN**, controle negativo. Barras: 50 μ m.

Figura 21. Fotomicrografias da expressão da proteína KDR no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT, **C**) e hipercalórica (DH, **D**) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL, **G**, e DHPLL, **H**), com vetor com gene VEGF (CTVEGF, **I** e DHVEGF, **J**) ao longo de 4 meses. Legenda: **ip**, ilhota pancreática; **ra**, região acinar; **CN**, controle negativo. Barras: 50 μ m.

5.2.6 EXPRESSÃO RELATIVA DO RNAm de VEGF E SEUS RECEPTORES (FLT1 E KDR)

Os dados da expressão do RNAm de VEGF, FLT1 e KDR dos grupos CT e DH aos 4 meses (gráfico 9) foram reapresentados no gráfico 15 para comparação com os grupos tratados CTPLL, DHPLL, CTVEGF e DHVEGF aos 4 meses.

Após a injeção do vetor lentiviral contendo o gene de interesse VEGF observou-se que a expressão RNAm de VEGF aumentou (gráfico 15-A) significativamente ($p<0,05$), quando comparado com os grupos DH e DHPLL aos 4 meses. A comparação entre os grupos com dieta controle e dieta hipercalórica mostrou diferença significativa ($p<0,05$) entre a expressão de RNAm de VEGF entre os grupos CTPLL e DHPLL.

Neste estudo, foi observada queda significativa ($p<0,05$) na expressão de RNAm de FLT1 após a injeção do vetor lentiviral na presença ou ausência de VEGF nos grupos com dieta controle quando comparados ao grupo em que não houve injeção do vetor (gráfico 15-B). Entretanto, a comparação entre os grupos com dieta hipercalórica a expressão deste receptor elevou-se significativamente ($p<0,05$) após a injeção do vetor contendo VEGF. A expressão de RNAm de FLT1 foi superior nos grupos CT e CTPLL quando comparados com os grupos DH e DHPLL ($p<0,05$), já nos grupos CTVEGF e DHVEGF os valores foram próximos, não sendo observada diferença significativa ($p>0,05$).

A análise de expressão de RNAm de KDR entre os grupos com dieta hipercalórica evidenciou aumento significativo ($p<0,05$) após a injeção do vetor contendo VEGF (gráfico 15-C). Foi observado que o grupo CT possui expressão significativamente superior ($p<0,05$) ao grupo DH aos 4 meses, não sendo evidenciada diferenças entre os grupos CTPLL e DHLL, e entre CTVEGF e DHVEGF ($p>0,05$).

Gráfico 15. Expressão relativa de RNAm de VEGF (A), FLT1 (B) e KDR (C) no pâncreas de camundongos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) ao longo de 4 meses (n=4). As barras representam a média $\pm$ erro padrão, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos CT, asteriscos entre os grupos DH e # entre CT e DH ($p < 0,05$).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O DM tipo 2 é caracterizado pela intolerância à glicose, o que contribui para a resistência insulínica periférica (tecido muscular esquelético, adiposo e hepático), bem como para disfunção da célula B (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). A SM foi apontada como fator preditor de DM tipo 2 (LAAKSONEN et al., 2002; LORENZO et al., 2003). De acordo com a IDF a definição de SM é a condição em que o indivíduo apresenta obrigatoriamente obesidade central associada a dois ou mais critérios, que podem ser hipertensão, dislipidemia e hiperglicemia (ALBERTI et al., 2005). A obesidade é um importante fator de impacto para a alta prevalência de DM tipo 2, por reduzir a sensibilidade insulínica em tecidos periféricos com consequente aumento de secreção de insulina pelas células B (BERGMAN, 2005). Neste contexto, buscamos um modelo animal que representasse a realidade da sociedade moderna e as consequências de seus hábitos alimentares.

A sacarose é um dissacarídeo, quando digerido no intestino é quebrado em glicose e frutose, que é prontamente absorvida e provoca rápido aumento na glicemia. O consumo excessivo de sacarose é relacionado à diversas afecções, tais como, obesidade e resistência insulínica (TEN; MACLAREN, 2004). Diversos estudos tem comprovado que o alto teor de sacarose na dieta leva à dislipidemia e resistência insulínica (LOMBARDO et al., 1996; CHICCO et al., 2003). Em estudo recente foi demonstrado em ratos que o consumo prolongado de dieta rica em sacarose pode levar à hiperglicemia (LIU; HE; CHIANG, 2012). Além disso, há evidências de que o aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres no músculo e no fígado esteja associado à resistência insulínica e piora no estímulo da glicose em secretar a insulina, mecanismo denominado lipotoxicidade, o que leva à célula B à disfunção (MCGARRY; DOBBINS, 1999).

No presente estudo, os efeitos de glicotoxicidade, dado pelo consumo excessivo e prolongado da sacarose, aliado aos efeitos de lipotoxicidade pelo consumo de alimento com alto teor de gordura, foram reunidos em uma dieta rica em sacarose e rica em gordura para que fosse desenvolvido um modelo que desenvolvesse dislipidemia, obesidade, resistência insulínica e consequentemente, falência das células B

pancreáticas. As composições de minerais e vitaminas na dieta controle e na dieta rica em sacarose e gorduras (denominada hipercalórica) foram idênticas e respeitaram as diretrizes recomendadas pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN 93) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A dieta rica em sacarose e gordura continha 16% de sacarose e 42% de gordura, enquanto a dieta controle continha 8% de sacarose e 10% de gordura. Provavelmente no primeiro mês de consumo de ração, a alta palatabilidade da dieta hipercalórica fez com que os animais consumissem excessivamente o alimento, entretanto os valores energéticos de ambas explica a queda no consumo de ração pelo grupo DH nos meses seguintes, embora não fosse encontrada diferença significativa entre os grupos.

Há um número crescente de pessoas e animais com obesidade e sobrepeso, portanto um aumento no número de pacientes resistentes à insulina e portadores de DM (BERGMAN, 2005). A obesidade é um importante fator preditor de DM e neste estudo foi obtido sucesso em reproduzir este panorama, de forma que, o grupo DH diferiu significativamente do grupo CT quanto ao peso. Dentre o grupo DH o ganho de peso foi significativo no primeiro mês de consumo da dieta, mantendo-se estável o peso nos meses seguintes, enquanto o ganho de peso do grupo CT foi gradativo até o terceiro mês da dieta, mantendo-se estável nos três meses finais. Em estudo prévio foi demonstrado aumento significativo da adiposidade visceral no grupo DH em relação ao CT (NASCIMENTO et al., 2010).

Em 2010, houve a comparação entre um grupo que foi alimentado com dieta apenas rica em gordura e o grupo alimentado com dieta rica em gordura e sacarose, que evidenciou esteatose hepática no grupo DH mais grave do que a observada em animais alimentados apenas com dieta rica em gordura (SATO et al., 2010). Além disso, este mesmo grupo demonstrou que o quadro de hiperinsulinemia é desenvolvido mais rapidamente no grupo DH quando comparado com dieta apenas gordurosa. O uso de dieta rica em sacarose e gordura leva à dislipidemia significativa, sendo caracterizada por maiores valores de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicérides, além de hiperinsulinemia e discreta hiperglicemia (FERNANDES-SANTOS et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2010). Estes dados demonstraram a contribuição da sacarose no processo e justificam o uso desta dieta na indução do quadro de síndrome metabólica com consequente DM a partir de 4 meses.

A glicotoxicidade nas células B pode ser definida como processo patológico e dano irreversível causado pela exposição crônica e excessiva à glicose que leva à menor síntese e secreção de insulina (ROBERTSON et al., 2003). A glicotoxicidade implica em dano gradual e irreversível a componentes celulares fundamentais na produção de insulina, levando a célula à exaustão e apoptose (ROBERTSON et al., 2003). A hiperglicemia prolongada induz a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo, visto que há poucos anti-oxidantes na célula B (ROBERTSON et al., 2003; DONATH et al., 2005). Já os ácidos graxos livres induzem a resistência insulínica, o que desencadeia uma compensação via maior secreção de insulina, entretanto, os ácidos graxos livres elevados prolongadamente contribuem na falência progressiva de células B, evento denominado lipotoxicidade (BODEN; SHULMAN, 2002). Um balanço entre os efeitos pró e anti-apoptóticos das lipoproteínas foi descrito sobre a secreção de insulina pelas células B, sendo que a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e a LDL reduzem o RNAm de insulina e a proliferação de células B, além dos efeitos pró-apoptóticos por agir via c-Jun quinase N-terminal (ROEHRICH et al., 2003).

