

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA
TESE DE DOUTORADO

**Avaliação de células-tronco mesenquimais murinas órgão-específicas quanto
à capacidade de diferenciação *in vitro* em células produtoras de insulina**

PATRÍCIA SESTERHEIM

Porto Alegre, 2010

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA
TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MURINAS ÓRGÃO-
ESPECÍFICAS QUANTO À CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* EM
CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA**

Patrícia Sesterheim

Tese para postular título de Doutor sob orientação:

Dr. Ivan Carlos Ferreira Antonello

Dr. David Saitovitch

Dra. Nance Beyer Nardi

PORTO ALEGRE
2010

Pai e Mãe

“Dou-lhes o sorriso que trago agora em minha face. O sorriso do trabalho, da luta, do carinho, da crença e da esperança que um dia espero ver na face dos meus filhos.

Dou-lhes também uma parte do meu futuro do qual vocês abriram mão para que me reservasse um mundo melhor. Dividam comigo os méritos dessa conquista, porque ela nos pertence; ela é tão vossa quanto minha!”

AGRADECIMENTOS

Grande é minha lista de agradecimentos o que faz de mim uma pessoa de muita sorte!

A Deus, pela minha vida e pela vida de todos que me cercam!

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, em especial a todos os professores da área de Nefrologia. O Programa é 6 (CAPES) e os professores são 10!!!

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde pelo tratamento carinhoso e solícito.

Aquele que foi sempre mais do que um preceptor, um amigo para a vida inteira, com quem tive o prazer de percorrer uma feliz trajetória acadêmica e ter inesquecíveis diálogos, David Saitovitch. Por algum motivo, que ainda desconheço, acreditou na minha capacidade e suscitou o meu amor pela pesquisa. Que esta tese não signifique o fim, mas o início de uma longa parceria científica, porque amizade a gente já conquistou há muito tempo e minha admiração por ti é imutável.

A Dra. Nance Beyer Nardi pela sua disponibilidade irrestrita e pelos conhecimentos disseminados. Sua forma exigente, crítica e criativa de arguir as idéias apresentadas deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de meus objetivos. Sua experiência na vida científica levou a ser extremamente generosa e paciente comigo diante dos *stop and go* que ocorreram ao longo da construção desta tese de doutorado. Tu não és apenas referência, mas um ícone. Feliz daqueles que a tem por perto!

Agradeço profundamente ao Dr. Ivan Carlos Ferreira Antonello, por ter assumido a orientação desta tese, com permanente solicitude dando importante colaboração na discussão do trabalho, dosando as críticas com comentários de incentivo. Minha admiração é enorme e me sinto presenteada pela sua participação nesta etapa do meu aprendizado. Muito obrigada!

Admiração, gratidão, carinho e amizade são alguns dos sentimentos que tenho por este que é um professor, Pedro Chagastelles. Estarei sempre em dívida, porque foi fundamental neste processo. Apresentou-me um mundo novo e

ultrapassou comigo, de forma muito presente, minhas limitações. Obrigada por todo conhecimento que dividiu comigo, te adoro demais, meu amigo!

Ainda hei de realizar este sonho, trabalhar e aprender ainda mais contigo, minha amiga Dra. Florência Barbé-Tuana. Tenho em ti o exemplo da ética, do saber, da amiga perfeita, da mãe exemplar. Tu sabes o quanto foi importante para concretização deste trabalho. Obrigada é pouco!

Ao Tiago Dalberto pela amizade, por se fazer sempre presente e prestativo. Por todo esforço e colaboração, pelos socorros moleculares...nem tenho palavras. Te carrego no meu coração e como explicar tanto carinho?!

Às alunas Bruna Madrugada e Marinalda Predebon, meu muito obrigada!

Ao Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular do Instituto de Cardiologia, em especial a Dra. Beatriz Schann e a Dra. Melissa Markoski pela confiança em ceder o espaço, tão bem equipado, para que as culturas celulares fossem mantidas. Muito obrigada.

A quem me apresentou a bancada de laboratório, dividiu comigo o conhecimento e, inicialmente, o espaço físico do Laboratório de Nefrologia (IPB/PUCRS) e hoje edificamos uma grande amizade. A ti, Dra. Bartira E. P. da Costa, minha admiração e meu especial carinho. Tens em mim uma eterna amiga.

Aos doutores Domingos O. D'Ávila e Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, não só por todo profissionalismo, mas pela singularidade em tratar cada aluno como se fosse único, valorizando cada acerto e conduzindo os erros ao aprendizado. A vocês meu respeito, minha admiração e meu carinho.

Ao imunopovo (Laboratório de Imunogenética da UFRGS), minha imunofamília, meu muito obrigada! Obrigada por cada ensinamento científico, intelectual e de vida. Por me adotarem e fazer eu me sentir tão querida, quase necessária! Eu sou muito feliz ao lado de vocês...

Obrigada ao Dr. Diogo Souza e a Dra. Fátima Guma por incentivarem o meu doutorado, por acreditarem em mim como bioterista responsável de um departamento tão cientificamente grandioso e produtivo como o Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS por conduzirem o trabalho tão bem na minha ausência, por me apoiarem e por dividirem comigo minhas ansiedades.

