

UNIVERSIDADE PAULISTA

THAÍS ALVES BUENO

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA RESTAURA CAPACIDADE DE PRODUZIR
INSULINA EM LINFÓCITOS B-1 DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

SÃO PAULO

2025

THAÍS ALVES BUENO

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA RESTAURA CAPACIDADE DE PRODUZIR
INSULINA EM LINFÓCITOS B-1 DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva.

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva.

SÃO PAULO

2025

Bueno, Thais Alves.

Reprogramação metabólica restaura capacidade de produzir insulina em linfócitos B-1 de camundongos C57BL/6 / Thais Alves Bueno. - 2025.

60 f. : il. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2025.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva.

1. Diabetes. 2. Linfócitos B-1. 3. Reprogramação metabólica.
I. Saraiva, Anuska Marcelino Alvares (orientadora). II. Silva, Rodrigo Augusto Foganholi da (coorientador). III. Título.

THAÍS ALVES BUENO

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA RESTAURA CAPACIDADE DE PRODUZIR
INSULINA EM LINFÓCITOS B-1 DE CAMUNDONGOS C57BL/6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado(a) em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva
Universidade Paulista - UNIP

Prof^a. Dr^a Maria Anete Lallo
Universidade Paulista - UNIP

Prof. Dr. Rodrigo Nalio Ramos
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- FMUSP

Dedico meu trabalho a todos os envolvidos
nessa jornada, pois, sem eles, o que um dia
foi sonho, hoje não seria realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido, Gabriel Alves Dias, pelo apoio que me deu desde o início, estando comigo nos momentos mais delicados da minha vida acadêmica e pessoal.

Aos colegas e colaboradores do Centro de Pesquisa da UNIP, que me auxiliaram nos trabalhos, com a prática, ideias e conselhos. Em especial a Ana Luiza Gonçalves Valgas, que me deu apoio e esteve comigo desde o grupo onde iniciamos.

À minha orientadora Professora Dra Anuska Marcelino Alvares Saraiva, que, com tanta paciência, me ensinou do zero tudo que precisei para trilhar e alcançar meu objetivo. E ao professor Dr. Rodrigo Augusto Foganholi da Silva, que contribuiu com seu conhecimento, agregando valor a minha trajetória e me forneceu o material necessário.

À professora Dra Patrícia Xander Batista por abrir as portas do Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP Campus Diadema para a leitura das placas de qPCR.

Ao Dr. Wagner Luiz Batista por permitir a utilização do Núcleo de Microscopia Confocal da UNIFESP Campus Diadema, que nos concedeu o suporte com os experimentos de microscopia de fluorescência.

Ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante o período deste trabalho.

À Universidade Paulista pelo apoio e estrutura necessários para aulas e experimentos executados no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Centro de Pesquisa da UNIP.

É justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante.

Paulo Coelho

RESUMO

Dentre as doenças crônicas não transmissíveis, a Diabetes *mellitus* está entre as principais causas de morte no mundo e segue, ainda, sem cura. As terapias celulares têm sido exploradas a fim de repor a função perdida de células β pancreáticas. Foi demonstrada a capacidade de produção de insulina por linfócitos B-1 e estudos preliminares sugerem que existe uma possibilidade de restaurar essa característica em linfócitos B-1 comprometidos funcionalmente por reprogramação metabólica (RM). O presente estudo objetivou investigar a influência da RM na produção de insulina por linfócitos B-1 provenientes de camundongos suscetíveis ao desenvolvimento de diabetes por estreptozotocina. Deste modo, células peritoneais aderentes de camundongos C57BL/6 foram submetidas ao protocolo de RM para a produção de insulina, que consiste no cultivo das células em meio suplementado com Crotoxina, altas concentrações de glicose e Nicotinamida. Após a aplicação do protocolo, os linfócitos B-1 foram avaliados quanto ao metabolismo de glicose, pela captação de glicose e expressão de genes relacionados ao transporte e lise desse carboidrato e quanto à produção de insulina pela expressão gênica dos genes de insulina ou associados à sua produção e, ainda, foi verificada a presença de grânulos de insulina no citoplasma das células após a reprogramação celular. As células B-1 submetidas ao protocolo de RM demonstraram aumento da viabilidade celular e diminuição na expressão de 2-NBDG, ou seja, menor captação de glicose por essas células. Corroborando esse resultado, a expressão dos genes da enzima hexoquinase HK1, HK2 e do transportador de glicose Glut1 também estava diminuída comparado às células controle, que não receberam os estímulos de RM. A expressão dos genes de fosfofrutoquinase Pfkfb1 e Pfkfb3 não revelou diferenças e a expressão gênica de Cpt1b estava diminuída após a RM, sugerindo que a via lipolítica também não foi ativada. A avaliação epigenética demonstrou uma tendência à hipermetilação específica do gene Hk1a em linfócitos B-1 RM, comparados ao controle. Já os genes de insulina, Ins1 e Ins2 demonstraram expressão gênica relativa aumentada em linfócitos B-1 após o protocolo de RM. Também, a expressão gênica relativa de Neurod1, que codifica o fator de transcrição associado à expressão dos genes de insulina, também estava aumentada. A presença de grânulos de insulina no citoplasma das células, dada pela imunofluorescência, confirma esses dados. Em conjunto, esses resultados demonstram a eficiência da RM em restaurar e/ou otimizar a produção de insulina por linfócitos B-1, provavelmente de maneira independente da via glicolítica clássica, reforçando a viabilidade do estabelecimento de uma terapia celular a partir dessas células para o controle glicêmico de pacientes diabéticos e a necessidade de aprofundar as investigações sobre o papel dos linfócitos B-1 na manutenção e/ou promoção da normoglicemia.

Palavras chaves: diabetes; linfócitos B-1; reprogramação metabólica.

ABSTRACT

Among non-communicable chronic diseases, diabetes mellitus remains one of the leading causes of death worldwide and still has no cure. Cellular therapies have been explored as a strategy to restore the lost function of pancreatic β -cells. The capacity of B-1 lymphocytes to produce insulin has been demonstrated, and preliminary studies suggest the possibility of restoring this function in functionally impaired B-1 lymphocytes through metabolic reprogramming (MR). The present study aimed to investigate the influence of MR on insulin production by B-1 lymphocytes derived from mice susceptible to the development of streptozotocin-induced diabetes. Then, adherent peritoneal cells from C57BL/6 mice were subjected to an MR protocol for insulin production, consisting of culturing the cells in medium supplemented with crotoxin, high glucose concentrations, and Nicotinamide. After the protocol was applied, B-1 lymphocytes were evaluated for glucose metabolism through glucose uptake and the expression of genes involved in glucose transport and breakdown, as well as for insulin production through the gene expression of insulin or insulin-related genes. The presence of insulin granules in the cytoplasm of the reprogrammed cells was also assessed. B-1 cells subjected to the MR protocol showed increased cell viability and decreased 2-NBDG expression, indicating reduced glucose uptake. The expression of the hexokinase enzymes HK1, HK2, and the glucose transporter Glut1 was also reduced compared to control cells that were not exposed to MR stimuli. The expression of phosphofructokinase genes Pfkfb1 and Pfkfb3 showed no significant differences, while Cpt1b gene expression was reduced after MR, suggesting that the lipolytic pathway was not activated either. Epigenetic analysis indicated a trend toward specific hypermethylation of the Hk1 gene in MR B-1 lymphocytes compared to controls. In contrast, the insulin genes Ins1 and Ins2 showed increased expression in B-1 lymphocytes after MR. The expression of Neurod1, which encodes a transcription factor associated with insulin gene regulation, was also elevated. The presence of insulin granules in the cytoplasm, as observed by immunofluorescence, corroborated these findings. Altogether, these results demonstrate the effectiveness of MR in restoring and/or enhancing insulin production by B-1 lymphocytes, likely via a mechanism independent of the classical glycolytic pathway. These findings reinforce the feasibility of developing a B-1 cell-based therapy for glycemic control in diabetic patients and highlight the requirement for further investigation about the role of B-1 lymphocytes in maintaining and/or promoting normoglycemia.

Keywords: diabetes; B-1 lymphocytes; metabolic reprogramming.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Critérios para o diagnóstico de diabetes.	22
Figura 2 –	Representação gráfica do delineamento da pesquisa.	29
Figura 3 –	Esquema do tratamento do DNA.	34
Figura 4 –	Viabilidade de células B-1 provenientes de cultura de células peritoneais aderentes cultivadas com A) meio R10 (Controle) ou B) suplementado para a reprogramação metabólica (RM) com 1,2 µg/ml de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, para a fase de expansão e Nicotinamida a 10 mM e 30 mM de glicose por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Foram consideradas células viáveis aquelas negativas para a marcação com iodeto de propídio. C) Percentual de viabilidade dos grupos controle e RM. Teste t Student com pós teste de Mann-Whitney, *p<0,05 (N=4).	36
Figura 5 –	Determinação da capacidade de captação de glicose por linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo com 1,2 µg/ml de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina ou amostras do grupo controle cultivadas com meio R10. A) Histogramas da expressão de 2-NBDG em células viáveis. B) Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de 2-NBDG que foi transportado para o interior de células B-1. Teste t Student com pós teste de Mann-Whitney não demonstrou significância (N=4).	37
Figura 6 –	Análise da expressão gênica relativa dos genes de hexoquinase A) Hk1 e B) Hk2 e C) Slc2a1, que codifica o transportador de	

glicose Glut-1 por Taqman® qPCR, em linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (controle) ou submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo com 1,2 µg/ml de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Teste t Student com pós teste de Mann- Whitney não demonstrou significância (N=3). 38

Figura 7 – Análise da expressão gênica de Fofosfrutoquinase A) Pfk1 e B) Pfk1m e da Carnitina Palmitoil transferase C) Cpt1a e D) Cpt1b, por Taqman ® qPCR, em linfócitos B-1 cultivados com R10 (Controle) ou submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo ou não com 1,2 µg/mL de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Teste t Student com pós teste de Mann- Whitney não demonstrou significância (N=3). 39

Figura 8 – Análise da expressão dos genes de insulina A) Ins1, B) Ins2 e de C) Neuro D1, que codifica o fator de transcrição associado à expressão de insulina, por Taqman ® qPCR, em linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo ou não com 1,2 µg/mL de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Teste t Student com pós teste de Mann- Whitney não demonstrou significância (N=3). 40

Figura 9 – Análise epigenética do padrão de metilação específica da ilha CpGs 2 que codifica a expressão do gene Hk1 pelo percentual de A) metilação 5-meC, B) hidroximetilação 5-hmeC e C) a razão entre 5-meC/5-hmeC, por qPCR, em linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos ao protocolo de

reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo com 1,2 µg/mL de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Teste t Student com pós teste de Mann-Whitney não demonstrou significância (N=3). 40

Figura 10– Fotomicrografias de fluorescência para análise da presença de grânulos de insulina no citoplasma de linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos à reprogramação metabólica (RM) - cultivo suplementado com 1,2 µg/mL de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina, por imuno-marcação de insulina. Contraste de fase= fotomicrografia em campo de luz, DAPI (em azul) = núcleo celular, Insulina (em verde) = insulina. Aumento 100x. 41

Figura 11 – Fotomicrografias de fluorescência para análise da presença de grânulos de insulina no citoplasma de linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos à reprogramação metabólica (RM) - cultivo suplementado com 1,2 µg/mL de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina, por imuno-marcação de insulina. Contraste de fase= fotomicrografia em campo de luz, DAPI (em azul) = núcleo celular, Insulina (em verde) = insulina. Aumento 1000x. 42

LISTA DE ABREVIATURAS

2-NBDG	(2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose)
5-hmeC	5-hidroximetilcitosina
5-meC	5-metilcitosina
β	Beta
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cDNA	DNA complementar
ciPSCs	Células somáticas humanas para PSCs induzidas quimicamente
CO₂	Gás carbônico
CPA	Cultura de células peritoneais aderentes
CTX	Crotoxina
CTM	Células-tronco mesenquimais
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM 1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM 2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESCs	Células-tronco embrionárias
Gck	Glicoquinase
Gibco™	RPMI livre de glicose
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
Glut1	<i>Glucose transporter 1</i>
Glut2	<i>Glucose transporter 2</i>
gDNA	DNA genômico
GJ	Glicemia plasmática de jejum
HbA1c	Hemoglobina glicada
HG 20mM	<i>High Glucose 20mM</i>
HG 30mM	<i>High Glucose 30mM</i>
H₂O	Água
Hk1	Hexoquinase 1
Hk2	Hexoquinase 2
hPSC	Células-tronco pluripotentes humanas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC	Índice de massa corpórea
Ins1	Gene de insulina 1
Ins2	Gene de insulina 2
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
Neuro D1	<i>Neuronal Differentiation 1</i>
Nupens/USP	Núcleo de Pesquisas Epidemiológicas em Nutrição e Saúde da Universidade de São Paulo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDX1	<i>Pancreatic and Duodenal Homeobox 1</i>
PGN	Solução de 0,2% de gelatina e 0,1% de azida em PBS
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PSCs	Células-tronco pluripotentes
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
R10	Meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina e β -mercaptoetanol
RNA	Ácido ribonucleico
RM	Reprogramação metabólica
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SGLT2	Cotransportador de sódio-glicose 2
Slc2a1	Gene da proteína Glut1 (<i>Solute Carrier Family 2 Member 1</i>)
Slc2a2	Gene da proteína Glut2 (<i>Solute Carrier Family 2 Member 2</i>)
STZ	Estreptozotocina
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T4-BGT	T4- β -glicosiltransferase
TTGO	Teste de tolerância de glicose oral
UDP-Glc	Glicose da difosfoglicose de uridina
XID	Doença de Imunodeficiência Ligada ao X (<i>X-Linked Immunodeficiency Disease</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