O presente estudo foi o primeiro a comparar os grupos DH e CT até 6 meses sob as respectivas dietas, motivo pelo qual a queda nos valores de insulina plasmática observada no presente estudo ainda não foram relatadas no grupo DH em estudos prévios. O objetivo de prolongar o estudo até os 6 meses foi caracterizar a redução da insulinemia, o que representaria o possível início da exaustão de células B. A insulinemia do grupo CT ao longo de 6 meses foi estável, não apresentando diferenças significativas, fato que evidencia que esta dieta estava adequadamente balanceada e não modificou o quadro metabólico dos animais que compõem este grupo. A avaliação dos dados obtidos após a mensuração da insulina plasmática do grupo DH evidenciou que este grupo tornou-se hiperinsulinêmico após 1 mês de dieta, sendo significativo o aumento entre o primeiro e o segundo mês. A hiperinsulinemia no grupo DH manteve-se estável durante o segundo e o terceiro mês. Entretanto, o quadro se alterou no quarto mês com queda significativa da insulinemia neste grupo, o que sugere exaustão de células B e progressão da doença. No grupo DH há discreta queda, porém não significativa, na insulinemia do quarto mês para o quinto e sexto meses de avaliação, ou seja, os valores permaneceram reduzidos quando comparados com o segundo e terceiro mês, evidenciando a incapacidade da célula B em compensar a secreção frente à

exposição a ácidos graxos livres e carboidratos excessivos. Estes resultados corroboram com a literatura, que descreve a inadequada secreção de insulina compensatória no estabelecimento do quadro de DM tipo 2, (ASSOCIATION, 2012).

O TTG é uma importante ferramenta na clínica e na pesquisa para identificar pacientes intolerantes à glicose e com DM tipo 2. Este teste é amplamente utilizado para caracterizar modelos de camundongos diabéticos. Este desafio à glicose reflete a habilidade das células B de secreção da insulina ao longo do teste, bem como a somatória da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina, portanto, é frequentemente utilizada para avaliar a função da célula B e resistência insulínica (STUMVOLL et al., 2000). Os testes metabólicos foram realizados após jejum alimentar de 6 horas no período vespertino e água à vontade. Optou-se por não realizar jejum alimentar prolongado de 12 a 18 horas, pois há depleção do estoque de glicogênio hepático e aumento na sensibilidade insulínica (ANDRIKOPOULOS et al., 2008). O GLP1 é liberado pelos enterócitos em resposta a nutrientes, por ser um potente hormônio insulínico, interfere nos valores glicêmicos obtidos no TTG (DRUCKER, 2006). Entretanto, para este estudo foi escolhido o TTG por via intraperitoneal ao invés de oral, pois em estudo prévio foi demonstrado que o TTG por via intraperitoneal é eficiente em caracterizar a diferença entre grupos de estudos metabólicos (ANDRIKOPOULOS et al., 2008).

O cálculo da área sob a curva após realização do TTG reflete a diferença de resposta entre os grupos de estudo CT e DH, visto que não há valores de glicemia basal e pós TTG de referência para roedores. A avaliação do gráfico 6 nos permite observar que a média da área obtida ao longo de 6 meses é crescente no grupo DH embora não haja diferença significativa. Valores crescentes na média da área obtida no grupo DH após os 4 meses podem ser correlacionados com os dados obtidos na dosagem de insulina no mesmo período. Já que o TTG reflete a capacidade de secreção de insulina e também o seu efeito em tecidos periféricos, podemos realmente concluir que o modelo metabólico atingiu o objetivo almejado, visto que a queda na insulina do grupo DH após 4 meses pode ter duas interpretações: na primeira significa redução da resistência insulínica, portanto menor necessidade de secreção hormonal, assim teríamos possivelmente uma redução da área obtida; na segunda interpretação há depleção do estoque hormonal e consequente exaustão da célula B, desta forma encontraríamos redução na insulinemia com aumento ou inalteração na área obtida após TTG,

justamente o que ocorreu nos resultados obtidos após 4 meses e descrito em estudo prévio de análise de área sob a curva pós TTG (LARSEN, M. O. et al., 2003).

A organização do pâncreas nos animais domésticos reflete a duplicidade de suas funções, sendo constituído em cerca de 80% por células acinares, correspondente ao órgão exócrino; e apenas 3% por ilhotas pancreáticas, o órgão endócrino (REECE, 2006). Em mamíferos os vasos sanguíneos podem ocupar até 17% do espaço pancreático (REECE, 2006). Até o presente momento não foram encontrados relatos na literatura de avaliação da vascularização pancreática em camundongos diabéticos por meio da marcação com anticorpo anti-CD31 e avaliações estereológicas. A lei básica da estereologia relata que a quantidade relativa de pontos que tocam a estrutura é comparável à quantidade de área dessa estrutura contida na área-teste, ou a quantidade de volume dessa estrutura no volume-teste (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Consequentemente, a partir de análises bidimensionais em sistema de pontos em área teste é possível determinar qual é o volume de determinada estrutura dentro de um órgão. A avaliação da variável estereológica V_v , que representa o espaço ocupado por determinado constituinte dentro de um órgão, indicou que houve significativa redução vascular pancreática no grupo DH quando comparado ao CT aos 3, 4 e 6 meses. Desta forma, foi possível afirmar que a ingestão de dieta hipercalórica contendo altos teores de sacarose e gorduras reduz em aproximadamente 1% o volume vascular. Já a densidade de comprimento nos fornece informação complementar, estimando o comprimento vascular em milímetros por cada milímetro cúbico de pâncreas, não sendo considerado seu calibre, mas sim seu comprimento (SANTAMARIA et al., 2009). A variável L_v no grupo DH foi inferior em relação ao grupo CT em todos os meses avaliados, porém foi evidenciada significativa redução do comprimento de vasos do grupo DH apenas aos 3 meses se comparados com o grupo CT aos 4 meses. Desta forma, a variável L_v não foi suficientemente sensível para detectar a diferença entre os grupos como a variável V_v , sugerindo que possivelmente a redução vascular seja principalmente por diminuição de calibre em detrimento de número e comprimento.

Inúmeras famílias de vírus já foram utilizadas como vetores de transferência gênica, mas grande ênfase vem sendo dada principalmente a quatro famílias: os adenovírus, retrovírus (incluindo os lentivírus), vírus adeno-associado e, mais recentemente, os herpesvírus. Os retrovírus são outro grupo de grande importância em estudos de terapia gênica, pois sua propriedade de integração ao genoma hospedeiro