Às fontes financiadoras CNPq e FAPERGS.

Ao Biotério da Coordenação de Produção e Experimentação Animal da FEPPS, em especial a minha amiga Luisa Braga! É impressionante o sentimento que nos liga. Dividimos o amor à ciência de animais de laboratório, nossas conquistas, nossas tristezas. Conseguimos rir das desgraças e chorar de alegria uma pela outra. Te adoro. Obrigada, Lu!

Meu agradecimento mais do que especial, aos meus pais Arno e Liane Sesterheim! Ainda desconheço sentimento maior do que o amor que sinto por vocês. Pensei em tantas palavras para descrever a gratidão, a admiração que tenho, mas não há uma só que externe ou defina o que é ser filha de vocês. Um dia eu lhes disse: "se algum dia na vida eu sofri, vocês tanto fizeram por mim, que esqueci." Eu os amo muito!

Fostes a paciência em pessoa, acreditou mais em mim do que eu mesma. Ora foi meu refúgio, ora minha festa. Foi um verdadeiro parceiro, um facilitador nesta caminhada. Contigo, sou uma pessoa muito melhor. A ti, meu futuro marido, Evandro Paulo Weyermüller, meu agradecimento especial. Te amo!

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos começando... A certeza de que é preciso continuar... A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar... Fazemos da interrupção um caminho novo... Da queda, um passo de dança... Do medo, uma escada... Do sonho, uma ponte... Da procura, um encontro!”

Fernando Sabino, Certeza

FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Transplantes e Biologia Tumoral, do Instituto de Pesquisas Biomédicas, sob orientação do Dr. David Saitovitch, e no Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Nance Beyer Nardi.

As fontes financiadoras deste trabalho foram:

- **Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);**
- **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);**
- **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)**

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma síndrome auto-imune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva de células β produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas. A busca por alternativas terapêuticas para o DM1, voltadas à preservação e/ou regeneração da massa de células β e, conseqüentemente, à reconstituição do padrão fisiológico de secreção de insulina, tem sido exaustivamente realizada. Dentre as estratégias de tratamento estudadas, destaca-se a terapia celular baseada na utilização de células-tronco mesenquimais. Na busca por um produto que mimetize qualitativamente e quantitativamente as características das células β pancreáticas, protocolos devem ser aperfeiçoados e a capacidade de (trans)diferenciação de novas fontes celulares tecido-específicas devem ser exploradas. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade de expansão e diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais murinas, isoladas do rim, pâncreas e medula óssea, avaliando sua capacidade de diferenciação em células produtoras de insulina.

Evidenciou-se que estas populações celulares são capazes de se (trans) diferenciar em células com fenótipo pancreático endócrino, quando cultivadas em meio rico em indutores, incluindo morfologia esférica, formação de clusters, secreção de insulina (com a conseqüente coloração positiva para ditizona) e expressão *in vitro* do gene e da proteína da insulina-1. Além disso, células produtoras de insulina (CPIs) derivadas de células-tronco mesenquimais pancreáticas reverteram o estado hiperglicêmico quando transplantadas em cápsula renal de camundongos diabéticos, indicando que são capazes de diferenciarem-se *in vitro* em CPIs funcionais e de manterem esta funcionalidade *in vivo*.

ABSTRACT

Type I diabetes mellitus (DM1) is an organ-specific autoimmune syndrome characterized by the selective destruction of insulin-producing β cells in the pancreatic islets. The search for therapeutic alternatives for DM1, the β cell mass and consequently the reconstitution of physiological secretion of insulin have been extensively done. Among different treatments strategies studied, cell therapy based on mesenchymal stem cells is one of the most extensively studied. Searching for a product that mimics qualitative and quantitatively the characteristics of pancreatic β cells, protocols must be improved and the capacity of (trans) differentiation of new sources of tissue-specific must be explored. In this way, the aim of this work was to compare the capacity of expansion and differentiation *in vitro* of murine mesenchymal stem cells, isolated from kidney, pancreas and bone marrow, evaluating its capacity of differentiation into insulin-producing cells (IPCs).