Δ	Delta
$>$	Maior
$<$	Menor
β	Beta
CH_3	Grupo Metil
H_2O	Água
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
p	Significância estatística
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
®	Marca Registrada (<i>Registered Trademark</i>)
™	Marca Comercial (<i>Trade Mark</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Delineamento experimental	29
3.2	Animais	29
3.3	Crotoxina	30
3.4	Cultura de células peritoneais aderentes (CPA)	31
3.5	Protocolo de reprogramação metabólica (RM)	31
3.6	Viabilidade e captação de glicose	31
3.7	Marcação de insulina pela técnica de imunofluorescência	32
3.8	Avaliação da expressão relativa de genes associados ao metabolismo de glicose e à produção de insulina	32
3.9	Avaliação epigenética	33
3.10	Estatística	35
4	RESULTADOS.....	36
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	ANEXO A- APROVAÇÃO DA CEUA	59
	ANEXO B – EMENDA DA CEUA	60

1 INTRODUÇÃO

Doenças crônicas não transmissíveis representam um crescente desafio global em saúde pública, destacando-se entre as principais causas de morte no mundo. Entre essas doenças, destaca-se o Diabetes *mellitus* (DM), que apresenta diferentes formas clínicas: DM Tipo 1 (DM1), DM Tipo 2 (DM2), Diabetes gestacional (DMG), caracterizada pela hiperglicemia. (SBD, 2024).

O DM1 é a forma mais prevalente da doença em crianças e adultos jovens, embora possa manifestar-se em indivíduos de qualquer faixa etária, sua etiologia causada por um processo autoimune no qual o sistema imunológico do corpo ataca as células β produtoras de insulina no pâncreas. O Brasil é um dos países com alta incidência da doença, figurando entre as nações com maior prevalência de diabetes, especialmente entre 0-19 anos da patologia DM 1. Registraram-se aproximadamente 600 mil casos no país em 2022, com cerca de 200 mil óbitos no mesmo ano. As projeções indicam que o número de casos poderá alcançar 1,8 milhão até 2040, representando um aumento de 2,4 vezes em relação ao ano 2000 (VIGITEL, 2023; SBD, 2022; IDF, 2025).

No cenário global, o número de indivíduos com DM atingiu 830 milhões em 2022, superando as estimativas anteriores, com cerca de 90% dos casos sendo do tipo 2 (WHO, 2024; MAGLIANO *et al.*, 2021).

Diversos fatores de risco contribuem para o desenvolvimento e agravamento do diabetes, incluindo tabagismo, alimentação inadequada, sedentarismo, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, IMC elevado (sobrepeso e obesidade) e dieta pobre em fibras e rica em açúcares e carnes (WHO, 2022).

Após o diagnóstico clínico, pessoas com diabetes devem se adequar ao tratamento, pois a ausência deste pode resultar em complicações agudas e crônicas graves, que podem levar à morte precoce ou a incapacidades severas (IDF, 2025). As metas de controle glicêmico levam em consideração se o paciente é criança, adulto ou idoso, sendo que valores normais de glicemia em jejum para adultos não gestantes: 70-99 mg/dL; valores normais de HbA1c- parâmetro que reflete os níveis de glicose nos últimos 2 ou 3 meses- para adultos não gestantes < 5,7% (SBD, 2024).

O IDF (2025) descreve o critério diagnóstico para DM. A partir dos dados abaixo (com base nas informações dispostas na Figura 1), dando destaque no critério diagnóstico com um ou mais critérios para diabetes- glicemia plasmática em jejum >

ou igual 126 mg/dl, Teste de tolerância de glicose (TTGO) > ou igual 200 mg/dl, Hemoglobina glicada > ou igual a 6.5% e glicemia em horário aleatório > ou igual a 200 mg/dl- critério diagnóstico para glicose diminuída com dois critérios- glicemia plasmática em jejum < ou igual 126 mg/dl, Teste de tolerância de glicose (TTGO) > ou igual 140-199 mg/dl- critério diagnóstico para glicose de jejum prejudicada com dois critérios ou apenas o primeiro- glicemia plasmática em jejum entre 110-125 mg/dl, Teste de tolerância de glicose (TTGO) < 140 mg/dl.



Figura 1 – Critérios para o diagnóstico de diabetes.

Fonte: IDF (2025), adaptado.

O tratamento do diabetes envolve estratégias farmacológicas e não farmacológicas (DA CUNHA *et al.*, 2020). Medicamentos amplamente utilizados no tratamento de DM 2 incluem, as biguanidas como a Metformina, que reduz a glicemia através da melhora da sensibilidade à insulina no fígado reduzindo a produção hepática de glicose. Inibidores do co-transportador sódio-glicose 2 (SGLT2), como Dapagliflozin, Empagliflozina e Canagliflozina, que além do controle glicêmico oferecem proteção cardiovascular adicional através da absorção de glicose e sódio

no túbulo proximal na inibição do SGLT2, levando à glicosúria. Agonistas do Receptor do GLP-1 sendo eles Liraglutida, Dulaglutida, Semaglutida que atua reduzindo esvaziamento gástrico, estabilizando a saciedade e reduzindo o glucagon. Co-agonistas do receptor de GIP/GLP-1 denominado Tirzepatida que atua de forma semelhante ao descrito anteriormente aumentando a secreção de insulina dependente de glicose. Glitazonas/ Tiazolinedionas sendo a Pioglitazona responsável pelo aumento da sensibilidade à insulina em músculo, adipócito e hepatócito. Sulfonilureias como Gliclazida, Glimepirida, Glibenclamida que promove a secreção de insulina pelas células beta do pâncreas ao se ligar ao receptor SUR-1, o que aumenta o influxo de íons cálcio e, conseqüentemente, intensifica a liberação de insulina. Inibidores da alfa-glicosidase sendo a Acarbose um inibidor da alfa-glicosidase, enzima localizada na borda em escova do trato gastrointestinal, que provoca o atraso na absorção de carboidratos. (SBD, 2024).

Ainda na classe medicamentosa a insulinoterapia é um método de tratamento para a DM 2 em estágios avançados, mas é preferentemente utilizado na DM 1, através de análogos de insulina rápida (Aspart, Lispro), Insulina NPH, Insulina de longa ação (Glargina, Detemir, Degludeca), ação que visa mimetizar a insulina como no organismo do indivíduo não portador de diabetes. A estratégia utilizada é a terapia de administração injetável por bolus, onde uma única dose concentrada é infundida geralmente no subcutâneo do paciente; é utilizada de maneira precoce e consiste em infundir no organismo em dosagens e aplicações pré definidas ou com a bomba de infusão de insulina (SBD, 2024).

Efeitos colaterais, como náuseas e vômitos, entre outros estão presentes nessas terapias medicamentosas (SBD, 2024).

Terapias não medicamentosas são fundamentais, especialmente a prática regular de exercício físico e intervenções dietéticas que visam controle glicêmico, redução do peso corporal e prevenção de complicações a longo prazo. O exercício físico melhora a sensibilidade à insulina, diminui a hiperinsulinemia, aumenta o recrutamento muscular da glicose, melhora o perfil de lipídios e a hipertensão arterial, contribui para a perda de peso, sendo uma alternativa no controle da doença DM 1 e DM 2 (ADA, 2000).

Na terapia cirúrgica, a cirurgia bariátrica, também é uma intervenção médica possível no tratamento da diabetes tipo 2 (DM2), em pacientes com um IMC elevado. O tratamento atua na perda de peso e como consequência, regula os níveis glicêmicos,

dentre os modos mais comuns estão o *by-pass* gástrico - técnica em que o estômago é reduzido a um pequeno reservatório, promovendo menor absorção de calorias e maior saciedade- e a gastrectomia vertical- procedimento cirúrgico que diminui o tamanho desse órgão. (SCHAUER *et al.*, 2017).

Mais recentemente, as células-tronco pluripotentes (PSCs) mostram um potencial notável como uma fonte celular ilimitada para terapias de substituição celular, como transplante de ilhotas, devido à sua capacidade de se auto-renovar e se diferenciar em tipos de células funcionais. Os primeiros protocolos de diferenciação se concentraram na derivação de células tipo β produtoras de insulina *in vitro* a partir de células-tronco embrionárias (ESCs), posteriores se concentraram na obtenção eficiente de células tipo β com melhor secreção de insulina, resultando na geração de células β derivadas de células-tronco pluripotentes humanas (hPSC). Recentemente, foi desenvolvido com sucesso células somáticas humanas induzidas quimicamente (CiPSCs), a partir dessas, foram diferenciadas células β produtoras de insulina e transplantadas abaixo da musculatura abdominal de uma paciente de DM 1, conferindo controle de glicemia e hemoglobina glicada (WANG *et al.*, 2024).

Na pesquisa básica experimental, Alvares-Saraiva e seus colaboradores demonstraram que a transferência adotiva de linfócitos B-1 pode conferir proteção contra o desenvolvimento de DM em camundongos suscetíveis. No estudo, foi induzido diabetes em camundongos *X-Linked Immunodeficiency Disease* (XID) (deficientes em linfócitos B-1 e suscetíveis à indução de diabetes) com a estreptozotocina (STZ). A transferência de células B-1 purificadas de camundongos saudáveis, para esses camundongos, estabeleceu efeito de proteção nos animais contra o desenvolvimento de diabetes. Adicionalmente, os dados demonstraram a presença de grânulos de insulina no citoplasma das células, algumas em estágio de diferenciação celular com alterações morfológicas e fenotípicas, com perda da expressão de marcadores linfoides, além da expressão relativa do gene de insulina 1 (*Ins1*). De maior relevância neste trabalho foi pontuado que os camundongos XID com transferência adotiva de células B-1 purificadas, em qualquer estágio de indução de STZ, não desenvolveram diabetes, fornecendo proteção duradoura (ALVARES-SARAIVA *et al.*, 2015).

Descritas pela primeira vez na década de 80, as células B-1 são diferentes dos linfócitos B convencionais em relação ao fenótipo, morfologia, ontogenia, distribuição tecidual e função (MATTOS *et al.*, 2024). A compreensão ao que diz respeito ao

comportamento dessa célula segue em constante evolução (ANSEL *et al.*, 2002). São preferencialmente agrupadas em áreas mesenquimais relacionadas ao intestino, devido a seu comportamento favorável em adaptação, podendo migrar para demais áreas, não sendo restrita somente a ação de produção de anticorpos. (FÖRSTER *et al.*, 1991).

Os linfócitos B-1 são subtipos de linfócitos B, que possuem subdivisões em B-1a e B-1b, devido a suas características fenotípicas, como a presença da molécula CD5, respectivamente (ALUGUPALLI *et al.*, 2004; HAAS *et al.*, 2005). Linfócitos B-1 apresentam alta plasticidade funcional e podem secretar anticorpos com uma característica de reconhecimento sobre os antígenos com alto peso molecular (HAAS *et al.*, 2005), podem atuar e auxiliar na resposta imune inata, influenciando o perfil inflamatório de macrófagos (PEREIRA *et al.*, 2019) ou adaptativa, influenciando a resposta de linfócitos T CD8 no contexto de infecções fúngicas (LANGANKE DOS SANTOS *et al.*, 2018). Ainda, têm-se discutido seu papel pluripotente e já foi demonstrada sua capacidade de se diferenciar num fagócito mononuclear semelhante a macrófagos (ALMEIDA *et al.*, 2001) com rigoroso rearranjo gênico durante a diferenciação (POPI *et al.*, 2009). Também já foi demonstrada sua capacidade de se diferenciar em uma célula semelhante a osteoclasto e participar de processos de remodelação óssea (PUGLIESE *et al.*, 2012).

Apesar da capacidade multifuncional dos linfócitos B-1, os estudos mencionados têm demonstrado que essas células respondem ao meio em que está inserida e, também, linfócitos B-1 de linhagens de camundongos distintos podem apresentar diferença na expressão de insulina. Dados prévios de nosso laboratório demonstraram que linfócitos B-1 provenientes de camundongos C57BL/6 apresentam menor capacidade de produzir insulina, especialmente após o tratamento com STZ (dados não publicados). Nós especulamos que o potencial de produção de insulina pelas células B-1 possa estar associado à suscetibilidade ou resistência à indução de diabetes pelo tratamento com STZ.

Estudos têm demonstrado que linhagens de camundongos apresentam diferentes sensibilidades à ação de STZ. Para a linhagem de camundongo C57BL/6, múltiplas doses de 40 mg/Kg são utilizadas para induzir o diabetes *mellitus* tipo 1 (KU *et al.*, 2009). Já camundongos BALB/c são resistentes à mesma dose e, para induzir diabetes nesses animais, são necessárias múltiplas doses de 80 mg/Kg, ou seja, o dobro da dose utilizada em C57BL/6 (NAKAMURA *et al.*, 2013).