acentua a possibilidade de garantir uma expressão estável do transgene. Nos últimos anos, o gênero lentivírus desta família tem recebido muita atenção, principalmente pela capacidade de infectar também células quiescentes (FELDER; SUTTON, 2009). Diversos estudos com sistema de vetor lentiviral mostraram que o transgene foi eficientemente integrado e permaneceu estável em células quiescentes e em divisão, como os neurônios (NALDINI et al., 1996), hepatócitos, miócitos (KAFRI et al., 1997; CUDRÉ-MAUROUX et al., 2003) e células endoteliais (HE et al., 2004). Foi demonstrado que o vetor lentiviral transduz eficientemente ilhotas pancreáticas em cultura (GIANNOUKAKIS et al., 1999; FERNANDES et al., 2004; KOBINGER et al., 2004; LU et al., 2004). A escolha do vetor lentiviral para transferência do gene VEGF foi realizada baseada em suas principais propriedades: transdução em células quiescentes e integração no genoma do hospedeiro, visto que desejamos no estudo avaliar a expressão por período superior a 1 mês, para tanto o transgene deveria permanecer estável e expresso. Contudo, a via para injeção do vetor lentiviral *in vivo* foi um dos principais problemas a ser transposto no projeto. Nenhum trabalho de injeção lentiviral em pâncreas *in vivo* foi localizado, entretanto cinco estudos utilizaram adenovírus e descreveram técnicas de como acessar o pâncreas para terapia gênica. Raper e colaboradores (1996) descreveram quatro técnicas comparativas de injeção do vetor adenoviral no pâncreas de ratos, dentre estas diferentes maneiras, o autor descreve como vias de sucesso aquela em que o vetor foi injetado diretamente no tecido pancreático e a que o vetor foi injetado por via retrógrada via ducto biliar, após o clampeamento próximo ao ducto cístico e proximal a papila duodenal maior, sendo a melhor transdução obtida por via retrógrada. Outros autores concordam quanto ao sucesso por via retrógrada, entretanto, recomendam o clampeamento do ducto apenas próximo ao ducto cístico com o objetivo de evitar a distribuição ao parênquima hepático e aumentar o direcionamento ao tecido pancreático (TANIGUCHI et al., 2003; LOILER et al., 2005). Ayuso e colaboradores (2004) realizaram um estudo em camundongos em que descreveram alta transdução em ilhotas pancreáticas pela injeção do vetor adenoviral na veia jugular após realizar clampeamento na veia porta hepática, artéria hepática e ducto biliar em região caudal ao fígado durante 30 minutos. Ainda em 2004, Wang e colaboradores descreveram que a aplicação do vetor direto no tecido pancreático em um só ponto do pâncreas promove alta taxa de transdução. Baseados nestes estudos, em estudo piloto (dados não descritos nos resultados) foram tentadas as

técnicas de injeção por via retrógrada no ducto biliar, entretanto, os camundongos foram a óbito em menos de 7 dias, com sinais de icterícia grave e pâncreas extremamente friável, o que nos levou a acreditar que o clampeamento e a introdução de agulha no ducto biliar causa inflamação importante, levando a colangiohepatite e pancreatite. Entretanto, em nenhum dos quatro trabalhos publicados foi descrito o uso de anti-inflamatórios, porém acredita-se que para sucesso da técnica seu uso se faça necessário. Baseado no sucesso descrito por Raper e colaboradores (1996) e Wang e colaboradores (2004) da injeção direta em tecido pancreático esta técnica simples e menos invasiva foi escolhida para injeção do vetor lentiviral no pâncreas dos camundongos deste estudo.

O DM é um processo que impede a angiogênese, evidenciado pela redução na neoangiogênese em ratos não obesos diabéticos devido ao decréscimo de VEGF em tecidos isquêmicos (RIVARD, 1999). O conhecimento da menor angiogênese em tecidos isquêmicos em diabéticos norteou a principal hipótese deste projeto, de que o VEGF também participe do processo de falência das células B. Neste contexto, inicialmente aos 3 meses há menor expressão proteica do VEGF nos ácinos, seguida de queda significativa de expressão nas ilhotas pancreáticas aos 4 e 6 meses. Já a análise de expressão gênica permite observar que no terceiro e quarto meses a média de expressão de VEGF no grupo CT foi sempre superior a expressão no grupo DH, embora não tenha-se observado diferença estatística. Desta forma, a hipótese pôde ser comprovada pela constatação de que os níveis gênicos e proteicos de VEGF no pâncreas caem gradativamente ao longo do processo de evolução do DM, com consequente queda do volume vascular e queda na insulinemia, sugerindo que o pâncreas do diabético também seja um tecido isquêmico e que o VEGF é um importante fator na fisiopatogenia desta doença.

Com o objetivo de reverter este processo já estabelecido aos 4 meses, foi escolhido o segundo mês com as dietas para injeção do vetor lentiviral contendo o transgene VEGF, visto que almejou-se que o processo fosse preventivamente corrigido. Embora um dos possíveis tratamentos para obesidade, síndrome metabólica e DM tipo 2 seja a mudança nos hábitos alimentares, a dieta hipercalórica não foi retirada para que não interferisse na avaliação da eficácia da terapia gênica instituída.

A avaliação da expressão proteica do repórter GFP evidenciou sucesso na injeção e expressão do vetor lentiviral no pâncreas. De maneira interessante, a análise de diferentes fotomicrografias evidenciaram que houve maior expressão do vetor na

ilhota pancreática em detrimento da região acinar. Em estudo recente, foi demonstrado alta transdução de ilhotas pancreáticas pela injeção adenoviral (AYUSO et al., 2004), somado aos dados do presente estudo sugere-se tropismo do adenovírus e lentivirus pelas células que compõem a ilhota pancreática.

O VEGFA se liga ao FLT1 com alta afinidade sendo sua constante de dissociação (Kd) de aproximadamente 10-20pM, porém seu efeito é relativamente fraco (DE VRIES et al., 1992). Já o KDR tem uma menor afinidade com o VEGF, a Kd é estimada em aproximadamente 75- 125pM (TERMAN et al., 1992). Estudos indicam que o FLT1 tem um papel crucial na angiogênese (FONG et al., 1995), por atividade mitogênica (ITO; HUANG; CLAESSEON-WELSH, 2001), recrutar células progenitoras endoteliais e promover a migração celular (KANNO et al., 2000). Entretanto, o KDR também é diretamente envolvido na proliferação de células endoteliais e migração (ZENG; SANYAL; MUKHOPADHYAY, 2001). Os dados obtidos pela imuno-histoquímica de FLT1 e KDR não deixaram clara a diferença entre os grupos CT e DH ao longo de 6 meses e após a injeção do vetor lentiviral. Entretanto, a observação da expressão gênica nos permite sugerir que há uma queda na expressão de FLT1 e KDR aos 4 meses no grupo DH, acompanhando a queda na expressão de VEGF. Após a injeção do vetor lentiviral contendo VEGF, notou-se uma mudança na expressão gênica deste fator, sendo que no grupo DH e DHPLL a expressão era inferior ao grupo CT e CTPLL, sendo que a injeção do vetor e expressão deste sistema induziu uma mudança nesta relação, com significativo aumento do VEGF no grupo DHVEGF em relação ao DH e DHPLL, e maior valor de expressão no DHVEGF em relação ao CTVEGF. Sugere-se que o aumento na expressão de VEGF e consequentemente maior disponibilidade da molécula no pâncreas, resulte em regulação positiva dos receptores FLT1 e KDR, sendo significativo o aumento na expressão gênica de FLT1 e KDR no grupo DHVEGF em relação do DH e DHPLL aos 4 meses. Desta forma, acredita-se que o aumento no volume vascular do pâncreas de camundongos em que houve a injeção do vetor lentiviral contendo o transgene VEGF, deva-se à ação angiogênica via receptores FLT1 e KDR.

Os capilares que compõem o pâncreas são extremamente finos e fenestrados, sendo esta fenestração endotelial resultante da fusão de sua membrana apical e basal, formando um diafragma permeável, denominado fenestra (LAMMERT et al., 2003). A deleção do VEGFA em pâncreas de camundongos evidenciou que há drástica alteração

na morfologia das células endoteliais dos capilares, notando-se redução no corpo celular e menor fenestração (LAMMERT et al., 2003). Além disso, VEGFA é importante para a regulação da glicemia, visto que frente ao desafio de glicose intraperitoneal os camundongos com deleção no gene VEGF pancreático apresentaram deficiência na secreção de insulina e regulação da glicemia quando comparados a camundongos selvagens (LAMMERT et al., 2003; WATADA, 2010). No grupo CTVEGF e DHVEGF foi observado aumento em aproximadamente 1% na média da variável Vv quando comparada aos demais grupos de mesmo período, indicando aumento da rede vascular pancreática. Provavelmente devido a esta maior vascularização houve maior secreção de insulina pelas células B, notada no grupo DHVEGF em relação aos demais grupos de mesmo período. Portanto, este trabalho concorda com a literatura quanto à importância da perfeita formação dos capilares para que a glicose sinalize para a célula sua concentração e posterior secreção de insulina para homeostase glicêmica. Entretanto, na avaliação dos dados de tolerância à glicose não houve qualquer sugestão de melhora entre os grupos, mas este dado era esperado devido a dois fatores importantes, a primeira questão é quanto a permanência da dieta, desta forma os fatores ligados à resistência insulínica mantiveram-se presentes e mesmo diante da maior secreção hormonal não foi suficiente para melhorar a resposta periférica; a segunda questão é em relação ao local de injeção, assim o aproveitamento foi preferencialmente no local de produção, não exercendo eficiente efeito periférico. Sabendo das correlações recentemente relatadas da expressão de VEGF na progressão e sobrevivência de células cancerígenas (DEWING; EMMETT; PRITCHARD JONES, 2012), não foi objetivo deste estudo super expressar VEGF.