From the results, it was evident that these cell populations were able to (trans) differentiate into the pancreatic endocrine cell-like phenotype. When cultured *in vitro* in a rich inducing-media, cells were characterized by cluster formation with spherical morphology, positive dithizone staining and expression of insulin-1 at the mRNA and protein level. Moreover, IPCs derived from mesenchymal stem cells reversed the pancreatic hyperglycemic state when transplanted into the kidney capsule of chemically induced diabetic mice, indicating that *in vitro* they are able to differentiate into functional IPCs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Microscopia de contraste de fase de mMSCs indiferenciadas, após a 4^a passagem, isoladas de rim (A), pâncreas (B) e MO(C) de camundongos BALB/c e cultivadas em meio completo. Aumento de 200X (B) e 400X (A e C)..... 50
- Figura 2 – Microscopia de contraste de fase de mMSCs indiferenciadas de rim (A-C), pâncreas (D-F) e MO (G-I) após 4 dias em cultura (A, D e G), 10 dias (B, E e H) e com mais de 30 dias em cultura (C, F e I). As setas vermelhas evidenciam a heterogeneidade celular da MO no início do cultivo. Aumento 50X (A) e 100X (B-I).
..... 51
- Figura 3 - Gráfico de comparação da cinética de crescimento das mMSCs oriundas de rim, pâncreas e MO. 52
- Figura 4 – Perfil imunofenotípico das mMSCs derivadas de rim. Os histogramas apresentam a expressão (traço preto) das moléculas selecionadas (Sca-1, CD13, CD11b, CD44, CD45, CD49e e CD90.2) comparadas com o controle isotípico negativo(traço vermelho). 53
- Figura 5 - Perfil imunofenotípico das mMSCs derivadas de pâncreas. Os histogramas apresentam a expressão (traço preto) das moléculas selecionadas (Sca-1, CD13, CD11b, CD44, CD45, CD49e e CD90.2) comparadas com o controle isotípico negativo(traço vermelho). 54
- Figura 6 - Perfil imunofenotípico das mMSCs derivadas de MO. Os histogramas apresentam a expressão ((traço preto) das moléculas selecionadas (CD11b, CD29, CD44, CD45, CD49e e CD90.2) comparadas com o controle isotípico negativo (traço colorido). 55
- Figura 7 – Diferenciação osteo e adipogênica de mMSCs, após a 4^a passagem, derivadas de pâncreas (A -C), rim (D-E) e MO(G-I). Depósitos de cálcio na matriz extra-celular foram corados com Alizarin Red S (B, E e H). Vacúolos de gordura corados com Oil Red O (C, F e I). MSCs cultivadas em meio completo mantêm o aspecto convencional em microscopia de contraste de fase (A, C e F). Aumento de 50X (H), 100X (A-G). 56
- Figura 8 - Microscopia de contraste de fase de mMSCs em meio indutor para diferenciação em células produtoras de insulina, conforme o protocolo I. Células indiferenciadas coradas com DTZ (em MC) oriundas de rim (A), pâncreas (C) e MO (E) e 11 dias após a incubação com meio indutor: rim (B), pâncreas (D) e MO (F) coradas com DTZ. Aumento de 50X (B, C e D) 100X (A, E e F). 57
- Figura 9 - Microscopia de contraste de fase de mMSCs em meio indutor para diferenciação em células produtoras de insulina. Células indiferenciadas coradas com DTZ (em MC) oriundas de rim (A), pâncreas (C) e MO (E) e 7 dias após a incubação com meio indutor: rim (B), pâncreas (D) e MO (F) coradas com DTZ. Aumento de 50X (B e F), 100X (A, C e E) e 400X (D). 58

- Figura 10 - Microscopia de contraste de fase de mMSCs em meio indutor suplementado com activina-A para diferenciação em células produtoras de insulina. Células indiferenciadas coradas com DTZ (em MC) oriundas de rim (A), pâncreas (D) e MO (G) e 3 dias após a incubação com meio indutor: rim (B e C), pâncreas (E e F) e MO (H e I) coradas com DTZ. Aumento de 50X (E e G), 100X (A, D e H), 200X(B e F) e 400X (C e I). 60
- Figura 11 - Microscopia de contraste de fase de mMSCs em meio indutor sem activina A para diferenciação em células produtoras de insulina. Células indiferenciadas coradas com DTZ (em MC) oriundas de rim (A) e pâncreas (D) e 3 dias após a incubação com meio indutor: rim (B e C) e pâncreas (E e F) coradas com DTZ. Aumento de 50X (D), 100X (A e B) e 400X (C, E e F). 60
- Figura 12 – (A) Expressão do gene da insulina 1 avaliada por RT-PCR em amostras de cDNA de mMSCs derivadas do pâncreas (MSCp), medula óssea (MSCmo), rim (MSCr) e controle positivo (C+), após 3 dias em meio indutor para CPI; M (marcador de peso molecular). (B) Gráfico das densidades ópticas das bandas de cada grupo, normalizadas pelo *Gapdh* (*software ImageJ 1.43*). 62
- Figura 13 – Expressão de insulina 1 avaliada por Western Blot, após 3 dias em meio indutor com (*) ou sem activina A para CPI em amostras de mMSCs derivadas do pâncreas (P), rim (R), medula óssea (MO), controle positivo (C+) e controle negativo (C-); M (marcador de peso molecular). 63
- Figura 14 – Gráficos de glicemia (A) e peso corporal (B) de camundongos BALB/c diabéticos induzidos, tratados com implante autólogo sub capsular renal de mMSCs oriundas de rim após ensaio de diferenciação em CPI. 64
- Figura 15 - Gráficos de glicemia (A) e peso corporal (B) de camundongos BALB/c diabéticos induzidos, tratados com implante autólogo sub capsular renal de mMSCs oriundas de pâncreas após ensaio de diferenciação em CPI. Glicose sanguínea dos animais antes e após transplante de mMSCs derivadas de pâncreas (C). Os dados são apresentados em média±DP ($n=4$ em cada grupo). $p<0.005$ ao comparar glicemia pré e após STZ. $**p<0.005$ ao comparar após STZ e após Tx. 65
- Figura 16 - Gráficos de glicemia (A) e peso corporal (B) de camundongos BALB/c diabéticos induzidos, tratados com implante autólogo sub capsular renal de mMSCs oriundas de pâncreas não diferenciadas. 66
- Figura 17 - Gráficos de glicemia (A) e peso corporal (B) de camundongos BALB/c diabéticos induzidos não tratados (controle). 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers empregados nos ensaios de RT-PCR para expressão gênica de insulina 1 e <i>Gapdh</i>	46
Tabela 2 - Descrição dos grupos experimentais.....	48
Tabela 3 – Amostras de mMSCs submetidas ao meio de diferenciação em CPI para avaliação da expressão gênica da insulina por RT-PCR.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