Pesquisadores têm especulado o motivo dessas diferenças desde a década de 70 e os esforços para sanar essa questão têm se dado no âmbito genético. Rossini e seus colaboradores acreditavam que a maior suscetibilidade de camundongos C57BL/6 à ação da droga devia-se aos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), no entanto, o tratamento com STZ não tornou diabético camundongos BALB/c e DBA/J, que apresentam o haplótipo H-2d similar ao C57BL/6, concluindo que os genes do MHC podem não ser os únicos envolvidos no quadro de hiperglicemia e hipoinsulinemia nesse modelo (ROSSINI *et al.*, 1977). Mais tarde, outros estudos confirmaram esses achados (WOLF *et al.*, 1984; KAKU *et al.*, 1989). Kaku e seus colaboradores demonstraram, ainda, que apenas um gene poderia estar associado a essa suscetibilidade e, também, essa característica estaria ligada a um caráter recessivo (KAKU *et al.*, 1989).

Já Cardinal e seus colaboradores evidenciaram que o acúmulo de metabólitos da STZ no tecido pancreático de camundongos C57BL/6 quando comparado com camundongos BALB/c estaria relacionado à maior suscetibilidade dessa linhagem ao tratamento com STZ. Os autores sugerem que o transporte da STZ para as células β pancreáticas ou metabolismo de óxido nítrico não são responsáveis pela diferença de sensibilidade à STZ presente entre as linhagens estudadas (CARDINAL *et al.*, 1998).

Sendo a epigenética uma possível influência devido a ser o ramo da Biologia que investiga mudanças no fenótipo que não decorrem de modificações na sequência do DNA. Essas mudanças envolvem marcações químicas resultantes das interações do organismo com seu ambiente, as quais influenciam a expressão das características e podem ser transmitidas às gerações seguintes (QUARESMA *et al.*, 2022)

Temos demonstrado que alterações metabólicas podem estar associadas a menor ou maior capacidade de produção de insulina por linfócitos B-1. Neste sentido, foi estabelecido um protocolo capaz de melhorar as condições de sobrevivência e proliferação dessas células *in vitro* e, ainda, manter sua diferenciação em células produtoras de insulina (MELO *et al.*, 2021). Inicialmente, foram testados, individualmente, estímulos capazes de modificar as células funcional e metabolicamente. Foi utilizada a crotoxina (CTX), componente presente no veneno da cascavel que, apesar da capacidade de induzir paralisia muscular prolongada, foram evidenciadas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antitumorais e imunomoduladoras (FERNANDES, 2017). A nicotinamida, forma amida da vitamina B3 — que por sua vez é precursora do β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺),

fundamental para diversas reações de oxidação e redução — tem sido amplamente empregada em tratamentos clínicos devido à sua capacidade de regular a fisiologia celular (MENG *et al.*, 2021). De modo geral, o meio suplementado com crotoxina ou 20mM de glicose promoveu aumento da capacidade proliferativa e maior viabilidade dos linfócitos B-1 em cultura de células peritoneais aderentes, a nicotinamida e concentrações de glicose em 30mM promoveram aumento nos grânulos de insulina e localização desse grânulo próximo à membrana plasmática (artigo em preparação).

A partir desses resultados, foi desenhado um protocolo, utilizando a combinação desses estímulos, que consiste em manter as células peritoneais aderentes em meio R10 contendo CTX e 20mM de glicose (HG 20mM), sendo o estímulo eficaz na proliferação e viabilidade celular. Então, o meio é trocado por meio contendo nicotinamida e 30mM de glicose (HG 30mM), para otimizar a produção de insulina. A cultura termina no 6º dia e esses resultados foram validados em murinos da linhagem BALB/c, que são resistentes ao tratamento com STZ e já demonstram a capacidade basal de produzir insulina em culturas de células peritoneais aderentes (MELO *et al.*, 2021; ALVARES-SARAIVA *et al.*, 2015).

No presente estudo, pretendemos investigar se o protocolo é capaz de reprogramar as funções de linfócitos B-1 provenientes de camundongos da linhagem C57BL/6, melhorando sua capacidade de produzir insulina *in vitro* e, mais especificamente, compreender o metabolismo e a maquinaria gênica envolvidos neste contexto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar o protocolo de reprogramação metabólica para modular a produção de insulina por linfócitos B-1 provenientes de camundongos C57BL/6, bem como identificar alterações metabólicas e epigenéticas associadas à produção de insulina em linfócitos B-1.

2.2 Objetivos específicos

- Submeter células peritoneais aderentes obtidas de camundongos C57BL/6 ao protocolo de reprogramação metabólica para a produção de insulina pelos linfócitos B-1;
- Avaliar a captação de glicose pelas células B-1 reprogramadas, por meio da visualização de 2-NBDG;
- Avaliar a expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose e ácidos graxos e à produção de insulina, pela expressão gênica dos genes associados ao transporte e lise da glicose, gene de insulina ou genes associados à sua produção;
- Avaliar alterações epigenéticas pela metilação específica das regiões promotoras de genes associados ao metabolismo de glicose.
- Identificar a presença de grânulos de insulina no citoplasma das células após a reprogramação celular por meio de imunofluorescência;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Células peritoneais aderentes (CPA) foram coletadas de camundongos da linhagem C57BL/6, por lavado peritoneal e, posteriormente, submetidas ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), conforme será elucidado adiante. De modo geral, as células foram estimuladas *in vitro* com altas concentrações de glicose, crotoxina e nicotinamida e, pós 6 dias, foram coletadas para avaliação de viabilidade e captação de glicose, marcação de insulina pela técnica de imunofluorescência, avaliação da expressão relativa de genes associados ao metabolismo de glicose, ácidos graxos e à produção de insulina e avaliação do padrão de metilação específica.

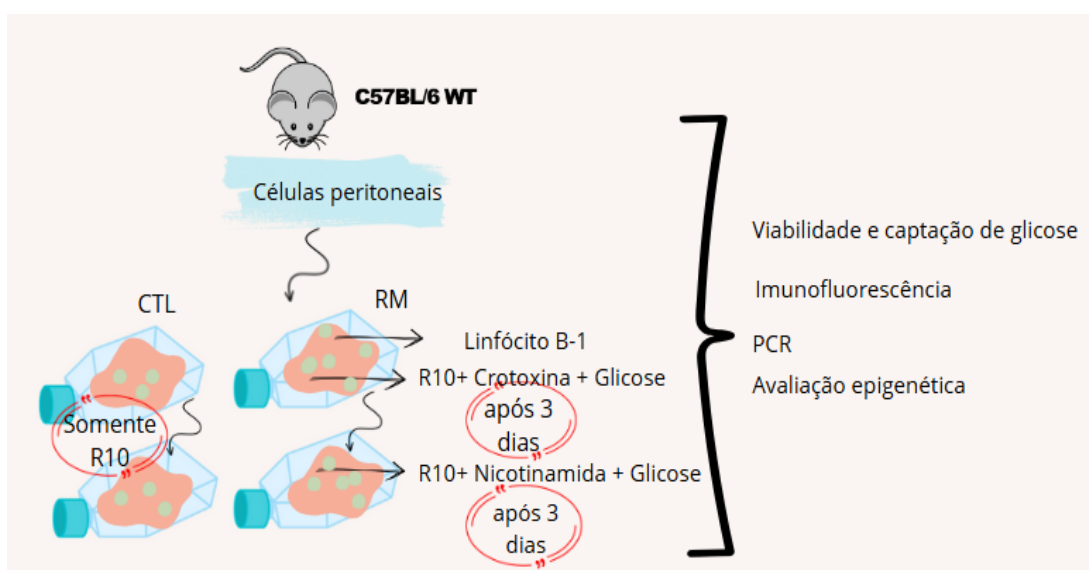


Figura 2 – Representação gráfica do delineamento da pesquisa.

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, machos, de 8 e 12 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista, pelo período de, no mínimo, dois dias antes de serem utilizados nos experimentos, com livre acesso a água e ração. Os camundongos foram eutanasiados

pelo aprofundamento anestésico com isoflurano. Todos os procedimentos experimentais aqui descritos foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan CEUA IB N° 6526280824 em 29/10/2024 e da Universidade Paulista, CEUA N° 9315220124 em 02/05/2024, com emenda em 09/02/2025.

3.3 Crotoxina

A purificação do complexo CTX, a partir do veneno bruto foi realizada segundo o método descrito por Rangel e colaboradores (2004). Uma alíquota contendo 10 mg do veneno foi ressuspensa em 2 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,3) e centrifugada a 10.000 g por 10 minutos (Ultra-Centrífuga Eppendorf) para a remoção do material insolúvel. O sobrenadante obtido foi submetido à cromatografia de troca aniônica em uma coluna MONO-Q HR 5/5 de 5 ml, em sistema FPLC (fast-performance liquid chromatography, Pharmacia), em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,3, para o isolamento da CTX. As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas por um gradiente linear de 0 a 1 M NaCl, tamponado com o tampão de equilíbrio. Foram obtidos 3 picos principais (Picos I, II e III), onde o Pico II corresponde à eluição da CTX. Frações de 1 ml por tubo foram coletadas e a eluição foi acompanhada pela leitura da absorbância a 280 nm. As frações contendo a CTX foram testadas quanto à homogeneidade por eletroforese em gel de poliacrilamida e a atividade de fosfolipase A2 foi analisada em substrato cromogênico. Os tubos correspondentes a CTX purificada foram reunidos e concentrados em coluna Vivaspin e a sua concentração foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A análise da pureza do complexo CTX foi realizada submetendo as amostras à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme descrito por (Laemmli, 1970). De modo geral, as amostras do veneno e da CTX foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6.9, contendo 2,5% (p/v) de SDS, 20% de glicerol, 1 mM de PMSF, 4 mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos. O material foi aplicado em gel de empilhamento 4% e submetido à corrente de 20 mA por 2 horas. Após a corrida o gel foi corado por comassie blue. Amostras de CTX foram também analisadas quanto ao conteúdo de endotoxina (LPS) em ensaio imunoenzimático de *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) (Cambrex/Lonza), realizado no Laboratório de Microbiologia do controle de qualidade do Centro Bioindustrial do

Instituto Butantan. As alíquotas de CTX consideradas isentas de contaminantes foram estocadas a -20°C até o momento do uso.

A crotoxina purificada foi gentilmente cedida pela Dra Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni, pesquisadora do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

3.4 Cultura de células peritoneais aderentes (CPA)

Células peritoneais de camundongos foram obtidas por lavagens sucessivas com 2 ml de meio RPMI (Sigma, St Louis, MO, USA) e cultivadas por 40 minutos, a 37°C, em estufa com 5% de gás carbônico (CO₂). Após incubação, o sobrenadante, contendo as células não aderentes, foi recolhido e descartado. Às células peritoneais aderentes foi adicionado meio R10 (RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina 200 nm e 0,1% β-mercaptoetanol 100 nm), constituindo o controle experimental ou foi iniciado o protocolo de RM.

3.5 Protocolo de reprogramação metabólica (RM)

As células submetidas à RM foram cultivadas por 6 dias, na concentração 1×10^6 células/mL. Inicialmente, foi acrescido meio R10 contendo 1,2 µg/mL de CTX e 20mM de glicose, por 3 dias para promover a proliferação de células B-1 – constituindo a Fase de Expansão. No 3º dia, o sobrenadante enriquecido em linfócitos B-1 que se soltam da placa, foi recolhido, centrifugado a 2000 rpm por 5 min, descartado e o *pellet* celular ressuspensionado em meio R10 contendo 10nM/mL de Nicotinamida (Sigma Aldrich) e 30mM de glicose, para otimização da produção de insulina, e as células recultivadas sobre a porção aderente na mesma placa ou garrafa – Fase de diferenciação. No 6º dia, o sobrenadante enriquecido de células B-1 produtoras de insulina foi recolhido e centrifugado a 2000 rpm por 5 min à 4°C e as células submetidas às análises, conforme descrito nos próximos itens.

3.6 Viabilidade e captação de glicose

Foram plaqueadas $0,5 \times 10^6$ CPA, em placas de 24 poços. As células foram estimuladas conforme previamente descrito. Então, a porção suspensa foi retirada da placa, centrifugada e, as células, lavadas em *Phosphate buffered saline* (PBS) para

remoção do meio de cultura e plaqueadas em placas de 24 poços com meio RPMI livre de glicose (Gibco™), contendo um análogo fluorescente da glicose, o 2-NBDG, na concentração de 100 µg/ml e incubadas por 2 horas. Após a incubação, as células foram recolhidas, lavadas em PBS e suspensas em 200 µl de Cell-based Assay Buffer, contido no Glucose Uptake Cell-based Assay kit (Cayman, Michigan, USA). Para exclusão das células mortas e determinação da viabilidade celular, foi acrescentado iodo de propídio em todas as amostras, na proporção de 1:1000. A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Biosciences) e a avaliação da mediana de fluorescência de 2-NBDG foi determinada em Software de análise Flowjo 10.8.1 (BD Biosciences).