O VEGF₁₆₅ promove sobrevivência celular via ativação da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) e de seu efector proteína quinase B (Akt) (QI et al., 1999). Com base na melhora da secreção de insulina no grupo DHVEGF, levanta-se a questão de como isso ocorreu, se o VEGF promoveu sobrevivência da célula B ou se os vasos neoformados possuem adequadas fenestrações que permitiram a sinalização da glicose e posterior secreção da insulina.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- a) Os camundongos da linhagem C57bl/6, submetidos cronicamente à dieta rica em sacarose e gordura, desenvolvem resistência insulínica, hiperinsulinemia e exaustão de células B pancreáticas,
- b) O estabelecimento do DM leva a diminuição da expressão gênica e proteica do VEGFA e seus receptores no pâncreas, o que está relacionado ao menor volume de vasos neste órgão e queda na insulinemia, e
- c) O aumento na expressão do transgene VEGFA após transdução lentiviral correlaciona-se positivamente com o aumento no volume vascular e melhora na função da célula B pancreática em secretar insulina.

Referências

REFERÊNCIAS

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J.; GROUP, I. E. T. F. C. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1059-1062, 2005.

ANDRIKOPOULOS, S.; BLAIR, A. R.; DELUCA, N.; FAM, B. C.; PROIETTO, J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 6, p. E1323-1332, 2008.

ASSOCIATION, A. D. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35 Suppl 1, n., p. S64-71, 2012.

AYUSO, E.; CHILLÓN, M.; AGUDO, J.; HAURIGOT, V.; BOSCH, A.; CARRETERO, A.; OTAEGUI, P. J.; BOSCH, F. In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. **Hum Gene Ther**, v. 15, n. 8, p. 805-812, 2004.

BARNETT, D.M.; KRALL, L.P. A história do diabetes. In: KAHN, C.R.; KING, G.L.; MOSES, A.C.; WEIR, G.C.; JACOBSON, A.M.; SMITH, R.J. Joslin: Diabetes melito. 14th ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009. p. 15-31.

BATES, D. O.; HARPER, S. J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascul Pharmacol**, v. 39, n. 4-5, p. 225-237, 2002.

BERGMAN, R. N. Minimal model: perspective from 2005. **Horm Res**, v. 64 Suppl 3, n., p. 8-15, 2005.

BODEN, G.; SHULMAN, G. I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. **Eur J Clin Invest**, v. 32 Suppl 3, n., p. 14-23, 2002.

BONNY, C.; OBERSON, A.; NEGRI, S.; SAUSER, C.; SCHORDERET, D. F. Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. **Diabetes**, v. 50, n. 1, p. 77-82, 2001.

BREGENHOLT, S.; MØLDRUP, A.; BLUME, N.; KARLSEN, A. E.; NISSEN FRIEDRICHSEN, B.; TORNHAVE, D.; KNUDSEN, L. B.; PETERSEN, J. S. The long-acting glucagon-like peptide-1 analogue, liraglutide, inhibits beta-cell apoptosis in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 330, n. 2, p. 577-584, 2005.

BROWN, L. F.; YEO, K. T.; BERSE, B.; YEO, T. K.; SENGGER, D. R.; DVORAK, H. F.; VAN DE WATER, L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **J Exp Med**, v. 176, n. 5, p. 1375-1379, 1992.

BUTLER, A. E.; JANSON, J.; BONNER-WEIR, S.; RITZEL, R.; RIZZA, R. A.; BUTLER, P. C. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 102-110, 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 653-660, 2003.

CARVALHO, J. F.; BLANK, M.; SHOENFELD, Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases. **J Clin Immunol**, v. 27, n. 3, p. 246-256, 2007.

CÉBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJÄLLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 5, p. 601-615, 2006.

CHANG, A. M.; JAKOBSEN, G.; STURIS, J.; SMITH, M. J.; BLOEM, C. J.; AN, B.; GALECKI, A.; HALTER, J. B. The GLP-1 derivative NN2211 restores beta-cell sensitivity to glucose in type 2 diabetic patients after a single dose. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1786-1791, 2003.

CHICCO, A.; D'ALESSANDRO, M. E.; KARABATAS, L.; PASTORALE, C.; BASABE, J. C.; LOMBARDO, Y. B. Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 127-133, 2003.

CHOI, S.; OH, S.; LEE, M.; KIM, S. W. Glucagon-like peptide-1 plasmid construction and delivery for the treatment of type 2 diabetes. **Mol Ther**, v. 12, n. 5, p. 885-891, 2005.

CROSS, M. J.; DIXELIUS, J.; MATSUMOTO, T.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF-receptor signal transduction. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 9, p. 488-494, 2003.

CUDRÉ-MAUROUX, C.; OCCHIODORO, T.; KÖNIG, S.; SALMON, P.; BERNHEIM, L.; TRONO, D. Lentivector-mediated transfer of Bmi-1 and telomerase in muscle satellite cells yields a duchenne myoblast cell line with long-term genotypic and phenotypic stability. **Hum Gene Ther**, v. 14, n. 16, p. 1525-1533, 2003.

DANAEI, G.; FINUCANE, M. M.; LU, Y.; SINGH, G. M.; COWAN, M. J.; PACIOREK, C. J.; LIN, J. K.; FARZADFAR, F.; KHANG, Y. H.; STEVENS, G. A.; RAO, M.; ALI, M. K.; RILEY, L. M.; ROBINSON, C. A.; EZZATI, M.; GLUCOSE, G. B. O. M. R. F. O. C. D. C. G. B. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 31-40, 2011.

DARVILLE, M. I.; EIZIRIK, D. L. Cytokine induction of Fas gene expression in insulin-producing cells requires the transcription factors NF-kappaB and C/EBP. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1741-1748, 2001.

DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J. A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v. 255, n. 5047, p. 989-991, 1992.

DEWING, D.; EMMETT, M.; PRITCHARD JONES, R. The Roles of Angiogenesis in Malignant Melanoma: Trends in Basic Science Research over the Last 100 Years. **ISRN Oncol**, v. 2012, n., p. 546927, 2012.

DONATH, M. Y.; HALBAN, P. A. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 581-589, 2004.

DONATH, M. Y.; EHSES, J. A.; MAEDLER, K.; SCHUMANN, D. M.; ELLINGSGAARD, H.; EPPLER, E.; REINECKE, M. Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, n., p. S108-113, 2005.

DOYLE, M. E.; EGAN, J. M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. **Pharmacol Ther**, v. 113, n. 3, p. 546-593, 2007.

DRUCKER, D. J. The biology of incretin hormones. **Cell Metab**, v. 3, n. 3, p. 153-165, 2006.

DUBOIS, S.; MADEC, A. M.; MESNIER, A.; ARMANET, M.; CHIKH, K.; BERNEY, T.; THIVOLET, C. Glucose inhibits angiogenesis of isolated human pancreatic islets. **J Mol Endocrinol**, v. 45, n. 2, p. 99-105, 2010.

DUH, E.; AIELLO, L. P. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. **Diabetes**, v. 48, n. 10, p. 1899-1906, 1999.

ELSNER, M.; TERBISH, T.; JÖRNS, A.; NAUJOK, O.; WEDEKIND, D.; HEDRICH, H. J.; LENZEN, S. Reversal of diabetes through gene therapy of diabetic rats by hepatic insulin expression via lentiviral transduction. **Mol Ther**, v. 20, n. 5, p. 918-926, 2012.

FALL, T.; HAMLIN, H. H.; HEDHAMMAR, A.; KÄMPE, O.; EGENVALL, A. Diabetes mellitus in a population of 180,000 insured dogs: incidence, survival, and breed distribution. **J Vet Intern Med**, v. 21, n. 6, p. 1209-1216, 2007.