2B	– Calcineurina
IAA	– <i>Anti-Insulin Auto-Antibody</i>
BrdU	– <i>Bromodeoxyuridine</i>
C-	– Controle Negativo
C+	– Controle Positivo
Cbfa-1	– <i>Core Binding Factor Alpha1</i>
CD	– <i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	– <i>Complementary DNA</i>
DNA	– <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
CFU-F	– <i>Colony-Forming Unit Fibroblast</i>
CK-19	– <i>Cytokeratin 19</i>
CPI	– Célula Produtora de Insulina
DEPC	– Dietilpirocarbonato
DM	– Diabetes Mellitus
DM1	– Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	– Diabetes Mellitus Tipo 2
DMEM	– <i>Dulbecco'S Modified Eagle Medium</i>
DMEM-F12	– <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
dNTP	– <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>
DTT	– <i>Dithiothreitol</i>
DTZ	– Ditzona
EC	– <i>Embryonal Carcinoma</i>
EDTA	– <i>Ethylenediaminetetra-Acetic Acid</i>
EG	– <i>Embryonic Germinal Cell</i>
EGF	– <i>Epidermal Growth Factor</i>
ES	– <i>Embryonic Stem Cell</i>
FGF	– <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	– <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GAD-65	– <i>Glutamic acid decarboxylase 65</i>
<i>Gapdh</i>	– <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GHFr/c-Met	– <i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>

GLP-1	– <i>Glucagon Like-Peptide-1</i>
GLUT-4	– <i>Glucose Transporter 4</i>
HDL	– <i>High Density Lipoprotein</i>
HEPES	– <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HGF	– <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HLA	– <i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSC	– <i>Hematopoietic Stem Cell</i>
IA2	– <i>protein tyrosine phosphatase</i>
ICA	– <i>Islet Cell Antibody</i>
IFN- γ	– <i>Interferon-Gama</i>
IL-10	– <i>Interleukin 10</i>
IL-1 β	– <i>Interleukin-1 B</i>
IL-4	– <i>Interleukin 4</i>
lpf-1	– <i>Insulin promotor factor-1</i>
IR	– <i>Insulin receptor</i>
Isl-1	– <i>Islet transcription factor-1</i>
KGF	– <i>Keratinocyte Growth factor</i>
L-DMEM	– <i>Dulbeccos's Modified Eagles's Medium/ Low Glucose</i>
M	– <i>Marcador de Peso Molecular</i>
MAPC	– <i>Multipotent Adult Progenitor Cell</i>
MC	– <i>Meio completo</i>
M-MLV	– <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mMSC	– <i>murine Mesenchymal Stem Cell</i>
MO	– <i>Medula Óssea</i>
MSC	– <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MSCmo	– <i>Mesenchymal Stem Cell derivada de medula óssea</i>
MSCp	– <i>Mesenchymal Stem Cell derivada de pâncreas</i>
MSCr	– <i>Mesenchymal Stem Cell derivada de rim</i>
Ngn3	– <i>Neurogenin 3</i>
NK	– <i>Células Natural Killer</i>
NOD	– <i>Non-Obese Diabetic mouse</i>
P1 (2...)	– <i>Passagem celular</i>
pb	– <i>Pares de base</i>
PD	– <i>Population Doubling</i>