3.7 Marcação de insulina pela técnica de imunofluorescência

Células peritoneais aderentes foram cultivadas sobre lamínulas de vidro redondas de 13mm sob as mesmas condições supracitadas. No 6º dia, as células B-1 da porção não aderente foram colhidas e fixadas em lâminas sobre uma camada de polilisina por 30 minutos. As lamínulas contendo CPAs ou as lâminas contendo os linfócitos B-1 foram mergulhadas em álcool metílico P.A., por 30 minutos em temperatura ambiente, para fixação das células. Em seguida, o metanol foi removido e as células foram hidratadas com lavagens em PBS. As ligações não específicas foram bloqueadas com solução PGN (0,2% de gelatina e 0,1% de azida em PBS) por 1 hora e, então, a membrana plasmática foi permeabilizada adicionando solução PGN contendo 0,2% de saponina por 30 minutos. As células foram incubadas com anticorpo primário anti-insulina conjugado à fluorescência Alexa Fluor 488 (C27C9, *Cell Signaling Technology*), overnight à 4°C, protegidas da luz. As células foram, então, lavadas em PBS e montadas em *DAPI- Fluoroshield™* (Sigma-Aldrich) e analisadas sob microscópio de fluorescência confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems) alocado na UNIFESP - Campus de Diadema.

3.8 Avaliação da expressão relativa de genes associados ao metabolismo de glicose e à produção de insulina

Foram colhidas das culturas já mencionadas 2×10^6 células B-1 que foram, então, submetidas à extração de ácido ribonucleico (RNA) e, posteriormente, à análise

por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) da expressão relativa dos genes de insulina: *Ins1* e *Ins2*, genes dos transportadores de glicose: *Slc2a1* (*Glut1*) e *Slc2a2* (*Glut2*), genes da Hexokinase: *Hk1* e *Hk2*, gene da Glicokinase: *Gck*, gene dos fatores de transcrição: *Pancreatic And Duodenal Homeobox 1* (*PDX1*) e *Neuronal Differentiation 1* (*Neuro D1*). O *pellet* celular foi submetido a tampão de lise contido no *kit ilustra RNAspin Mini Isolation Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e posteriormente, o RNA foi extraído seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas em *Nanodrop* (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA). Somente RNA sem contaminação com ácido desoxirribonucléico (DNA) foi usado para a síntese do DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA foi feita a partir de 60 ng de RNA purificado usando *Superscript™ VILOTM cDNA Synthesis Kit* (Life Technologies). Foram utilizadas sondas e primers *Taqman™* pré-fabricados: *Ins1-Mm01950294_s1*; *Ins2-Mm00731595_gH*; *Glut-1Slc2a1-Mm00441480_m1*; *Glut-2Slc2a2-Mm00446224_m1*; *Gck-Mm00439129_m1*; *Hk1-Mm00439344_m1* e *Hk2-Mm00443385_m1*; *Pdx1-Mm00435565_m1*; *Neurod1-Mm01946604_s1*; *Rplp0ARBP-Mm00725448_s1* (Thermo Fisher Scientific). Os níveis de expressão gênica foram avaliados por qPCR usando *TaqMan™ Gene Expression Assay* (FAM) (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, UK). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *StepOnePlus* (Applied Biosystems, Life Technology) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A expressão relativa foi calculada com base no valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo que os valores de C_t dos genes de interesse foram normalizados em relação aos C_t do gene de referência ARBP. Posteriormente, todas as amostras foram normalizadas pela média de ΔC_t do mesmo gene, a partir das amostras controle.

3.9 Avaliação epigenética

Obtenção do DNA: Para obtenção das amostras de DNA genômico (gDNA) as estruturas previamente coletadas e armazenadas em Bio freezer (-80) foram homogeneizadas em tampão de extração (10 mM de Tris pH 3.0; 0,5% de SDS, 5 mM de EDTA) e digeridas com proteínas e K(20mg/mL) por 16h a 56°C. Em seguida o DNA será isolado pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (DOS SANTOS *et al.*, 2017). A quantidade e pureza do gDNA extraído serão estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/280 ($\geq 1,0$)

(NanoDrop 2000, Thermo Scientific Uniscience).

Tratamento do DNA: Cada amostra de gDNA será dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e incubados a 37°C por 2h com 1X NEbuffer, 40 mM de glicose UDP e 1 unidade da enzima T4-β-glicosiltransferase (T4-BGT) em reação com volume final de 20 µl. Esta enzima transfere especificamente a porção de glicose da difosfoglicose de uridina (UDP-Glc) para 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) pela reação de glicosilação, produzindo o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina, o qual bloqueia especificamente a atividade de endonuclease *MspI* e faz com que ela reconheça apenas as sequências CCGG metiladas (5-meC) e não metiladas, mantendo íntegras as regiões CCGG hidroximetilcitosina (5-hmeC). Após a inativação da enzima T4-BGT por incubação a 65°C por 15 min, as amostras serão digeridas com as *endonucleases MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece todas as sequências CCGG (metiladas e não metiladas), com exceção apenas das sequências CCGG com o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina e pela *HpaII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que reconhece todas as sequências CCGG com a diferença de que sequências CCGG metiladas (5-meC) promove a inibição de sua atividade catalítica. No terceiro tubo será adicionado a mesma quantidade de água (H₂O) (gDNA não digerido – controle 100%). Todas as reações serão realizadas separadamente com volume final de 25 µl a 37°C por 2 horas conforme demonstrado na Figura 3.

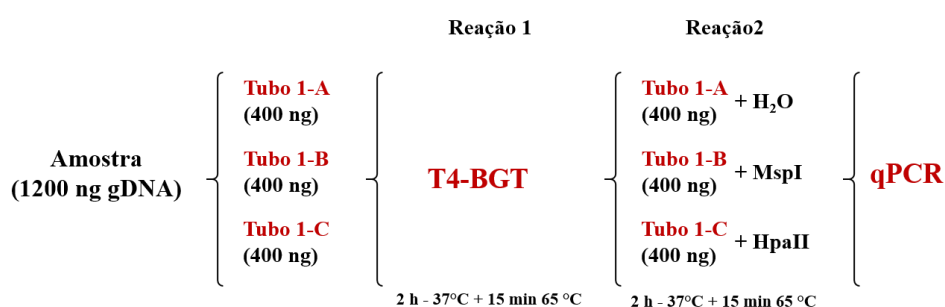


Figura 3 – Esquema do tratamento do DNA.

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

Determinação do padrão de metilação: O padrão de metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) da região promotora dos genes *Slc2a1* (Glut-1) [F: 5'CGCCTCTCAGAGTCCCG3';R:5'CGCCTCCTCCGCTCCTA3'], *Hk1* (Ilha 1) [F: 5'CCTCCCTCTGCGGCAGAGTGG3', R:GTGTTCCACCCAGCAAGCTCCG3'] e *Hk*

1 (Ilha 2) [F:5`CGGGAATGCAAGGCTGTGGCCA3`, R: 5`CGTGGGGAACGTGCAGGGTG 3`] e Hk 2 [F:5`CGCCCCTTTCGAGCCTCA3`, R:5`CCCTCTTCCCGCAGCCAATGAG3`] será determinado em reações de qPCR contendo *SYBR Green I Master 2x* (12,5µl) 0,4 µM de iniciadores específicos, 1,5 µl (25 ng) de gDNA tratado (nas 3 condições; H₂O, MspI e HpaII) e q.s.p de H₂O livre de nuclease. As sequências dos iniciadores foram desenhadas em regiões regulatórias com ilhas CpG dentro de regiões de hipersensibilidade a DnaseI, reguladas por marcas de modificações de histonas e com sítios de ligação de fatores de transcrição utilizando o programa Primer 3 Input (versão 0.4.0) (UNTERGASSER *et al.*, 2012). A determinação de estruturas secundárias e temperaturas de anelamento foi analisada pelo programa *Beacon Designer* (<http://www.premierbiosoft.com/>). Todas as sequências foram blastadas para confirmação da localização cromossômica pela ferramenta de PCR *in silico* (<https://genome.ucsc.edu/>). A obtenção dos valores percentuais referentes a metilação e hidroximetilação serão calculados de acordo com (NESTOR *et al.*, 2012). Não foram encontradas as regiões promotoras dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Slc2a2* (Glut-2), sendo necessário um estudo adicional para determinação dessas regiões e do padrão de metilação desses genes.

3.10 Estatística

Para a estatística foram considerados 2 grupos de comparação, o grupo controle e o grupo experimental com a RM. Os dados obtidos nos experimentos foram analisados por meio do Software Graphpad Prism. Foi, inicialmente, avaliada a normalidade da distribuição dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis com distribuição normal, foi aplicado o Teste t Student, para comparação entre dois grupos. Nos casos em que a normalidade não foi confirmada, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), sendo considerado estatisticamente significativo o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Após a aplicação do protocolo de RM foi aplicado o teste de viabilidade celular para verificar a eficiência do protocolo no aumento da viabilidade dos linfócitos B-1. Conforme visto, em células que passaram pelo estímulo de RM, com os meios de cultura foram suplementados com Crotoxina, Nicotinamida e diferentes altas concentrações de glicose, a viabilidade aumentou significativamente em comparação ao grupo controle, que passou pelo mesmo período de cultivo celular, porém, em meio de R10, sem os estímulos (Figura 4).

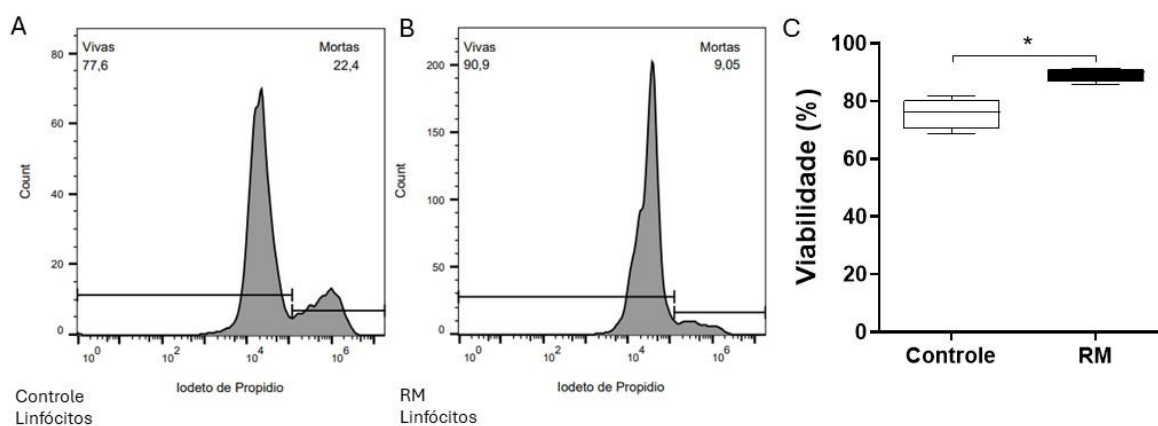


Figura 4 – Viabilidade de células B-1 provenientes de cultura de células peritoneais aderentes cultivadas com A) meio R10 (Controle) ou B) suplementado para a reprogramação metabólica (RM) com 1,2 µg/ml de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, para a fase de expansão e Nicotinamida a 10 mM e 30 mM de glicose por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Foram consideradas células viáveis aquelas negativas para a marcação com iodeto de propídio. C) Percentual de viabilidade dos grupos controle e RM. Teste t Student com pós teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ (N=4).

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

Para seguir com os experimentos e confiabilidade no próximo teste, foi considerada a população negativa para a marcação com o iodeto de propídio (Figuras A e B) e selecionada a população de células viáveis (Figura 4C), descartando as células que estariam em processo de lise. Posteriormente, a captação de glicose foi determinada pela expressão da molécula fluorescente análoga da glicose, o 2-NBDG, que é transportado para o interior de células viáveis via transportador de glicose Glut-1, estabelecendo o resultado expresso na Figura 5, que consiste na mediana da intensidade de fluorescência da molécula 2-NBDG.

A RM provocou a diminuição da captação de glicose pelos linfócitos B-1, expressa pela menor expressão de 2-NBDG no grupo RM (Figuras 5A e 5B), apesar da análise estatística não ter revelado significância (Figura 5B).