FELDER, J.M.; SUTTON, R.E. Lentiviral vectors. In: TEMPLETON, N.S. Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies. 3rd ed. New York: CRC Press, 2009. p-207-245.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd ed. St Louis: Elsevier, 2004. p. 486-535.

FERNANDES-SANTOS, C.; CARNEIRO, R. E.; DE SOUZA MENDONCA, L.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Pan-PPAR agonist beneficial effects in overweight mice fed a high-fat high-sucrose diet. **Nutrition**, v. 25, n. 7-8, p. 818-827, 2009.

FERNANDES, J. R.; DUVIVIER-KALI, V. F.; KEEGAN, M.; HOLLISTER-LOCK, J.; OMER, A.; SU, S.; BONNER-WEIR, S.; FENG, S.; LEE, J. S.; MULLIGAN, R. C.; WEIR, G. C. Transplantation of islets transduced with CTLA4-Ig and TGFbeta using adenovirus and lentivirus vectors. **Transpl Immunol**, v. 13, n. 3, p. 191-200, 2004.

FERRARA, N.; CHEN, H.; DAVIS-SMYTH, T.; GERBER, H. P.; NGUYEN, T. N.; PEERS, D.; CHISHOLM, V.; HILLAN, K. J.; SCHWALL, R. H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nat Med**, v. 4, n. 3, p. 336-340, 1998.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr Rev**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FONG, G. H.; ROSSANT, J.; GERTSENSTEIN, M.; BREITMAN, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v. 376, n. 6535, p. 66-70, 1995.

GADDY, D. F.; RIEDEL, M. J.; PEJAWAR-GADDY, S.; KIEFFER, T. J.; ROBBINS, P. D. In vivo expression of HGF/NK1 and GLP-1 From dsAAV vectors enhances pancreatic β -cell proliferation and improves pathology in the db/db mouse model of diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3108-3116, 2010.

Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Disponível em: <<http://www.abedia.com/wiley/phases.php>>. Acesso em: 04 junho 2012

GERBER, H. P.; VU, T. H.; RYAN, A. M.; KOWALSKI, J.; WERB, Z.; FERRARA, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nat Med**, v. 5, n. 6, p. 623-628, 1999.

GIANNOUKAKIS, N.; MI, Z.; GAMBOTTO, A.; ERAMO, A.; RICORDI, C.; TRUCCO, M.; ROBBINS, P. Infection of intact human islets by a lentiviral vector. **Gene Ther**, v. 6, n. 9, p. 1545-1551, 1999.

GORDEN, D. L.; MANDRIOTA, S. J.; MONTESANO, R.; ORCI, L.; PEPPER, M. S. Vascular endothelial growth factor is increased in devascularized rat islets of Langerhans in vitro. **Transplantation**, v. 63, n. 3, p. 436-443, 1997.

HAN, S.W. História da Terapia Gênica, Estado da Arte, Técnicas e Ética. In: MORALES, M.M. Terapias Avançadas: Células- tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 106-119.

HE, Z.; EHRENFELT, C.; KUMAGAI-BRAESCH, M.; ISLAM, K. B.; HOLGERSSON, J. Aberrant expression of alpha-Gal on primary human endothelium does not confer susceptibility to NK cell cytotoxicity or increased NK cell adhesion. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 4, p. 1185-1195, 2004.

HOUCK, K. A.; FERRARA, N.; WINER, J.; CACHIANES, G.; LI, B.; LEUNG, D. W. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. **Mol Endocrinol**, v. 5, n. 12, p. 1806-1814, 1991.

IEDA, Y.; FUJITA, J.; IEDA, M.; YAGI, T.; KAWADA, H.; ANDO, K.; FUKUDA, K. G-CSF and HGF: combination of vasculogenesis and angiogenesis synergistically improves recovery in murine hind limb ischemia. **J Mol Cell Cardiol**, v. 42, n. 3, p. 540-548, 2007.

IMERYÜZ, N.; YEĞEN, B. C.; BOZKURT, A.; COŞKUN, T.; VILLANUEVA-PEÑACARRILLO, M. L.; ULUSOY, N. B. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. **Am J Physiol**, v. 273, n. 4 Pt 1, p. G920-927, 1997.

ITO, N.; HUANG, K.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. **Cell Signal**, v. 13, n. 11, p. 849-854, 2001.

JUSSILA, L.; ALITALO, K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. **Physiol Rev**, v. 82, n. 3, p. 673-700, 2002.

KAFRI, T.; BLÖMER, U.; PETERSON, D. A.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. **Nat Genet**, v. 17, n. 3, p. 314-317, 1997.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.

KAIPAINEN, A.; KORHONEN, J.; MUSTONEN, T.; VAN HINSBERGH, V. W.; FANG, G. H.; DUMONT, D.; BREITMAN, M.; ALITALO, K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 8, p. 3566-3570, 1995.

KAISER, N.; LEIBOWITZ, G.; NESHER, R. Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 16, n. 1, p. 5-22, 2003.

KANNO, S.; ODA, N.; ABE, M.; TERA, Y.; ITO, M.; SHITARA, K.; TABAYASHI, K.; SHIBUYA, M.; SATO, Y. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. **Oncogene**, v. 19, n. 17, p. 2138-2146, 2000.

KERBEL, R. S. Tumor angiogenesis. **N Engl J Med**, v. 358, n. 19, p. 2039-2049, 2008.

KO, J.; JUN, H.; CHUNG, H.; YOON, C.; KIM, T.; KWON, M.; LEE, S.; JUNG, S.; KIM, M.; PARK, J. H. Comparison of EGF with VEGF non-viral gene therapy for cutaneous wound healing of streptozotocin diabetic mice. **Diabetes Metab J**, v. 35, n. 3, p. 226-235, 2011.

KOBINGER, G. P.; DENG, S.; LOUBOUTIN, J. P.; VATAMANIUK, M.; MATSCHINSKY, F.; MARKMANN, J. F.; RAPER, S. E.; WILSON, J. M. Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. **Hum Gene Ther**, v. 15, n. 2, p. 211-219, 2004.

KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; MASUDA, K.; SUGIHARA, H. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). **Biochemistry**, v. 38, n. 36, p. 11796-11803, 1999.

KONOPATSKAYA, O.; CHURCHILL, A. J.; HARPER, S. J.; BATES, D. O.; GARDINER, T. A. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. **Mol Vis**, v. 12, n., p. 626-632, 2006.

LAAKSONEN, D. E.; LAKKA, H. M.; NISKANEN, L. K.; KAPLAN, G. A.; SALONEN, J. T.; LAKKA, T. A. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. **Am J Epidemiol**, v. 156, n. 11, p. 1070-1077, 2002.

LAMMERT, E.; CLEAVER, O.; MELTON, D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. **Science**, v. 294, n. 5542, p. 564-567, 2001.

LAMMERT, E.; GU, G.; MCLAUGHLIN, M.; BROWN, D.; BREKKEN, R.; MURTAUGH, L. C.; GERBER, H. P.; FERRARA, N.; MELTON, D. A. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. **Curr Biol**, v. 13, n. 12, p. 1070-1074, 2003.

LANGE, T.; GUTTMANN-RAVIV, N.; BARUCH, L.; MACHLUF, M.; NEUFELD, G. VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 19, p. 17164-17169, 2003.

LARSEN, C. M.; FAULENBACH, M.; VAAG, A.; VØLUND, A.; EHSES, J. A.; SEIFERT, B.; MANDRUP-POULSEN, T.; DONATH, M. Y. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 356, n. 15, p. 1517-1526, 2007.

LARSEN, M. O.; ROLIN, B.; WILKEN, M.; CARR, R. D.; GOTFREDSEN, C. F. Measurements of insulin secretory capacity and glucose tolerance to predict pancreatic beta-cell mass in vivo in the nicotinamide/streptozotocin Göttingen minipig, a model of moderate insulin deficiency and diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 118-123, 2003.

LEE, S.; JILANI, S. M.; NIKOLOVA, G. V.; CARPIZO, D.; IRUELA-ARISPE, M. L. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. **J Cell Biol**, v. 169, n. 4, p. 681-691, 2005.