PDX-1	– <i>Pancreatic and Duodenal Homeobox 1</i>
PE	– <i>Phicoeritrin</i>
PPAR γ 2	– <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor 2</i>
RNA	– <i>Ribonucleic acid</i>
RNAase H	– <i>Ribonuclease H</i>
RNAse OUT	– <i>Ribonuclease OUT</i>
RT-PCR	– <i>Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	– <i>Soro Fetal Bovino</i>
Sca-1	– <i>Stem Cell Antigen-1</i>
SDS	– <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
STZ	– <i>Estreptozotocina</i>
TBS	– <i>Tris Buffered Saline</i>
TGF- β	– <i>Transforming Growth Factor β</i>
TGF β 1	– <i>Transforming Growth Factor β</i>
Th1	– <i>T helper 1 cell</i>
Th2	– <i>T helper 2 cell</i>
TNF- α	– <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
Tris-HCl	– <i>Tris-hidrocloroeto</i>
UCB	– <i>Umbilical Cord Blood</i>
VO	– <i>Via Oral</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 DIABETES MELLITUS	19
1.1.1 Diabetes Mellitus tipo 1	19
1.1.2 Diabetes Mellitus tipo 2	23
1.2 TERAPIAS NO DIABETES MELLITUS	24
1.2.1 Insulinoterapia	24
1.2.2 Transplante de Pâncreas	25
1.2.3 Transplante de Ilhotas Pancreáticas	26
1.3 CÉLULAS-TRONCO	28
1.3.1 Células-tronco embrionárias	29
1.3.2 Células-tronco do adulto – “células-tronco não embrionárias”	29
1.3.3 Células-tronco mesenquimais	31
1.4 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA (CPI)	33
1.4.1 Células-tronco mesenquimais extra-pancreáticas	33
1.4.2 Células-tronco mesenquimais pancreáticas	34
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 METODOLOGIA	39
3.1 ANIMAIS	39
3.2 ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MURINAS	40
3.2.1 Estabelecimento de cultivo de mMSCs a partir de medula óssea	40
3.2.2 Estabelecimento de cultivo de mMSCs a partir de pâncreas e rim	41
3.2.3 Caracterização das células-tronco mesenquimais murinas	42
3.2.3.1 <i>Análise morfológica qualitativa das mMSCs</i>	42
3.2.3.2 <i>Análise da expansão in vitro das células-tronco mesenquimais</i>	42
3.2.3.3 <i>Análise fenotípica das mMSCs por citometria de fluxo</i>	43

3.2.3.4	<i>Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica das mMSCs in vitro</i>	43
3.3	PROTOCOLO DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAS MURINAS EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA (CPI).....	44
3.3.1	Coloração com ditizona	45
3.3.2	Extração e purificação de RNA	45
3.3.3	Transcrição reversa	46
3.3.4	Reação em cadeia de polimerase – PCR	46
3.3.5	Avaliação da expressão de insulina por Western Blot	47
3.3.6	Implante de mMSCs em camundongos diabéticos induzidos	48
3.3.7	Estudo experimental cego	49
3.3.8	Análise estatística	49
4	RESULTADOS	
4.1	ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAS MURINAS	50
4.1.1	Análise morfológica qualitativa das mMSCs	50
4.1.2	Análise da expansão <i>in vitro</i> das células-tronco mesenquimais murinas	51
4.1.3	Análise fenotípica das mMSCs por citometria de fluxo	52
4.2	ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAS MURINAS EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA (CPI)	57
4.2.1	Protocolo I	57
4.2.2	Protocolo II	58
4.2.3	Protocolo III	59
4.2.4	Implante de mMSCs em camundongos diabéticos induzidos	63
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÃO	74
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO 1 - Artigo de revisão publicado na revista <i>Csientia Medica</i> : Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogenia auto-imune.....	92
	ANEXO 2 - Artigo submetido no dia 27 de maio de 2010 ao jornal <i>Biochemical and Biophysical Research Communication</i>	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

O Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas, heterogêneo do ponto de vista etiológico e clínico, mas tendo a hiperglicemia como denominador comum, além de distúrbios do metabolismo dos lipídios e proteínas, resultantes de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A hiperglicemia crônica está associada à retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença coronariana e insuficiência vascular periférica, entre outras (RECDCEM, 2003). A ampla maioria dos casos de DM é classificada como tipo 1 (DM1), onde há uma deficiência absoluta na secreção de insulina, ou tipo 2 (DM2), onde há uma combinação entre resistência à ação da insulina e resposta compensatória inadequada na secreção de insulina. Outros tipos, menos prevalentes, de DM foram recentemente classificados (ADA, 2004).

Um estudo realizado em 2009, envolvendo adultos de 91 países, com idade entre 20 a 79 anos, estima que a prevalência mundial de DM será de 6,4%, em 2010, afetando 285 milhões de pessoas, chegando a 439 milhões de adultos diabéticos em 2030, um aumento de 7,7% (Shaw *et al.*, 2009).

1.1.1 Diabetes Mellitus Tipo 1

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma síndrome auto-imune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva de células β produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas (Liu *et al.*, 2002). Dos casos de DM, apenas 5 a 10% são do tipo 1, previamente designada de DM insulino dependente, DM tipo 1 ou DM juvenil (RECDCEM, 2003). Considerada uma das doenças crônicas mais comuns entre crianças e adultos jovens, o DM1 pode se desenvolver em qualquer faixa etária, sendo mais freqüente antes dos 20 anos de idade. Acomete cerca de 0,3% da população caucasiana, com pico de início da doença entre os 11 e 12 anos de

idade. A instalação clínica é, geralmente, abrupta e com quadro clínico de cetoacidose, devido à falta absoluta de insulina (Liu *et al.*, 2002; Milech *et al.*, 2004).