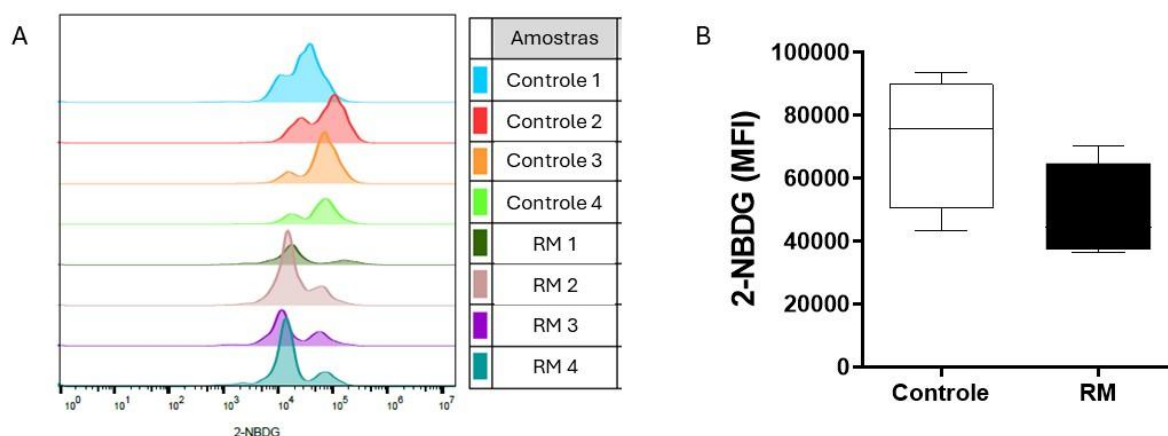


Figura 5 – Determinação da capacidade de captação de glicose por linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo com 1,2 $\mu\text{g/ml}$ de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina ou amostras do grupo controle cultivadas com meio R10. A) Histogramas da expressão de 2- NBDG em células viáveis. B) Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de 2-NBDG que foi transportado para o interior de células B-1. Teste t Student com pós teste de Mann-Whitney não demonstrou significância (N=4).

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

Foi explorada a expressão relativa dos genes associados ao metabolismo de glicose e à produção de insulina pelos linfócitos B-1 produtores de insulina. Corroborando a menor captação de glicose, os resultados revelaram menor expressão dos genes da enzima hexoquinase Hk1 (Figura 6A), Hk2 (Figura 6B) e do gene Slc2a1 que codifica o transportador de glicose Glut1 (Figura 6C), quando comparado ao grupo controle. Não houve expressão dos genes que codificam a glicoquinase Gck, o Glut-2 ou o fator de transcrição PDX1, presentes em células β pancreáticas e responsáveis pelo transporte e quebra da glicose mais eficiente.

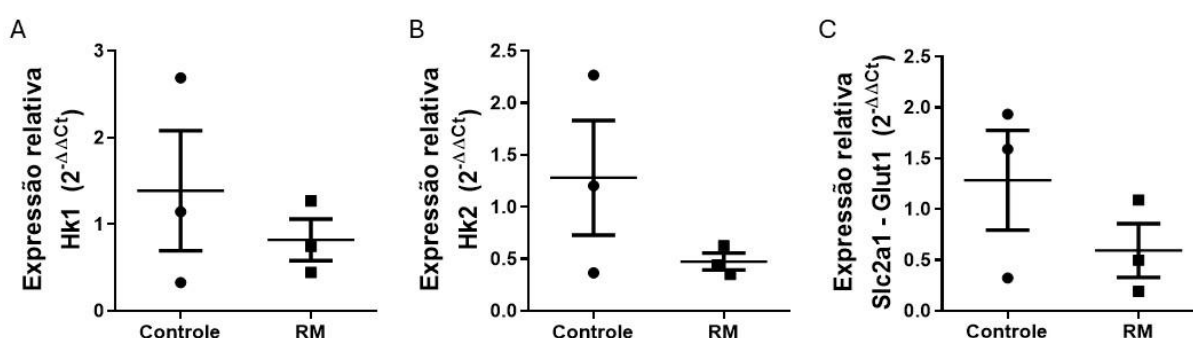


Figura 6 – Análise da expressão gênica relativa dos genes de hexoquinase A) Hk1 e B) Hk2 e C) Slc2a1, que codifica o transportador de glicose Glut-1 por Taqman® qPCR, em linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (controle) ou submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo com 1,2 μ g/ml de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Teste t Student com pós teste de Mann-Whitney não demonstrou significância (N=3).

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

Também foram investigados os genes Pfkfb (Figura 7A) e Pfkfb (Figura 7B), que codificam a enzima fosfofrutoquinase, enzima-chave no metabolismo glicolítico, e não foram vistas diferenças entre os grupos. Já para os genes Cpt1a (Figura 7C) e Cpt1b (Figura 7D), que codificam a enzima Carnitina palmitoil transferase, essencial para a oxidação e transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias, onde serão quebrados para produção energética, a RM promoveu uma regulação negativa da expressão gênica, na Cpt1b (Figura 7D), mas não na Cpt1a.

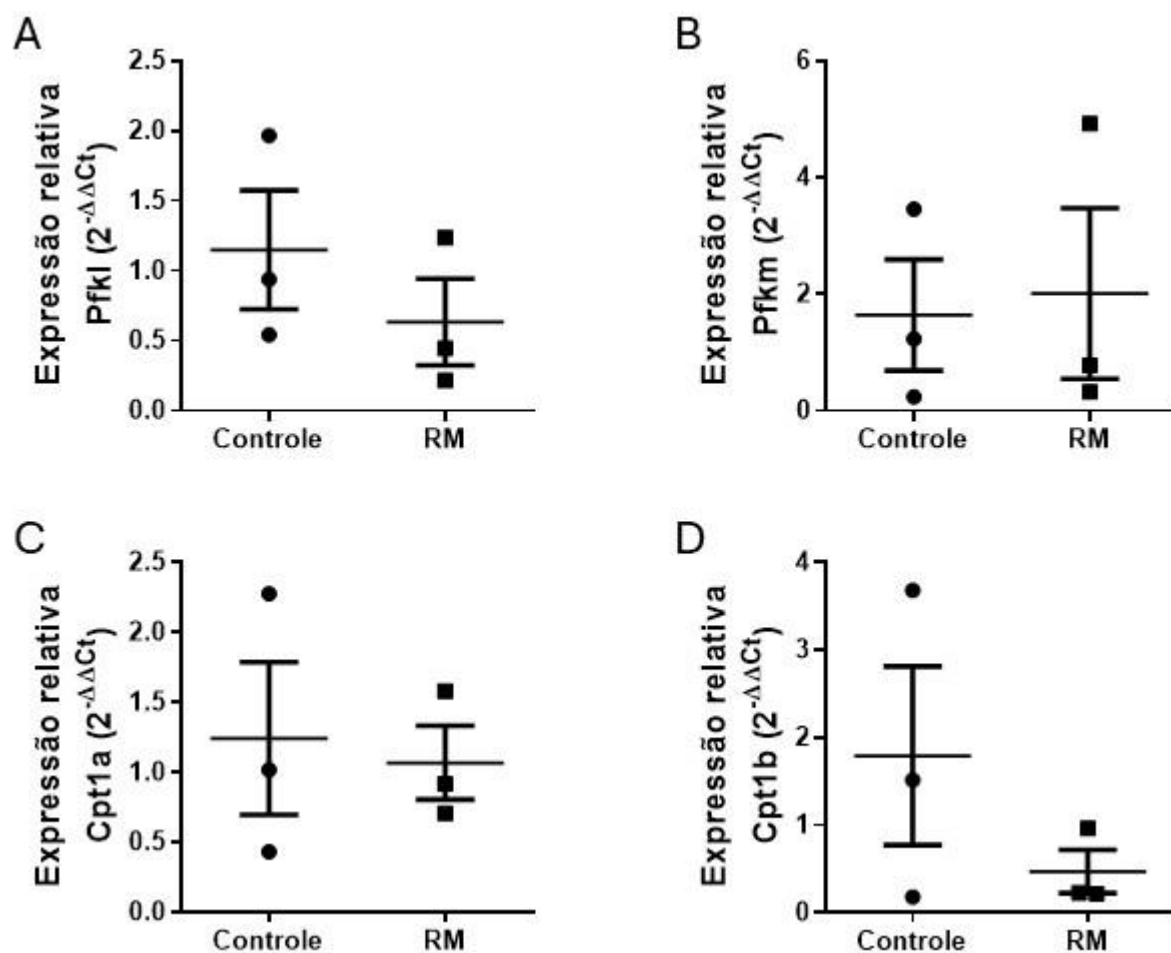


Figura 7 – Análise da expressão gênica de Fofosfrutoquinase A) Pfkfb1 e B) Pfkfb3 e da Carnitina Palmitoil transferase C) Cpt1a e D) Cpt1b, por Taqman @ qPCR, em linfócitos B-1 cultivados com R10 (Controle) ou submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo ou não com 1,2 μ g/mL de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Teste t Student com pós teste de Mann- Whitney não demonstrou significância (N=3).

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

Já a expressão relativa dos genes de insulina, tanto Ins1 (Figura 8A) quanto Ins2 (Figura 8B) estava, em média, 2x aumentada em linfócitos B-1 após o protocolo de RM. Também, a expressão do gene Neuro D1, que codifica o fator de transcrição que rege a expressão dos genes de insulina, tendeu ao aumento nessa população celular (Figura 8C).

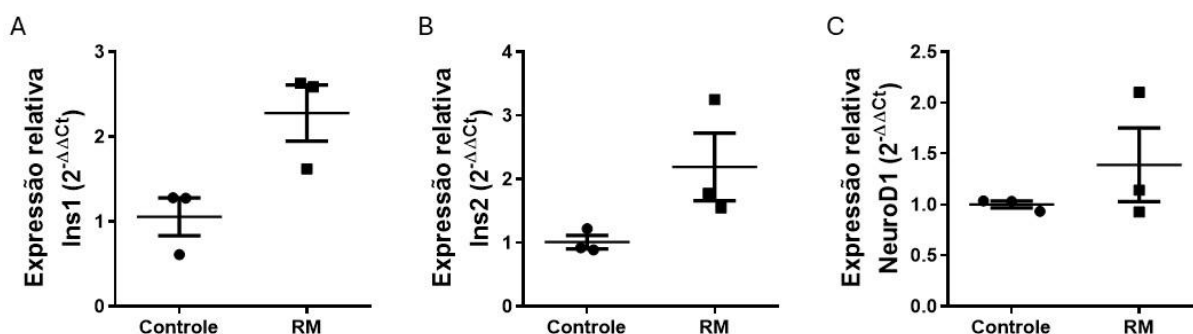


Figura 8 – Análise da expressão dos genes de insulina A) Ins1, B) Ins2 e de C) Neuro D1, que codifica o fator de transcrição associado à expressão de insulina, por Taqman® qPCR, em linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo ou não com 1,2 µg/mL de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Teste t Student com pós teste de Mann-Whitney não demonstrou significância (N=3).

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

Para a análise epigenética, identificamos a metilação específica na Ilha CpG localizada no gene relacionados à expressão de hexoquinase Hk1. Foi calculado o percentual de 5-meC e 5-hmeC e a razão entre esses parâmetros. A RM não alterou o percentual de 5-meC (Figura 9A), mas provocou diminuição de 5-hmeC na região gênica de Hk1 (Figura 9B). A razão 5-meC/5hmeC foi maior nas amostras submetidas à RM (Figura 9C), indicando hipermetilação na região gênica que codifica Hk1, apesar da análise estatística não ter revelado significância. Também foi realizada a avaliação para os genes Hk1 ilha 1, Hk2 e Glut1, porém não foi possível padronizar a qPCR, sendo necessário estudar outras formas de avaliação epigenética (dados não mostrados). Ainda, não foi possível encontrar regiões de ilhas CpGs caracterizadas para o estudo dos genes de insulina (dados não mostrados).

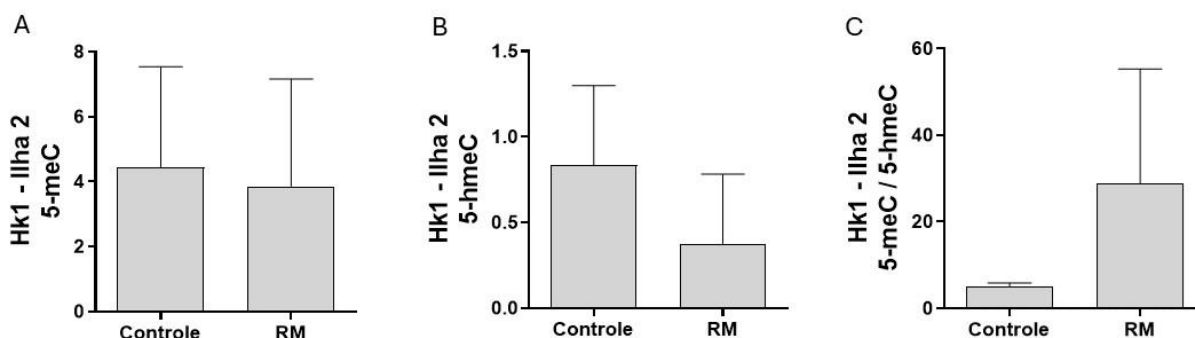


Figura 9 – Análise epigenética do padrão de metilação específica da ilha CpGs 2 que codifica a expressão do gene Hk1 pelo percentual de A) metilação 5-meC, B) hidroximetilação 5-hmeC e C) a razão entre 5-meC/5-hmeC, por qPCR, em linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos ao protocolo de reprogramação metabólica (RM), dado pelo cultivo com 1,2 µg/mL de

Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina. Teste t Student com pós teste de Mann-Whitney não demonstrou significância (N=3).