LIU, M. J.; SHIN, S.; LI, N.; SHIGIHARA, T.; LEE, Y. S.; YOON, J. W.; JUN, H. S. Prolonged remission of diabetes by regeneration of beta cells in diabetic mice treated with recombinant adenoviral vector expressing glucagon-like peptide-1. **Mol Ther**, v. 15, n. 1, p. 86-93, 2007.

LIU, S. H.; HE, S. P.; CHIANG, M. T. Effects of long-term feeding of chitosan on postprandial lipid responses and lipid metabolism in a high-sucrose-diet-impaired glucose-tolerant rat model. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 17, p. 4306-4313, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method. Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOILER, S. A.; TANG, Q.; CLARKE, T.; CAMPBELL-THOMPSON, M. L.; CHIODO, V.; HAUSWIRTH, W.; CRUZ, P.; PERRET-GENTIL, M.; ATKINSON, M. A.; RAMIYA, V. K.; FLOTTE, T. R. Localized gene expression following administration of adeno-associated viral vectors via pancreatic ducts. **Mol Ther**, v. 12, n. 3, p. 519-527, 2005.

LOMBARDO, Y. B.; DRAGO, S.; CHICCO, A.; FAINSTEIN-DAY, P.; GUTMAN, R.; GAGLIARDINO, J. J.; GOMEZ DUMM, C. L. Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. **Metabolism**, v. 45, n. 12, p. 1527-1532, 1996.

LORENZO, C.; OKOLOISE, M.; WILLIAMS, K.; STERN, M. P.; HAFFNER, S. M.; STUDY, S. A. H. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. **Diabetes Care**, v. 26, n. 11, p. 3153-3159, 2003.

LU, Y.; DANG, H.; MIDDLETON, B.; ZHANG, Z.; WASHBURN, L.; CAMPBELL-THOMPSON, M.; ATKINSON, M. A.; GAMBHIR, S. S.; TIAN, J.; KAUFMAN, D. L. Bioluminescent monitoring of islet graft survival after transplantation. **Mol Ther**, v. 9, n. 3, p. 428-435, 2004.

MAEDLER, K.; SPINAS, G. A.; LEHMANN, R.; SERGEEV, P.; WEBER, M.; FONTANA, A.; KAISER, N.; DONATH, M. Y. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1683-1690, 2001.

MAEDLER, K.; SERGEEV, P.; RIS, F.; OBERHOLZER, J.; JOLLER-JEMELKA, H. I.; SPINAS, G. A.; KAISER, N.; HALBAN, P. A.; DONATH, M. Y. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **J Clin Invest**, v. 110, n. 6, p. 851-860, 2002.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.E. Morfometria e Estereologia em Microscopia Eletrônica de Transmissão. In: Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas, 3ª Ed, Rio de Janeiro: De Souza, 2011. p. 327-334.

MCGARRY, J. D.; DOBBINS, R. L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. **Diabetologia**, v. 42, n. 2, p. 128-138, 1999.

MEDIPOINT. Disponível em: <http://www.medipoint.com/html/mouse_phlebotomy.html>. Acesso em: 04 junho 2012.

MERCER, A. A.; WISE, L. M.; SCAGLIARINI, A.; MCINNES, C. J.; BÜTTNER, M.; RZIHA, H. J.; MCCAUGHAN, C. A.; FLEMING, S. B.; UEDA, N.; NETTLETON, P. F. Vascular endothelial growth factors encoded by Orf virus show surprising sequence variation but have a conserved, functionally relevant structure. **J Gen Virol**, v. 83, n. Pt 11, p. 2845-2855, 2002.

MOORE, H. P.; WALKER, M. D.; LEE, F.; KELLY, R. B. Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse ACTH-secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing, and secretion on stimulation. **Cell**, v. 35, n. 2 Pt 1, p. 531-538, 1983.

MULLER, Y. A.; LI, B.; CHRISTINGER, H. W.; WELLS, J. A.; CUNNINGHAM, B. C.; DE VOS, A. M. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 14, p. 7192-7197, 1997.

NALDINI, L.; BLÖMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F. H.; VERMA, I. M.; TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 263-267, 1996.

NASCIMENTO, F. A.; BARBOSA-DA-SILVA, S.; FERNANDES-SANTOS, C.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Adipose tissue, liver and pancreas structural alterations in C57BL/6 mice fed high-fat-high-sucrose diet supplemented with fish oil (n-3 fatty acid rich oil). **Exp Toxicol Pathol**, v. 62, n. 1, p. 17-25, 2010.

NEUFELD, G.; KESSLER, O.; HERZOG, Y. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. **Adv Exp Med Biol**, v. 515, n., p. 81-90, 2002.

NIESSEN, S. J.; FERNANDEZ-FUENTE, M.; MAHMOUD, A.; CAMPBELL, S. C.; ALDIBBIAT, A.; HUGGINS, C.; BROWN, A. E.; HOLDER, A.; PIERCY, R. J.; CATCHPOLE, B.; SHAW, J. A.; CHURCH, D. B. Novel diabetes mellitus treatment: mature canine insulin production by canine striated muscle through gene therapy. **Domest Anim Endocrinol**, v. 43, n. 1, p. 16-25, 2012.

OLSON, D. E.; CAMPBELL, A. G.; PORTER, M. H.; FREEMAN, K. G.; KELSO, E.; FLATT, W. P.; THULÉ, P. M. Hepatic insulin gene therapy normalizes diurnal fluctuation of oxidative metabolism in diabetic BB/Wor rats. **Mol Ther**, v. 16, n. 7, p. 1235-1242, 2008.

OMS. Disponível em: Chronic Diseases and Health Promotion Diabetes Unit. <<http://www.who.int/diabetes/en/index.html>>. Acesso em: 04 junho 2012.

PANCIERA, D. L.; THOMAS, C. B.; EICKER, S. W.; ATKINS, C. E. Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in cats: 333 cases (1980-1986). **J Am Vet Med Assoc**, v. 197, n. 11, p. 1504-1508, 1990.

PARK, J. E.; KELLER, G. A.; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. **Mol Biol Cell**, v. 4, n. 12, p. 1317-1326, 1993.

PEREIRA LOPES, F. R.; LISBOA, B. C.; FRATTINI, F.; ALMEIDA, F. M.; TOMAZ, M. A.; MATSUMOTO, P. K.; LANGONE, F.; LORA, S.; MELO, P. A.; BOROJEVIC, R.; HAN, S. W.; MARTINEZ, A. M. Enhancement of sciatic nerve regeneration after vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 37, n. 6, p. 600-612, 2011.

PICK, A.; CLARK, J.; KUBSTRUP, C.; LEVISETTI, M.; PUGH, W.; BONNER-WEIR, S.; POLONSKY, K. S. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. **Diabetes**, v. 47, n. 3, p. 358-364, 1998.

PRAHL, A.; GUPTILL, L.; GLICKMAN, N. W.; TETRICK, M.; GLICKMAN, L. T. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in cats presented to veterinary teaching hospitals. **J Feline Med Surg**, v. 9, n. 5, p. 351-358, 2007.

QI, J. H.; MATSUMOTO, T.; HUANG, K.; OLAUSSON, K.; CHRISTOFFERSON, R.; CLAEISSON-WELSH, L. Phosphoinositide 3 kinase is critical for survival, mitogenesis and migration but not for differentiation of endothelial cells. **Angiogenesis**, v. 3, n. 4, p. 371-380, 1999.

RABINOVITCH, A.; SUAREZ, W. L.; POWER, R. F. Combination therapy with an antioxidant and a corticosteroid prevents autoimmune diabetes in NOD mice. **Life Sci**, v. 51, n. 25, p. 1937-1943, 1992.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RAPER, S. E.; DEMATTEO, R. P. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat pancreas. **Pancreas**, v. 12, n. 4, p. 401-410, 1996.

REECE, W.O. Dukes, fisiologia dos animais domésticos. 12^a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 611.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RIEDEL, M. J.; GADDY, D. F.; ASADI, A.; ROBBINS, P. D.; KIEFFER, T. J. DsAAV8-mediated expression of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells ameliorates streptozotocin-induced diabetes. **Gene Ther**, v. 17, n. 2, p. 171-180, 2010.

RISAU, W.; FLAMME, I. **Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 11, n., p. 73-91, 1995.