O DM1 se caracteriza por ser uma doença multifatorial dependente da complexa interação entre fatores genéticos predisponentes, resposta imunológica, e influência do meio-ambiente na ativação de mecanismos predominantemente celulares anti-células β produtoras de insulina (Milech *et al.*, 2004; Devendra *et al.*, 2004). Dessa forma, viroses e exposição a substâncias químicas poderiam desencadear um processo autoimune em indivíduos com susceptibilidade genética à doença (RECDMD, 2003). O entendimento dos aspectos envolvidos no desenvolvimento desta patologia constitui a base para a detecção e prevenção do DM1. Ao contrário do que se admitia previamente, a evolução da doença não é aguda e sim um processo de auto-agressão lenta que provavelmente ocorre durante anos numa fase pré-clínica. No período de manifestação da doença, com a presença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já estão em número muito diminuído ou praticamente ausentes (Balda & Pacheco, 1999).

A presença de infiltrado inflamatório do tipo linfomononuclear, configurando insulite, e a ausência de células β viáveis caracterizam o quadro histológico do DM1. As células secretoras de outros hormônios, como glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, também presentes nas ilhotas pancreáticas, são poupadas. Entretanto, o predomínio numérico das células que secretam insulina termina por gerar atrofia das ilhotas (Balda & Pacheco, 1999).

A história natural do DM1 inclui quatro estágios distintos: (I) pré-clínico: auto-imunidade dirigida contra as células β , com uma diminuição lenta e progressiva da resposta insulínica à glicose intravenosa ou oral; (II) início do diabetes clínico; (III) remissão transitória; (IV) diabetes estabelecido associado a complicações agudas e crônicas (Rewers *et al.*, 1997). O estágio pré-clínico é caracterizado pela presença de auto-anticorpos contra constituintes da célula β pancreática, que participam da sua autodestruição. A descrição dos auto-anticorpos anti-ilhotas pancreáticas reforçou o papel da auto-imunidade na fisiopatologia do DM1 (Cesarini *et al.*, 2003).

Uma ampla variedade de marcadores, como os anticorpos anti-células das ilhotas (ICAs), anti-insulina (IAAs), anti-ácido glutâmico descarboxilase (GAD-65) e anti-tirosinas fosfatases IA-2 e 2B, estão relacionados com o desenvolvimento do DM1 (Koczwara *et al.*, 2003). Geralmente, pelo menos um entre estes marcadores está presente em 85-90% dos indivíduos com hiperglicemia de jejum, observada no

início da doença (RECDCEM, 2003). Embora o efeito patogênico destes auto-anticorpos não esteja bem caracterizado, a sua detecção possibilita rastrear indivíduos com risco elevado para o desenvolvimento da doença (Cesarini *et al.*, 2003). Doenças auto-imunes como o DM1 envolvem a interação de diferentes subpopulações de linfócitos e células apresentadoras de antígenos. Entre estas populações celulares, estão incluídos os linfócitos CD4 e CD8, células B, células NK (natural killer), macrófagos e células dendríticas, que globalmente desempenham importante papel na geração (e propagação) da resposta auto-imune (Elisenbarth *et al.*, 2006).

Em modelos animais, os camundongos NOD (do inglês, *non-obese diabetic*) são os mais utilizados para o estudo da doença espontânea em todo o mundo. Nestes animais, a destruição das células produtoras de insulina mimetiza a observada em humanos (Delovitch & Sigh, 1997; Rosmalen *et al.*, 2002; Elisenbarth *et al.*, 2005). Assim, análises imuno-histoquímicas de tecido pancreático revelam que os primeiros tipos celulares a infiltrarem as ilhotas de Langerhans, promovendo a insulite, são as células dendríticas e os macrófagos (Kadama *et al.*, 2003; Fernandes, 2005). A apresentação de auto-antígenos específicos das células β pancreáticas pelos macrófagos e/ou células dendríticas para os linfócitos T CD4⁺, em associação com as moléculas de histocompatibilidade de classe II, constitui-se como o primeiro evento no processo de auto-imunidade visto no DM1 (Fernandes, 2005).

Ativados, os macrófagos secretam citocinas que induzem a migração celular e estimulam vários tipos celulares a secretarem radicais livres, extremamente tóxicos às células β pancreáticas. Durante o processo de insulite, que parece ocorrer com maior intensidade em ilhotas onde existam células β metabolicamente ativas, os linfócitos citotóxicos TCD8⁺ são as células predominantes. Tais linfócitos, após reconhecimento do auto-antígenos pancreáticos ligado à molécula HLA de classe I, efetuam a destruição das células β por citólise através da liberação de perforinas e granzimas, e também por indução de apoptose. Dessa maneira, macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos TCD8⁺ atuam sinergicamente na destruição das células β pancreáticas (Fernandes, 2005; Kulmala *et al.*, 2000). O linfócito T CD-4 ativado secreta várias citocinas, cuja principal ação é promover a proliferação e a diferenciação de linfócitos T e de outras células, incluindo linfócitos B e macrófagos. A liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF-

α), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-1 β (IL-1 β) por células apresentadoras de antígeno e células T favorece a iniciação e a perpetuação da resposta inflamatória e auto-imune no DM1. (Matarese *et al.*, 2002).