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

A fim de determinar a presença de grânulos de insulina no citoplasma das células que passaram pela RM, foi realizada a imunomarcação para insulina, com observação em microscópio de fluorescência. Nas figuras a seguir, 10 e 11, em azul, o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que, por sua afinidade de ligação com o DNA, evidencia o núcleo celular e, em verde, a marcação para insulina, que aparece como “grânulos”. O resultado demonstra escassos grânulos de insulina em amostras controle, apesar da presença de muitas células no campo de observação (Figura 10). Já em amostras de linfócitos B-1 RM, após 6 dias de cultivo com os estímulos já citados, os resultados evidenciaram mais campos de observação com a presença de grânulos de insulina (dados não mostrados) e maior número de células positivas para insulina, por campo observado (Figura 10). As células positivas para insulina aparentavam maior intensidade de fluorescência, com a presença de grânulos maiores. Porém, a análise quantitativa da intensidade de fluorescência não revelou diferença entre os grupos (dados não mostrados).

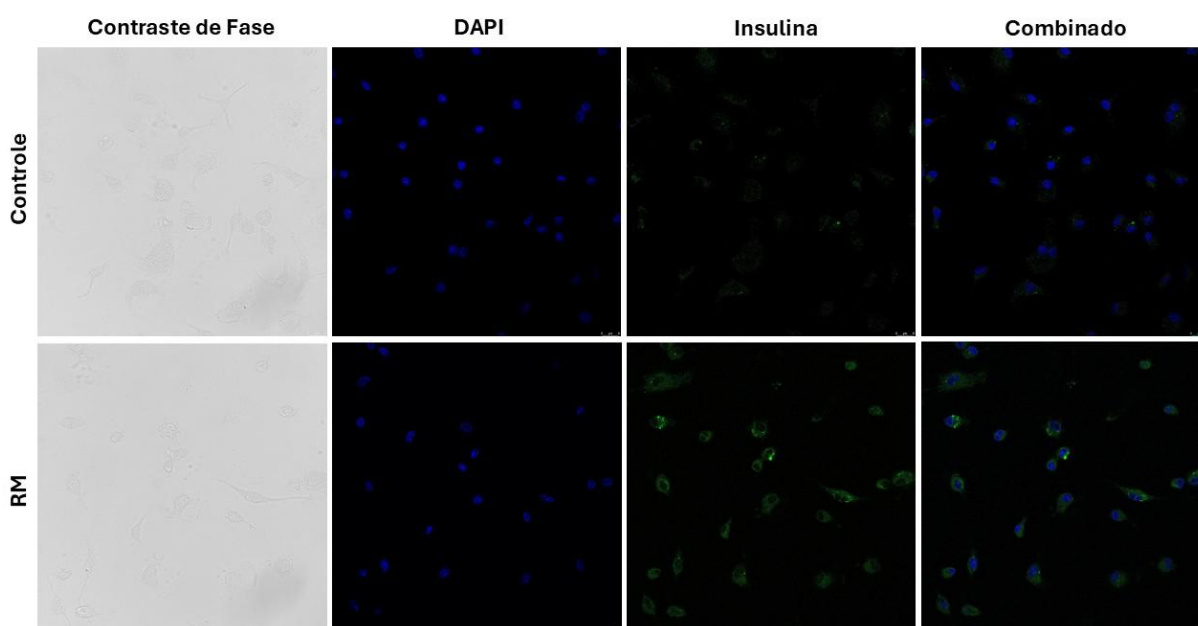


Figura 10 – Fotomicrografias de fluorescência para análise da presença de grânulos de insulina no citoplasma de linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos à reprogramação metabólica (RM) - cultivo suplementado com 1,2 µg/mL de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina, por imuno-marcação de insulina. Contraste de

fase= fotomicrografia em campo de luz, DAPI (em azul) = núcleo celular, Insulina (em verde) = insulina. Aumento 100x.

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

A figura 11, apresenta em detalhe, a presença de grânulos de insulina mais marcados em células produtoras de insulina após a RM. De forma interessante, foram observadas com frequência a presença de dois ou mais núcleos em células produtoras de insulina após a RM (Figura 11). Também, a marcação com DAPI se apresentou diferentes padrões de organização de cromatina entre os grupos. Nas células controle, os núcleos apresentaram coloração difusa e homogênea, com alguns pontos de condensação, compatível com uma distribuição mais regular da cromatina no interior nuclear. Nas células submetidas à RM a marcação apresentou uma distribuição mais pontuada e condensada (Figura 11).

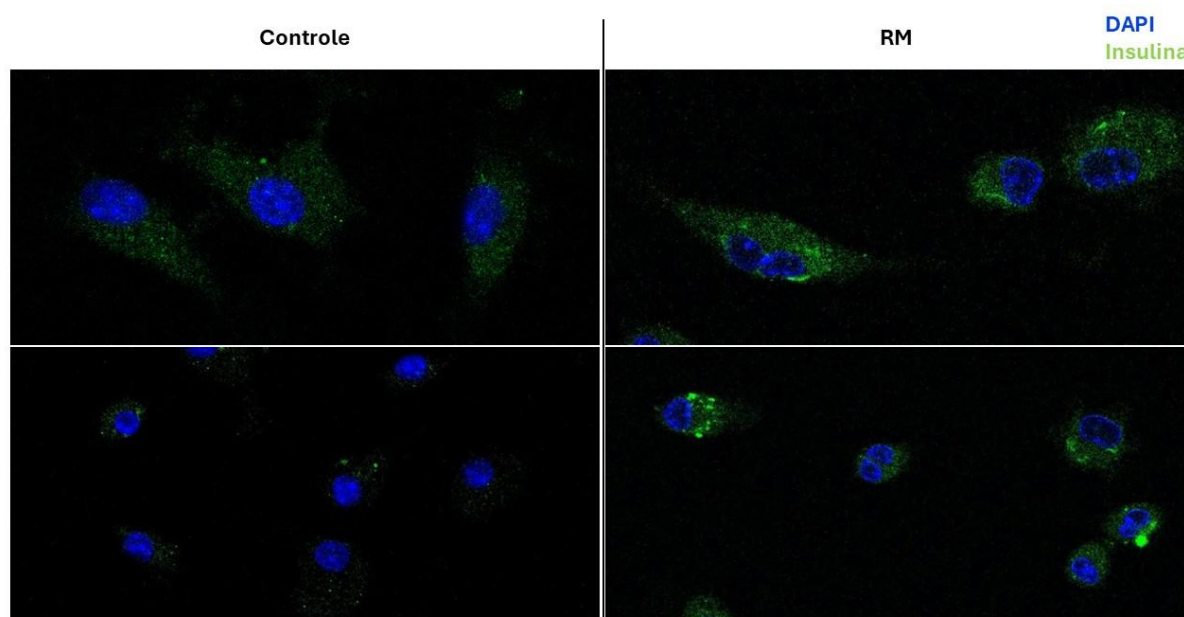


Figura 11 – Fotomicrografias de fluorescência para análise da presença de grânulos de insulina no citoplasma de linfócitos B-1 cultivados com meio R10 (Controle) ou submetidos à reprogramação metabólica (RM) - cultivo suplementado com 1,2 µg/mL de Crotoxina e 20 mM de glicose por 3 dias, fase de expansão e, posteriormente, com Nicotinamida 10 mM e 30 mM de glicose, por mais 3 dias, na fase de diferenciação em células produtoras de insulina, por imuno-marcação de insulina. Contraste de fase= fotomicrografia em campo de luz, DAPI (em azul) = núcleo celular, Insulina (em verde) = insulina. Aumento 1000x.

Fonte: Elaborado pelo autor (Bueno, T. A.; 2025).

5 DISCUSSÃO

A reprogramação metabólica tem como objetivo modificar a função celular por meio da alteração de seu metabolismo. Neste estudo, observou-se uma alteração significativa na via glicolítica de linfócitos B-1, evidenciada pela redução na captação de glicose e pela menor expressão gênica do transportador Glut1, bem como da enzima hexoquinase, essencial para o início da glicólise. Partindo da hipótese de que uma disfunção na produção de insulina pelos linfócitos B-1 poderia contribuir para uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de DM, compreender o metabolismo envolvido em sua capacidade de produção de insulina pode abrir caminho para o estabelecimento de uma terapia celular autóloga com o objetivo de restaurar a capacidade funcional desses linfócitos em secretar insulina, a partir de reprogramação metabólica. Neste sentido, os resultados apresentados aqui, demonstram potencial para essa premissa, uma vez que linfócitos B-1 reprogramados metabolicamente apresentaram maior expressão dos genes de insulina e de grânulos contendo esse hormônio no citoplasma que aqueles do grupo controle.

O camundongo tem sido amplamente utilizado em modelos experimentais devido às suas características genéticas bem definidas, desenvolvidas ao longo de décadas de pesquisa. Seu uso consciente é regulamentado e imprescindível para a condução de estudos biomédicos (NRC, 1996). As células B-1, bem caracterizadas na literatura, apresentam baixa frequência no baço e ausência nos linfonodos, com predomínio no peritônio e na pleura. Em modelo experimental com infecção por *lagochilascaris*, observou-se que camundongos da linhagem BALB/c e XID apresentaram diferenças imunológicas relevantes. Enquanto os BALB/c produziram imunoglobulinas IgM, IgG, IgA e IgE, os BALB/c Xid não produziram IgM e apresentaram níveis reduzidos de IgG e IgA, com quantidades similares de IgE, sugerindo papel crítico das células B-1 na modulação da resposta imune (FREITAS *et al.*, 2009). Além das diferenças na resposta imunológica, camundongos XID se mostraram mais suscetíveis ao desenvolvimento de diabetes após injeções com STZ (ALVARES-SARAIVA *et al.*, 2015). Esse comportamento foi similar ao observado na literatura para camundongos da linhagem C57BL/6, enquanto camundongos BALB/c são mais resistentes à STZ (KAKU *et al.*, 1989; WOLF *et al.*, 1984; CARDEAL *et al.*, 1998).

Há cerca de uma década, o grupo de estudos de Shiv Pillai explorou possíveis alterações genéticas nas linhagens comerciais de C57BL/6 que causariam erros na interpretação de resultados acerca do papel de linfócitos B nesses camundongos. Mais especificamente, durante os sucessivos cruzamentos, uma mutação no gene *dock2* surgiu como uma variante estrutural espontânea e acabou incorporada na linhagem comercializada. Essa mutação causou alteração em algumas populações celulares, como os linfócitos T CD8 de memória, linfócitos B da zona marginal e linfócitos do subtipo B-1a, que foi encontrado em menor número na cavidade peritoneal, associado à mutação de *dock2* (MAHAJAN *et al.*, 2016).

A suscetibilidade de camundongos C57BL/6 ao tratamento com estreptozotocina não foi ainda explicada no âmbito genético, fenotípico ou com foco no maior acúmulo desse fármaco no tecido pancreático. A possibilidade de um defeito na produção de insulina pelos linfócitos B-1 ser o responsável por essa característica ainda está sob investigação. Resultados preliminares demonstraram menor quantidade de linfócitos B-1 em C57BL/6 que em camundongos BALB/c e a transferência de células B-1 autólogas para a cavidade peritoneal destes camundongos pode modular a glicemia dos animais para um caráter normoglicêmico (ALVARES-SARAIVA, *artigo em preparação*). Além disso, o ambiente inflamatório ao qual estão expostas as células peritoneais nas diferentes linhagens de camundongos, pode influenciar as características funcionais dos linfócitos B-1.

Os resultados de viabilidade celular demonstraram que a adequação do meio de cultivo contribui significativamente para a sobrevivência celular ($p < 0,05$), possibilitando a continuidade do protocolo com células predominantemente viáveis e funcionalmente ativas, além de reduzir o risco de interferência por células em lise.

A análise da captação de glicose pelas células B-1, submetidas ao protocolo de reprogramação metabólica ao longo de seis dias, indicou uma redução significativa na absorção de glicose no grupo tratado. Esse grupo recebeu, em momentos distintos, meio R10 suplementado com CTX e glicose 20 mM, seguido por meio com nicotinamida e glicose 30 mM. Diversos estudos sustentam o papel da crotoxina (CTX) e da nicotinamida como agentes moduladores de vias metabólicas e funcionais em diferentes tipos celulares. A CTX, principal componente do veneno de cascavel, demonstrou interferir na reprogramação fenotípica de macrófagos, promovendo alterações no perfil secretor e regulando eventos inflamatórios e imunossupressores (NEVES *et al.*, 2023). Em modelos murinos, a CTX foi capaz de inibir a proliferação

de células esplênicas e a liberação de citocinas inflamatórias, evidenciando seu potencial imunomodulador (RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004), inclusive na resposta imune humoral (FAVORETTO *et al.*, 2011). De forma complementar, a nicotinamida — um precursor intermediário da via de síntese de NAD⁺ — tem sido associada à modulação do metabolismo energético e da resposta imune. Estudos mostraram que sua administração é capaz de alterar o funcionamento de células T e reduzir processos inflamatórios em modelos de encefalomielite autoimune experimental (KANEKO *et al.*, 2006; LIM *et al.*, 2015) e doenças inflamatórias intestinais, atuando como regulador de vias imunometabólicas (FANG *et al.*, 2023). Esses achados fortalecem a hipótese de que CTX e nicotinamida possam atuar sinergicamente em protocolos de reprogramação metabólica com impacto sobre a função celular, inclusive em cenários de autoimunidade.