ROBERTSON, R. P.; HARMON, J.; TRAN, P. O.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 581-587, 2003.

ROEHRICH, M. E.; MOOSER, V.; LENAIN, V.; HERZ, J.; NIMPF, J.; AZHAR, S.; BIDEAU, M.; CAPPONI, A.; NICOD, P.; HAEFLIGER, J. A.; WAEBER, G. Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. **J Biol Chem**, v. 278, n. 20, p. 18368-18375, 2003.

ROGLIC, G.; UNWIN, N.; BENNETT, P. H.; MATHERS, C.; TUOMILEHTO, J.; NAG, S.; CONNOLLY, V.; KING, H. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. **Diabetes Care**, v. 28, n. 9, p. 2130-2135, 2005.

RYAN, E. A.; LAKEY, J. R.; PATY, B. W.; IMES, S.; KORBUTT, G. S.; KNETEMAN, N. M.; BIGAM, D.; RAJOTTE, R. V.; SHAPIRO, A. M. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2148-2157, 2002.

SACRAMENTO, C. B.; CANTAGALLI, V. D.; GRINGS, M.; CARVALHO, L. P.; BAPTISTA-SILVA, J. C.; BEUTEL, A.; BERGAMASCHI, C. T.; DE CAMPOS JUNIOR, R. R.; DE MORAES, J. Z.; TAKIYA, C. M.; SAMOTO, V. Y.; BOROJEVIC, R.; DA SILVA, F. H.; NARDI, N. B.; DOHMANN, H. F.; JUNIOR, H. S.; VALERO, V. B.; HAN, S. W. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene based therapy for acute limb ischemia in a mouse model. **J Gene Med**, v. 11, n. 4, p. 345-353, 2009.

SAKO, Y.; GRILL, V. E. Coupling of beta-cell desensitization by hyperglycemia to excessive stimulation and circulating insulin in glucose-infused rats. **Diabetes**, v. 39, n. 12, p. 1580-1583, 1990.

SANDHU, H.; WIESENTHAL, S. R.; MACDONALD, P. E.; MCCALL, R. H.; TCHIPASHVILI, V.; RASHID, S.; SATKUNARAJAH, M.; IRWIN, D. M.; SHI, Z. Q.; BRUBAKER, P. L.; WHEELER, M. B.; VRANIC, M.; EFENDIC, S.; GIACCA, A. Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. **Diabetes**, v. 48, n. 5, p. 1045-1053, 1999.

SANTAMARÍA, L.; INGELMO, I.; RUIZ, J.; TEBA, F.; HERRANZ, L.M.; MONTALBÁN, G.; MARTÍN, R.; CODESAL, J.; POZUELO, J.M.; ROSARIO, R.; ARRIAZU, R. Stereological estimate of the length of microvessels and the number proliferation and apoptosis of endothelial cells in prostate cancer. **Open Prostate Cancer J.** v. 2, p.46-53, 2009.

SATO, A.; KAWANO, H.; NOTSU, T.; OHTA, M.; NAKAKUKI, M.; MIZUGUCHI, K.; ITOH, M.; SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2495-2504, 2010.

SAUTER, N. S.; SCHULTHEISS, F. T.; GALASSO, R.; CASTELLANI, L. W.; MAEDLER, K. The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2208-2218, 2008.

SCHEEN, A. J. Diabetes mellitus in the elderly: insulin resistance and/or impaired insulin secretion? **Diabetes Metab**, v. 31 Spec No 2, n., p. 5S27-25S34, 2005.

SENGER, D. R.; GALLI, S. J.; DVORAK, A. M.; PERRUZZI, C. A. HARVEY', V. S.; DVORAK, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 983-985, 1983.

SHIBUYA, M.; YAMAGUCHI, S.; YAMANE, A.; IKEDA, T.; TOJO, A.; MATSUSHIME, H.; SATO, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. **Oncogene**, v. 5, n. 4, p. 519-524, 1990.

STUMVOLL, M.; MITRAKOU, A.; PIMENTA, W.; JENSSEN, T.; YKI-JÄRVINEN, H.; VAN HAEFTEN, T.; RENN, W.; GERICH, J. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 3, p. 295-301, 2000.

SUTO, K.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T.; MIZUNO, H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. **J Biol Chem**, v. 280, n. 3, p. 2126-2131, 2005.

SVENSSON, B.; PETERS, M.; KÖNIG, H. G.; POPPE, M.; LEVKAU, B.; ROTHERMUNDT, M.; AROLT, V.; KÖGEL, D.; PREHN, J. H. Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, n. 10, p. 1170-1175, 2002.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n. 3, p. 227-241, 2005.

TANIGUCHI, H.; YAMATO, E.; TASHIRO, F.; IKEGAMI, H.; OGIHARA, T.; MIYAZAKI, J. beta-cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas. **Gene Ther**, v. 10, n. 1, p. 15-23, 2003.

TÉLLEZ, N.; MONTOLIO, M.; BIARNÉS, M.; CASTAÑO, E.; SOLER, J.; MONTANYA, E. Adenoviral overexpression of interleukin-1 receptor antagonist

protein increases beta-cell replication in rat pancreatic islets. **Gene Ther**, v. 12, n. 2, p. 120-128, 2005.

TEN, S.; MACLAREN, N. Insulin resistance syndrome in children. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2526-2539, 2004.

TERMAN, B. I.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M. E.; DIMITROV, D.; ARMELLINO, D. C.; GOSPODAROWICZ, D.; BÖHLEN, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 187, n. 3, p. 1579-1586, 1992.

TIAN, J.; LEI, P.; LAYCHOCK, S. G.; ANDREADIS, S. T. Regulated insulin delivery from human epidermal cells reverses hyperglycemia. **Mol Ther**, v. 16, n. 6, p. 1146-1153, 2008.

TSCHANZ, S. A.; BURRI, P. H.; WEIBEL, E. R. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. **J Microsc**, v. 243, n. 1, p. 47-59, 2011.

TURTON, M. D.; O'SHEA, D.; GUNN, I.; BEAK, S. A.; EDWARDS, C. M.; MEERAN, K.; CHOI, S. J.; TAYLOR, G. M.; HEATH, M. M.; LAMBERT, P. D.; WILDING, J. P.; SMITH, D. M.; GHATEI, M. A.; HERBERT, J.; BLOOM, S. R. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 379, n. 6560, p. 69-72, 1996.

UNGER, R. H.; OHNEDA, A.; VALVERDE, I.; EISENTRAUT, A. M.; EXTON, J. Characterization of the responses of circulating glucagon-like immunoreactivity to intraduodenal and intravenous administration of glucose. **J Clin Invest**, v. 47, n. 1, p. 48-65, 1968.

WANG, A. Y.; PENG, P. D.; EHRHARDT, A.; STORM, T. A.; KAY, M. A. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. **Hum Gene Ther**, v. 15, n. 4, p. 405-413, 2004.

WATADA, H. Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. **Endocr J**, v. 57, n. 3, p. 185-191, 2010.

WONG, M. S.; HAWTHORNE, W. J.; MANOLIOS, N. Gene therapy in diabetes. **Self Nonself**, v. 1, n. 3, p. 165-175, 2010.

XU, J.; LU, Y.; DING, F.; ZHAN, X.; ZHU, M.; WANG, Z. Reversal of diabetes in mice by intrahepatic injection of bone-derived GFP-murine mesenchymal stem cells infected with the recombinant retrovirus-carrying human insulin gene. **World J Surg**, v. 31, n. 9, p. 1872-1882, 2007.

YAMAZAKI, Y.; TAKANI, K.; ATODA, H.; MORITA, T. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). **J Biol Chem**, v. 278, n. 52, p. 51985-51988, 2003.

ZENG, H.; SANYAL, S.; MUKHOPADHYAY, D. Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively. **J Biol Chem**, v. 276, n. 35, p. 32714-32719, 2001.

ZHANG, N.; RICHTER, A.; SURIAWINATA, J.; HARBARAN, S.; ALTOMONTE, J.; CONG, L.; ZHANG, H.; SONG, K.; MESECK, M.; BROMBERG, J.; DONG, H. Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization. **Diabetes**, v. 53, n. 4, p. 963-970, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Tabela 1. Consumo médio de ração diária por animal e erro padrão do grupo controle (CT) e grupo com dieta hipercalórica (DH) ao longo de 6 meses.