A simples observação de que a prevalência da doença é mais alta entre os familiares de indivíduos afetados do que na população geral sugere que fatores genéticos são importantes no seu estabelecimento. Risco aumentado é observado em parentes de primeiro grau de uma pessoa afetada pela doença. Porém, 85% de casos novos não contemplam tal linhagem familiar (Kulmala, 2003).

Quanto aos determinantes ambientais, os mais estudados no DM1 podem ser classificados em 3 grupos: infecções virais (citomegalovírose, rubéola, caxumba, sarampo), dieta precoce na infância (amamentação versus introdução precoce de ingredientes do leite de vaca, cereais e glúten) e toxinas (por exemplo, derivados de N-nitroso). Outros fatores não-genéticos modificadores da doença incluem estresse emocional, influências climáticas, sazonalidade, agentes sanitários e acesso aos cuidados de saúde (Rewers *et al.*, 1997; Devendra *et al.*, 2004; Atkinson *et al.*, 2002). De acordo com Atkinson e Eisenbarth, os agentes ambientais agem como modificadores da patogênese da doença, podendo servir como “gatilhos” (Atkinson *et al.*, 2002). A liberação local de citocinas pró-inflamatórias decorrentes de infecção viral constitui fator central na perda da tolerância aos auto-antígenos e na ativação de linfócitos autorreativos. A associação entre os processos de inflamação e auto-imunidade tem sido extensamente ligada à ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas no local da lesão. Em adição, tais citocinas são capazes de recrutar e ativar células apresentadoras de antígenos e linfócitos T autorreativos, o que perpetua o processo de auto-imunidade nas ilhotas (Obayashi *et al.*, 2000).

O evento imunológico inicial no desenvolvimento da doença, decorrente da infecção viral, parece ser a produção de interferon-gama (IFN-g) pelas células β produtoras de insulina. A secreção dessa citocina está associada à hiper-expressão das moléculas HLA de classe I e de classe II na superfície de células β . A partir desses eventos, a apresentação de auto-antígenos pelas células β pancreáticas aos linfócitos T auto-reativos pode ocorrer, dando início à cascata de processos inflamatórios, que culminam na insulite (Obayashi *et al.*, 2000).

1.1.2 Diabetes Mellitus Tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a doença metabólica degenerativa mais prevalente no mundo, afetando 95% dos pacientes diabéticos. Ocorre principalmente em adultos e está diretamente relacionada com predisposição, componentes inflamatórios e determinações ambientais como obesidade, hábitos alimentares e sedentarismo (Zimet *et al.*, 2001; Kolb *et al.*, 2005). Caracteriza-se pela combinação de resistência à ação da insulina, pela diminuição da habilidade do hormônio em promover a remoção de glicose da circulação pelos tecidos periféricos que possuem receptores de insulina, e à incapacidade da célula β pancreática em manter uma adequada secreção de insulina (Cefalu, 2001; Skiller, 2004).

A resistência à ação da insulina tem papel fundamental no aparecimento da síndrome metabólica. No tecido periférico dependente de insulina, ocorre um defeito intracelular pós-receptor na sinalização da insulina. Há bloqueio na fosforilação em tirosina dos substratos protéicos dos receptores de insulina (IRS), o que impede a transativação do GLUT 4 e, conseqüentemente, a entrada da glicose para o interior da célula. Isso faz com que maiores quantidades de insulina sejam secretadas pelas células β pancreáticas, criando um estado de hiperinsulinemia compensatória. Esse excesso de insulina resultante consegue, durante certo tempo, manter a glicemia dentro dos níveis da normalidade, mas acaba determinando importantes alterações em todo organismo. A mais conhecida é a extensa deposição centrípeta da gordura corporal, conhecida como obesidade central ou visceral, onde ocorre grande aumento da gordura abdominal, em detrimento dos membros. Outros efeitos incluem o aumento da pressão arterial e dos níveis séricos de triglicérides e redução dos valores de HDL colesterol, com ou sem hiperglicemia. A presença de três ou mais dessas manifestações caracteriza a síndrome metabólica ou síndrome de resistência insulínica (Tambascia *et al.*, 2005; Zecchin *et al.*, 2005).

A progressão da doença leva à descompensação e insuficiência das células beta. Entre os mecanismos envolvidos destacam-se disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, alteração no ciclo dos ácidos graxos/triglicérides e a glicolipototoxicidade, levando à inflamação das ilhotas, glicosilação inadequada e depósitos amilóides que aceleram a perda da função das células beta e apoptose (Prentki & Nolan, 2006). Embora possuam etiologias diferentes, ambos tipos de diabetes têm como

característica fisiopatológica comum a perda de massa de células β , porém com maior intensidade no DM1 (Voltarelli *et al.*, 2009).