Corroborando a menor captação de glicose, o estudo da expressão relativa dos genes associados à glicólise e ao transporte de glicose (Hk1, Hk2 e Glut1) não aumentou após a RM e, inclusive, apresentaram menor expressão que nos linfócitos B-1 controle, sugerindo que a glicose pode não ser a única fonte energética para a síntese de insulina por essas células ou, ainda, que o estímulo para produção de insulina pode ocorrer independentemente do aumento no influxo de glicose, o que indica o possível envolvimento de vias metabólicas alternativas, sendo necessárias investigações mais abrangentes das vias metabólicas, incluindo a atividade de lactato, piruvato, TCA, OXPHOS, etc. De fato, conforme revisado por SUN *et al.*, 2020 estudos concordam que as vias alternativas promovem funções mais anti-inflamatórias, de reparo tecidual e resolução/regulação das respostas imunológicas enquanto o aumento da glicólise está mais associado às funções de caráter pró-inflamatório, com inflamação tecidual.

Na análise da expressão gênica relativa, identificou-se aumento nos genes de Ins1, Ins2 e Neuro D1 após o protocolo de reprogramação, indicando a potencial otimização da produção de insulina pelas células B-1. Quanto à morfologia celular, observou-se que, sob cultivo em meio R10 sem estímulos externos, havia a presença de grânulos de insulina, apesar de escassos, refletindo uma produção basal já demonstrada anteriormente por Alvares-Saraiva e seus colaboradores (ALVARES-SARAIVA *et al.*, 2015). No entanto, a exposição ao protocolo de reprogramação metabólica resultou em aumento visível desses grânulos, indicando indução funcional

da célula B-1 e reforçando a hipótese de que o protocolo testado é capaz de potencializar sua atividade secretora de insulina.

Quando tratadas isoladamente com CTX há aumento na formação de grânulos de insulina, porém com distribuição ao redor do núcleo, enquanto a suplementação com apenas glicose em concentração elevada ou nicotinamida demonstrou distribuição dos grânulos na margem da membrana plasmática (*dados não publicados*). Estudos prévios também identificaram que a CTX promove ativação secretora em macrófagos entre 24 e 48 horas após o cultivo em meio suplementado, aumentando a secreção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio e, também, de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1B (COSTA *et al.*, 2013). O mesmo estudo também evidenciou que o cultivo com CTX aumentou a produção de lipoxina A4 pelos macrófagos (COSTA *et al.*, 2013).

Também, já foi demonstrada a capacidade da CTX em reorganizar o citoesqueleto de actina, inibindo a função fagocítica de neutrófilos em culturas com diferentes concentrações e períodos. Interessantemente, apesar da inibição da fagocitose, a CTX não inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos (LIMA *et al.*, 2012). Essas evidências sustentam a hipótese de que a célula B-1 pode ser funcionalmente reprogramada, com possível impacto sobre o perfil imuno metabólico do DM 1.

As modificações epigenéticas desempenham um papel essencial no desenvolvimento e na diferenciação das células do sistema imunológico, bem como na regulação de suas funções. As enzimas epigenéticas, ao sofrerem alterações, podem modificar componentes fundamentais como o DNA, as histonas e a própria arquitetura da cromatina, influenciando diretamente processos celulares vitais, tais como a transcrição gênica, a replicação e os mecanismos de reparo do DNA. Notavelmente, mesmo alterações discretas na atividade dessas enzimas são capazes de desencadear efeitos significativos sobre a funcionalidade e a estabilidade celular (DAI *et al.*, 2024). Aqui, observou-se metilação específica nas ilhas CpGs do gene HK1 em amostras de B-1 RM, indo ao encontro da menor expressão gênica desse gene observada, porém em níveis discretos e sem significância estatística.

Atualmente, a epigenética é concebida como um complexo sistema regulatório do estado da cromatina, sustentado por cinco principais mecanismos: modificações químicas no DNA, alterações pós-traducionais em histonas, modificações em moléculas de RNA, processos de remodelamento da cromatina e a

regulação mediada por RNAs não codificadores (ncRNAs). Tais mecanismos atuam de modo independente da sequência primária do DNA, promovendo a ativação ou a repressão de regiões específicas do genoma em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos, e desempenham papel fundamental na regulação da expressão gênica (DAI *et al.*, 2024). Além do gene de HK1, também foram desenhados primers para a avaliação epigenética em HK2 e Glut-1, porém não obtivemos êxito na validação dos primers. Também, as amostras obtidas a partir de linfócitos B-1 renderam concentrações muito baixas de DNA. Tais constatações reforçam a necessidade de investigações contínuas e aprofundadas sobre os possíveis efeitos biológicos dessas modificações. Não descartamos repetir os experimentos e/ou estudar outras técnicas para o estudo epigenético.

O tratamento padrão e mais adotado do DM consiste na terapia medicamentosa, mais comumente de aplicações diárias de insulina para um controle glicêmico. Tal intervenção, quando devidamente aderida, é capaz de reduzir significativamente as complicações microvasculares associadas à doença, podendo ser complementada com terapias farmacológicas e não farmacológicas (COMMITTEE REPORT, 1997).

O estudo DCCT (1998) trouxe contribuições importantes, ao demonstrar que a preservação da massa de células β está relacionada a menores índices de complicações crônicas. Ainda que os avanços na abordagem terapêutica do DM sejam notáveis, lacunas persistem. Protocolos experimentais têm explorado a diferenciação de células-tronco pluripotentes em células β funcionais, como demonstrado por Ghoneim *et al.* 2024, cujas células produtoras de insulina foram capazes de controlar o diabetes induzido em roedores. Entretanto, a imunogenicidade destas células ainda representa uma limitação relevante para aplicação clínica, sendo necessário o uso de imunossupressores e existindo risco de formação de teratomas (GHONEIM *et al.*, 2024).

Recentemente, um caso chamou atenção no jornalismo científico. O estudo conduzido por Wang *et al.* (2024) relata os resultados de um ensaio clínico de fase 1, no qual uma paciente com DM 1 recebeu transplante autólogo de ilhotas pancreáticas derivadas de células-tronco pluripotentes quimicamente induzidas (CiPSCs). As CiPSCs foram geradas a partir de células estromais mesenquimais adiposas da própria paciente, utilizando uma abordagem de reprogramação química previamente estabelecida, sem a necessidade de fatores de transcrição genéticos. Essas células

foram então diferenciadas *in vitro* em ilhotas produtoras de insulina e transplantadas sob a bainha anterior do músculo reto abdominal. A paciente alcançou independência de insulina exógena 75 dias após o transplante e esse controle glicêmico estável foi mantido por mais de um ano, demonstrando o sucesso do transplante na restauração da função endócrina pancreática, sem anormalidades relacionadas ao transplante, como formação de tumores ou proliferação celular descontrolada (WANG *et al.*, 2024). No presente estudo, apesar do caráter pluripotente dos linfócitos B-1, também optamos pela reprogramação metabólica utilizando estímulos químicos, que não atuam diretamente na transcrição gênica, reduzindo potenciais riscos associados à inserção gênica e neoplasias.

Seguindo essa linha, pesquisas têm investigado o potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais (CTM), obtidas da medula óssea, na reversão do DM 1 em estágios iniciais. Estudos experimentais demonstram resultados promissores, com perspectivas de extensão para modelos de DM 2, conforme proposto por Lu *et al.* (2025). Os linfócitos B-1 podem, ainda, atuar como imunomoduladores, função já demonstrada em diversos estudos envolvendo a rejeição de transplantes autólogos (NOGUEIRA-MARTINS *et al.*, 2010), no diabetes autoimune, promovendo a entrada de linfócitos T autorreativos no pâncreas (RYAN *et al.*, 2010), facilitando infecções bacterianas (RUSSO *et al.*, 2010) ou conferindo resistência contra fungos (POPI *et al.*, 2008; DA COSTA *et al.*, 2016). VOLTARELLI *et al.* (2009) relataram que pacientes submetidos a protocolos imunomodulatórios apresentaram significativa redução na necessidade de insulina exógena, com alguns indivíduos mantendo-se livres do hormônio por períodos entre 6 e 47 meses. Esses dados reforçam a hipótese de que a imunomodulação pode atuar como estratégia auxiliar na regeneração e proteção das células β recém-formadas.

6 CONCLUSÃO

Os achados deste estudo indicam que o protocolo de reprogramação metabólica aplicado aos linfócitos B-1 foi eficaz em induzir alterações funcionais relevantes, com impacto tanto sobre o metabolismo glicolítico quanto sobre a capacidade de produção de insulina. A redução na captação de glicose e na expressão de genes relacionados ao transporte e metabolismo da glicose sugere uma modulação da via glicolítica, enquanto o aumento na expressão de genes associados à síntese de insulina e a observação de maior presença de grânulos intracelulares reforçam o potencial da reprogramação em restaurar ou intensificar a função secretora dessas células.

Esses resultados contribuem para a compreensão do papel imunometabólico dos linfócitos B-1 e abrem perspectiva para abordagens terapêuticas alternativas no contexto do DM 1, especialmente ao se considerar estratégias que integrem modulação metabólica e indução de plasticidade celular. Estudos futuros, com aprofundamento em vias metabólicas complementares e validação funcional *in vivo*, serão essenciais para consolidar esses achados e ampliar seu potencial de aplicação translacional.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. R. *et al.* Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *International Immunology*, [Oxford], v. 13, n. 9, p. 1193-1201, set. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11526100/>. Acesso em: 20 ago. 2024.

ALVARES-SARAIVA, A. M. *et al.* B-1 cells produce insulin and abrogate experimental streptozotocin-induced diabetes. *European Journal of Immunology*, [S.I.], v. 45, n. 5, p. 1452–1461, maio 2015. DOI: 10.1002/eji.201445409. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25688546/>. Acesso em: 25 maio 2025.

ALUGUPALLI, K. R. *et al.* B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*, [Oxford], v. 21, n. 3, p. 379–390, set. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15357949/>. Acesso em: 16 abr. 2024.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diabetes mellitus and exercise. *Diabetes Care*, Alexandria, v. 23, n. 1, suplemento 1, p. S50–S54, jan. 2000. DOI: 10.2337/diacare.23.1. S50. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12017678/>. Acesso em: 25 abr. 2024.

ANSEL, M. *et al.* CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*, [S.I.], v. 16, n. 1, p. 67-76, 2002. ISSN 1074-7613. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11825566/>. Acesso em: 3 out. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Análise Epidemiológica e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. *Vigitel Brasil 2023: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2023*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2023. 131 p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2023-vigilancia-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas-por-inquerito-telefonico>. Acesso em: 25 maio 2025.

CARDINAL, J. *et al.* Differential metabolite accumulation may be the cause of strain differences in sensitivity to streptozotocin-induced beta cell death in inbred mice. *Endocrinology*, v. 139, n. 6, p. 2885-2891, 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-abstract/139/6/2885/2987168?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 20 abr. 2025.

COSTA, E. *et al.* Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. *Toxicon*, v. 74, p. 167–178, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113003413?via%3Dihub>. Acesso em: 20 abr. 2025.

DA COSTA, L. *et al.* B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *Immunobiology*, v. 222, n. 2, p. 218–227, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0171298516303874?via%3Dihub>. Acesso em: 1 maio 2025.

DA CUNHA, G. H. *et al.* Prática insulino terapêutica realizada por pessoas com diabetes na Atenção Primária em Saúde. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, São Paulo, v. 54, p. e03620, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1980-220X2019002903620>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/reeusp/a/7LxJJWBfwgQ7n5wb6Sxdkft/?lang=pt>. Acesso em: 25 maio 2025.

DAI, Wanlin *et al.* Epigenetics-targeted drugs: current paradigms and future challenges. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 1–21, 2024. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-024-02039-0>. Acesso em: 13 jun. 2025.

DOS SANTOS, D.L. *et al.* B-1 cells upregulate CD8 T lymphocytes and increase proinflammatory cytokines serum levels in oral encephalitozoonosis. *Microbes and Infection*, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 196–204, mar. 2018. DOI: 10.1016/j.micinf.2017.11.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29203270/>. Acesso em: 25 maio 2025.

DOS SANTOS, E. M.; ARAÚJO, R. R. Testes de comparação de protocolos de extração de DNA e de maceração de tecido de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae).

Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 15, n. 4, p. 199–202, out./dez. 2017. Disponível em: <https://www.seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/114609>. Acesso em: 25 maio 2025.

EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v. 20, n. 7, p. 1183–1197, 1997. DOI: 10.2337/diacare.20.7.1183. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/diacare.20.7.1183>. Acesso em: 25 maio 2025.

FANG, J. *et al.* NAD⁺ metabolism-based immunoregulation and therapeutic potential. *Cell & Bioscience*, v. 13, p. 81, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13578-023-01031-5>. Disponível em: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-023-01031-5>. Acesso em: 25 maio 2025.

FAVORETTO, B. *et al.* Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. *Toxicon*, v. 57, n. 4, p. 600–607, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21223974/>. Acesso em: 1 maio 2025.

FERNANDES. AGÊNCIA FAPESP. La molécula de crotoxina es más potente que la toxina botulínica. *Agência FAPESP*, 1 jun. 2017. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/la-molecula-de-crotoxina-es-mas-potente-que-la-toxina-botulinica/25397>. Acesso em: 25 maio 2025.