	1 mês	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
CT	4,0 ± 0,1	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,1	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2	3,6 ± 0,2
DH	5,0 ± 0,6	3,2 ± 0,1	3,02 ± 0,2	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,2	3,0 ± 0,1

APÊNDICE B- Tabela 2. Peso médio e erro padrão dos animais do grupo controle (CT) e grupo com dieta hipercalórica (DH) ao longo de 6 meses. Letras diferentes indicam diferença significativa entre o grupo CT, asteriscos diferença entre o grupo DH e # entre CT e DH (p<0,05).

	1 mês	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
CT	27,6±0,4 ^a	29,1±0,1 ^{b#}	30,2±0,2 ^{c#}	31,3±0,3 ^d	31,8±0,2 ^{d#}	31,5±0,2 ^{d#}
DH	28,1±1,4 [*]	32,9±0,8 ^{**##}	35,0±0,5 ^{**##}	33,9±0,5 ^{**}	35,6±0,3 ^{**##}	35,9±0,2 ^{**##}

APÊNDICE C- Tabela 3. Concentração média de insulina plasmática (ng/mL) e erro padrão dos animais controles (CT) e com dieta hipercalórica (DH) ao longo de 6 meses. Representação por asteriscos comparam o grupo DH e # diferenças significativas entre o grupo CT e DH ao longo de 6 meses ($p < 0,05$).

	1 mês	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
CT	$0,75 \pm 0,14$	$1,01 \pm 0,07^{\#}$	$0,87 \pm 0,02^{\#}$	$1,39 \pm 0,06^{\#}$	$0,43 \pm 0,07^{\#}$	$0,74 \pm 0,18$
DH	$1,34 \pm 0,38^{*}$	$2,97 \pm 0,97^{* \# \# \#}$	$2,99 \pm 0,51^{* \# \# \#}$	$2,20 \pm 0,25^{* \# \# \#}$	$1,04 \pm 0,14^{* \# \# \#}$	$1,13 \pm 0,10^{*}$

APÊNDICE D- Tabela 4. Média das glicemias (mg/dL) e erro padrão dos animais submetidos à dieta CT frente ao desafio de glicose intraperitonal nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Grupos	Tempo (minutos)					
	0	15	30	60	90	120
1 mês	80,4 ± 8,3	248,5 ± 24,8	193,0 ± 18,3	152,4 ± 13,2	121,1 ± 10,0	97,2 ± 5,6
2 meses	174,7 ± 11,4	311,4 ± 26,8	242,5 ± 17,0	173,5 ± 10,7	137,4 ± 12,9	110,3 ± 7,6
3 meses	170,6 ± 5,0	312,5 ± 20,5	273,8 ± 18,1	200,1 ± 10,1	168 ± 10,8	132,0 ± 7,8
4 meses	171,4 ± 7,7	316,2 ± 34,9	241,0 ± 20,7	178,2 ± 9,0	143,0 ± 14,1	123,4 ± 8,7
5 meses	138,2 ± 10,4	268,8 ± 22,5	215,0 ± 18,8	169,2 ± 10,6	139,4 ± 17,7	114,5 ± 5,4
6 meses	160,8 ± 4,7	239,0 ± 23,6	211,6 ± 15,0	161,2 ± 9,7	127,2 ± 9,3	109,2 ± 5,8

APÊNDICE E- Tabela 5. Média das glicemias (mg/dL) e erro padrão dos animais submetidos à dieta DH frente ao desafio de glicose intraperitoneal nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Tempo (minutos)						
	Grupos					
	0	15	30	60	90	120
1 mês	143,4 ± 6,8	304,0 ± 22,6	282,7 ± 25,8	219,2 ± 25,0	115,8 ± 14,3	102,3 ± 13,4
2 meses	208,2 ± 11,6	388,8 ± 19,2	307,2 ± 28,7	266,4 ± 27,5	197,0 ± 18,0	182,3 ± 10,2
3 meses	215,4 ± 7,3	413,2 ± 15,2	377,4 ± 21,8	273,2 ± 22,8	171,2 ± 10,6	154,6 ± 9,8
4 meses	203,2 ± 13,9	351,5 ± 33,7	369,4 ± 42,6	292,7 ± 35,1	246,1 ± 44,1	223,2 ± 23,4
5 meses	202,0 ± 8,0	402,1 ± 17,0	402,1 ± 31,1	274,7 ± 24,5	237,7 ± 26,1	212,3 ± 21,2
6 meses	198,8 ± 5,3	328,0 ± 15,0	328,0 ± 21,7	273,5 ± 31,7	214,1 ± 22,9	197,8 ± 15,4

APÊNDICE F- Tabela 6. Área sob a curva (cm²) e erro padrão dos gráficos de teste de tolerância à glicose dos grupos CT e DH. Letras diferentes representam diferenças estatísticas (p<0,05) entre os grupos CT e DH ao longo dos 6 meses de avaliação.

	1 mês	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses
CT	15064±1168	16369±1051	20662±1012	18942±1323 ^a	17073±1178 ^a	16296±693 ^a
DH	20315±1535	22100±870	24189±1423	27584±2434 ^b	28402±1922 ^b	25211±1689 ^b

APÊNDICE G- Tabela 7. Concentração média de insulina plasmática (ng/mL) e erro padrão dos animais submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF). A representação por asteriscos evidenciam diferenças significativas entre os grupos DH aos 3 meses e # diferenças entre grupos CT e DH aos 3 e 4 meses (p<0,05). A letra a evidencia que não houve diferença na comparação entre grupos DH aos 4 meses (p>0,05).

	CT	DH	CTPLL	DHPLL	CTVEGF	DHVEGF
3 meses	0,87±0,02 [#]	2,99±0,51 ^{***}	0,71±0,11	0,59±0,14 [*]	1,31±0,14	0,98±0,12 [*]
4 meses	0,63±0,06 [#]	1,39±0,25 ^{a##}	0,63±0,10	0,72±0,11 ^a	0,95±0,14	2,42±0,63 ^a

APÊNDICE H- Tabela 8. Média das glicemias (mg/dL) e erro padrão dos animais submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) frente ao desafio de glicose intraperitoneal no tempo 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Grupos \ Tempo (minutos)						
	0	15	30	60	90	120
CTPLL 3 meses	157 ± 8	349 ± 16	302 ± 17	217 ± 21	189 ± 17	146 ± 18
DHPLL 3meses	117 ± 14	257 ± 34	284 ± 20	185 ± 13	160 ± 13	135 ± 16
CTVEGF 3meses	121 ± 6	329 ± 12	314 ± 20	225 ± 9	161 ± 7	146 ± 6
DHVEGF 3meses	114 ± 23	325 ± 61	339 ± 55	251 ± 56	159 ± 42	105 ± 15
CTPLL 4meses	162 ± 12	301 ± 4	282 ± 24	220 ± 25	194 ± 11	152 ± 13
DHPLL 4meses	136 ± 17	435 ± 26	379 ± 15	228 ± 26	187 ± 13	162 ± 6
CTVEGF 4meses	173 ± 8	345 ± 15	291 ± 15	213 ± 7	189 ± 3	175 ± 5
DHVEGF 4meses	178 ± 18	399 ± 32	390 ± 20	260 ± 14	196 ± 8	160 ± 10

APÊNDICE I- Tabela 9. Área sob a curva (cm^2) e erro padrão dos gráficos de teste de tolerância à glicose dos grupos submetidos à dieta controle (CT) e hipercalórica (DH) sem injeção de vetor, com vetor sem gene terapêutico (CTPLL e DHPLL), com vetor com gene VEGF (CTVEGF e DHVEGF) ao longo de 4 meses. Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos CT e DH ($p < 0,05$).

	CT	DH	CTPLL	DHPLL	CTVEGF	DHVEGF
3 meses	20662±1012	24189±1423	22592±988	19112±1512	22105±643	23334±4326
4 meses	18942±1323 ^a	27584±2434 ^b	21600±1471	25777±1586	22291±264 ^a	26891±1013 ^b