FÖRSTER, I. *et al.* CD5 B cells in the mouse. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 173, p. 247–251, 1991. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-76492-9_35. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1717201/>. Acesso em: 25 maio 2025.

FREITAS, J. A. G. de; PRUDENTE, M. F. de S.; CARVALHAES, M. S. Experimental lagochilascarirose em camundongos com imunodeficiência ligada ao cromossomo X. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 4, p. 381–385, jul./ago. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0037-86822009000400005>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/RqqjzkvBBKJ4ZSrSGtmpLkj/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 25 maio 2025.

GHONEIM, M. *et al.* Current status of stem cell therapy for type 1 diabetes: a critique and a prospective consideration. *Stem Cell Research & Therapy*, [S.l.], v. 15, p. 23, 2024. Disponível em: <https://www.editorialmanager.com/scrt/default.aspx>. Acesso em: 25 jan. 2025.

HAAS, K. *et al.* B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*, [S.l.], v. 23, n. 1, p. 7–18, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16039575/>. Acesso em: 18 set. 2024.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas*. 11. ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2025. Disponível em: <https://diabetesatlas.org>. Acesso em: 25 maio 2025.

KANEKO, S. *et al.* Protecting axonal degeneration by increasing nicotinamide adenine dinucleotide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis models. *Journal of Neuroscience*, [S.l.], v. 26, n. 38, p. 9794–9804, 2006. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2116-06.2006>. Acesso em: 1 maio 2025.

KAKU, K.; FIEDOREK JR., F. T.; PROVINCE, M. *et al.* Genetic analysis of glucose tolerance in inbred mouse strains: evidence for polygenic control. *Diabetes*, [S.l.], v. 37, n. 6, p. 707–713, jun. 1988. DOI: 10.2337/diab.37.6.707. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/37/6/707/7270/Genetic-Analysis-of-Glucose-Tolerance-in-Inbred>. Acesso em: 25 maio 2025.

KAKU, K. *et al.* A single major gene controls most of the difference in susceptibility to streptozotocin-induced diabetes between C57BL/6J and C3H/HeJ mice. *Diabetologia*, Heidelberg, v. 32, n. 10, p. 716–723, out. 1989. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00274530>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00274530>. Acesso em: 12 jun. 2025.

KU, Y. *et al.* Immunolocalization of 8-OHdG and OGG1 in pancreatic islets of

streptozotocin-induced diabetic rats. In: BRENNER, Sidney (Ed.). *Enciclopédia de Genética de Brenner*. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2009.

LIM, H. W. *et al.* SIRT1 deacetylates ROR γ t and enhances Th17 cell generation. *Journal of Experimental Medicine*, [S.l.], v. 212, n. 5, p. 607–617, 4 maio 2015. DOI: 10.1084/jem.20132378. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/212/5/607/41979/SIRT1-deacetylates-ROR-t-and-enhances-Th17-cell>. Acesso em: 25 maio 2025.

LIMA, T. S. *et al.* Crotoxin, a rattlesnake toxin, induces a long-lasting inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils. *Experimental Biology and Medicine*, [S.l.], v. 237, n. 10, p. 1219–1230, 2012. DOI: 10.1258/ebm.2012.012010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23045721/>. Acesso em: 25 maio 2025.

LU, J. *et al.* From bench to bedside: future prospects in stem cell therapy for diabetes. *Journal of Translational Medicine*, [S.l.], v. 23, n. 1, p. 72, jan. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-024-06019-4>. Acesso em: 25 maio 2025.

MAGLIANO, D. J.; BOYKO, E. J. (Ed.). *IDF Diabetes Atlas*. 10. ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35914061/>. Acesso em: 25 maio 2025.

MAHAJAN, V. *et al.* Striking immune phenotypes in gene-targeted mice are driven by a homozygous copy-number variant that disrupts the function of Dock2. *Science Immunology*, [S.l.], v. 1, n. 1, p. e1500472, 2016. DOI: 10.1126/sciimmunol.aaf0472. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124716305253>. Acesso em: 12 jun. 2025.

MATTOS, M. S. *et al.* The immunology of B-1 cells: from development to aging. *Immunity & Ageing*, [S.l.], v. 21, art. 54, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12979-024-00455-y>. Disponível em: <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12979-024-00455-y>. Acesso em: 12 jun. 2025.

MELO, E.S.; LUZ, I.C. Linfócitos B-1 produtores de insulina como alvo terapêutico no diabetes tipo 1: estudo in vitro. 2022. Trabalho apresentado no *Encontro Científico e Encontro de Iniciação Científica da UNIP – ECEEIC*, Curso de Biomedicina, Campus Alphaville. Orientadora: Profa. Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva. Disponível em:

https://www.unip.br/eceeic/admin/Anexos/Conteudo/C2022/C9/file_28092022103011597.pdf. Acesso em: 25 maio 2025.

MENG, Y. *et al.* Nicotinamide promotes cardiomyocyte derivation and survival through kinase inhibition in human pluripotent stem cells. *Cell Death & Disease*, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 1119, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04395-z>. Acesso em: 25 maio 2025.

NAKAMURA, H. BALB/c mouse. In: MALOY, Stanley; HUGHES, Kelly (Ed.). *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 290–292. ISBN 978-0-12-374984-0. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/brenners-encyclopedia-of-genetics/maloy/978-0-12-374984-0>. Acesso em: 25 maio 2025.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). *Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research*. Washington: National Academy of Sciences, 1996. Disponível em: <https://www.nap.edu/catalog/5140/use-of-laboratory-animals-in-biomedical-and-behavioral-research>. Acesso em: 25 maio 2025.

NESTOR, C.E. *et al.* Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Research*, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 467–477, mar. 2012. DOI: 10.1101/gr.126417.111. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3290782/>. Acesso em: 25 maio 2025.

NEVES, C.L. *et al.* Crotoxin modulates macrophage phenotypic reprogramming. *Toxins*, [S.l.], v. 15, n. 10, p. 616, 2023. DOI: 10.3390/toxins15100616. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/15/10/616>. Acesso em: 25 maio 2025.

NOGUEIRA-MARTINS, M.F.; MARIANO, M. B-1 cell participation in T-cell-mediated alloimmune response. *Immunobiology*, [S.l.], v. 215, n. 4, p. 264–274, abr. 2010. DOI: 10.1016/j.imbio.2009.05.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19581018/>. Acesso em: 25 maio 2025.

PEREIRA, A. *et al.* B-1 cell-mediated modulation of M1 macrophage profile

ameliorates microbicidal functions and disrupts the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, [S.l.], v. 13, n. 9, p. e0007674, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007674. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31536488/>. Acesso em: 25 maio 2025.

POPI, A.N. *et al.* B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. *Micróbios e Infecção*, v. 10, n. 7, p. 817–824, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457908001160?via%3Dihub>. Acesso em: 01 maio 2025.

POPI, A.N. *et al.* Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytes in vitro. *Immunology*, [S.l.], v. 126, n. 1, p. 114–122, jan. 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02883.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18710404/>. Acesso em: 25 maio 2025.

PUGLIESE, L. S. *et al.* B-1 lymphocytes differentiate into functional osteoclast-like cells. *Immunobiology*, v. 217, n. 3, p. 336–344, 2012. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.07.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.014>. Acesso em: 25 maio 2025.

RANGEL-SANTOS, A. *et al.* Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, v. 44, n. 6, p. 609–616, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004101010400306X>. Acesso em: 01 maio 2025.

ROSSINI, A.A. *et al.* Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 6, p. 2485–2489, 1977. DOI: 10.1073/pnas.74.6.2485. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.6.2485>. Acesso em: 25 maio 2025.

RUSSO, R.T.; MARIANO, M. B-1 cell protective role in murine primary *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection. *Immunobiology*, v. 215, n. 12, p. 1005–1014, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20188435/>. Acesso em: 25 maio 2025.

RYAN, G. *et al.* B1 cells promote pancreas infiltration by autoreactive T cells. *Journal of Immunology*, v. 185, n. 5, p. 2800–2807, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/jimmunol/article-abstract/185/5/2800/7977780?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 01 maio 2025.

QUARESMA, S.; TORRES, P. F.; COSTA, F. de J. *et al.* Análise do conteúdo de epigenética abordado nos livros didáticos de Biologia do Ensino Médio. *Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências*, v. 22, p. e36988, 2022. DOI: <https://doi.org/10.28976/1984-2686rbpec2022u693711>. Disponível em: <https://periodicos.ufmg.br/index.php/rbpec/article/view/36988>. Acesso em: 25 maio 2025.

SCHAUER, P.R. *et al.* Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes — 5-year outcomes. *New England Journal of Medicine*, [S.l.], v. 376, n. 7, p. 641–651, 16 fev. 2017. DOI: 10.1056/NEJMoa1600869. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1600869>. Acesso em: 25 maio 2025.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diretriz SBD 2022*. Disponível em: <https://profissional.diabetes.org.br/diretriz-sbd-2022/>. Acesso em: 20 abr. 2025.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diretriz SBD 2024*. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/>. Acesso em: 20 abr. 2025.

SUN, L. *et al.* Metabolic reprogramming in immune response and tissue inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 40, n. 9, p. 1990–2001, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32698683/>. Acesso em: 25 maio 2025.

Untergasser A. *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. Agosto de 2012;40(15):e115. DOI: 10.1093/nar/gks596. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22730293/>. Acesso em: 12 jun. 2025.

VOLTARELLI, J. C. *et al.* Terapia celular no diabetes mellitus. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, supl. 1, p. 149–156, 2009. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbhh/a/DhLqrSSQDYtgJCNVZwyh5kn/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 25 maio 2025.

WANG, Y.; ROTHSTEIN, T. L. Induction of Th17 cell differentiation by B-1 cells. *Frontiers in Immunology*, [Lausanne], v. 3, p. 281, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00281>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22973276/>. Acesso em: 25 maio 2025.

WANG, S. *et al.* Transplantation of chemically induced pluripotent stem-cell-derived islets under abdominal anterior rectus sheath in a type 1 diabetes patient. *Cell*, v. 187, n. 22, p. 6152–6164, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39326417/>. Acesso em: 20 abr. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Estatísticas Mundiais de Saúde 2022*. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/20-05-2022-world-health-statistics-2022>. Acesso em: 20 abr. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Estatísticas Mundiais de Saúde 2024*. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240094703>. Acesso em: 23 abr. 2025.

WOLF, J., LILLY, F., SHIN, S. A influência da origem genética na suscetibilidade de camundongos consanguíneos ao diabetes induzido por estreptozotocina. *Diabetes*, v. 33, n. 6, p. 567–571, 1984. Disponível em: <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/33/6/567/6072/The-Influence-of-Genetic-Background-on-the>. Acesso em: 25 abr. 2025.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA CEUA



Universidade Paulista
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência de TNF-alfa na produção de insulina por linfócitos B-1: um estudo epigenético", protocolada sob o CEUA nº 9315220124 (00-00114), sob a responsabilidade de **Anuska Marcelino Alvares Saraiva** e equipe: **THAIS ALVES BUENO; Rodrigo Augusto Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 08/05/2024.

We certify that the proposal "TNF-alpha leading to insulin production by B-1 lymphocytes: an epigenetic study", utilizing 120 isogenic mice (120 males), protocol number CEUA 9315220124 (00-00114), under the responsibility of **Anuska Marcelino Alvares Saraiva** and team: **THAIS ALVES BUENO; Rodrigo Augusto Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 05/08/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 03/2024 a 07/2025 Área: Patologia Ambiental E Experimental

Origem:	Biotério de Experimentação				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	Idade: 8 a 10 semanas	Quantidade: 60
Linhagem:	BALB/c	Peso: 20 a 25 g			
Origem:	Biotério de Experimentação				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	Idade: 8 a 10 semanas	Quantidade: 30
Linhagem:	BALB/c X10	Peso: 20 a 25 g			
Origem:	Biotério de Experimentação				
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	Idade: 8 a 10 semanas	Quantidade: 30
Linhagem:	C57BL6	Peso: 20 a 25 g			

São Paulo, 09 de maio de 2024

Prof. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista



ANEXO B – EMENDA DA CEUA



Universidade Paulista
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO : EMENDA 13/02/2025

Certificamos que a EMENDA (versão de 13/02/2025) da proposta intitulada "INFLUÊNCIA DA REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA NA PRODUÇÃO DE INSULINA POR LINFÓCITOS B-1", CEUA nº 9315220124 (00 075451), sob a responsabilidade de **Anuska Marcelino Alvares Saraiva** e equipe; Rodrigo Augusto Silva; THAIS ALVES BUENO - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) em 13/02/2025.

Término previsto: 07/2025

Origem:	Biotério de Experimentação		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 10 semanas
Linagem:	C57BL/6	Peso:	20 a 25 g
Origem:	Biotério de Experimentação		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 10 semanas
Linagem:	BALB/c	Peso:	20 a 25 g
Origem:	Biotério de Experimentação		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 10 semanas
Linagem:	BALB/c XID	Peso:	20 a 25 g

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Camundongos isogênicos	Machos	120	0

São Paulo, 25 de maio de 2025

Prof. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