1.2 TERAPIAS NO DIABETES MELLITUS

Os objetivos principais da terapia no diabetes são proporcionar uma quantidade adequada de insulina para normalizar o metabolismo intermediário, reduzir lentamente a concentração sanguínea de glicose, restaurar as perdas hídricas e eletrolíticas, corrigir a acidose e identificar os fatores precipitantes, como por exemplo, estados infecciosos do trato respiratório ou das vias urinárias. No DM1, o tratamento clássico é a administração de insulina exógena, tendo-se em vista a ausência de tal hormônio no organismo. O tratamento intensivo é responsável por reduções de 35% a 90% nas complicações microvasculares relacionadas ao DM1 (Committe Report, 2003). Mudanças dietéticas e exercícios físicos regulares, entre outras, fazem parte das orientações fornecidas aos pacientes. Já no DM2, a ênfase é dada à dieta para a perda de peso, associada a um complexo de orientações que visem uma vida “mais saudável”, como exercícios físicos regulares, evitar tabagismo e etilismo, avaliação regular da pressão arterial e lipídeos plasmáticos, corrigindo-os sempre que houver a necessidade, entre outros.

1.2.1 Insulinoterapia

Embora Paul Langerhans tenha descoberto no pâncreas, em 1869, agregados celulares, os quais denominou ilhotas de Langerhans, constituídos de células β especializadas na produção de insulina, foi apenas em 1921 que a purificação deste hormônio foi realizada de modo eficaz por Frederick Banting, Charles Best, James Collip e John Mcleod. Em janeiro de 1922, esses cientistas usaram, pela primeira vez, a insulina para tratar um paciente diabético (ADS, 2002). O isolamento e a produção em escala industrial da insulina provocaram uma revolução no tratamento da doença, pois a transformaram de doença rapidamente

fatal em crônica. O aumento da expectativa de vida acarretou o surgimento das complicações crônicas, que ocorrem cerca de 10 a 20 anos após o diagnóstico, no caso do DM1.

O tratamento padrão consiste de injeções diárias de insulina exógena, via subcutânea, e um controle rigoroso dos níveis de glicose sanguínea nesses pacientes, podendo ocorrer episódios frequentes de hipoglicemia grave. A importância do controle rigoroso da glicemia sobre a diminuição da progressão das complicações crônicas do DM ainda é assunto controvertido e de intenso debate. Dois estudos, entretanto, evidenciaram que o controle rigoroso da glicemia retarda a evolução da doença, seja no DM1 (DCCTRG, 1993) ou no DM2 (Mazonne, 2009;Ray et al. 2009). Embora a terapia com insulina seja eficaz, este é um tratamento que corrige a hiperglicemia de forma flutuante, intermitente. Desta maneira, geralmente os níveis médios atingidos ficam aquém do esperado. Além disso, a adesão ao tratamento pode ser comprometida devido à necessidade de injeções diárias.

Dentre as estratégias de tratamento definitivo, corrigindo a insulino-dependência para o diabetes tipo 1, podemos citar o transplante de pâncreas, o transplante de ilhotas pancreáticas e, mais recentemente, o bloqueio da autoimunidade e a terapia celular baseada na utilização de células-tronco (Efrat, 2004, Voltarelli *et al.*, 2007).

1.2.2 Transplante de Pâncreas

Em 1966, Kelly e colaboradores realizaram o primeiro transplante de pâncreas entre humanos (Kelly, 1967). Desde então, o transplante alogeneico de pâncreas é bastante utilizado, sendo ainda o único tratamento que consegue restaurar e manter, com taxa satisfatória de sucesso e por tempo prolongado, a normoglicemia em portadores de DM1. Porém, ainda apresenta desvantagens como mortalidade peri-operatória e taxa de morbidade não desprezível, além da necessidade de administração de drogas imunossupressoras para evitar a rejeição do órgão. Assim, a principal indicação desta abordagem é para pacientes com insuficiência renal em estágio 4 ou 5, associada ao transplante renal. Ainda, está

também indicada para diabéticos tipo 1 com transplante renal prévio funcionando e, em casos excepcionais, onde há controle metabólico difícil, com crises de hipoglicemia grave (geralmente, assintomáticas), ou ainda, em casos onde há problemas emocionais sérios com as injeções diárias de insulina (ADS, 2002).

Embora controverso, vários estudos confirmam estabilização ou melhora de algumas das complicações crônicas do diabetes e mesmo ganho em anos de vida para pacientes submetidos ao transplante duplo de pâncreas e rim. Por outro lado, pesquisadores têm demonstrado resultados conflitantes em relação ao transplante isolado de pâncreas, o que reforça a necessidade de uma seleção criteriosa de pacientes para este procedimento. Outro obstáculo a ser superado é a disponibilidade de órgãos, o que limita bastante o número de pacientes beneficiados.

1.2.3 Transplante de Ilhotas Pancreáticas

O médico britânico Patrick Watson-Williams, em 1894, realizou o primeiro implante subcutâneo de fragmentos de tecido pancreático de uma ovelha para tratar um jovem diabético de 13 anos morrendo de cetoacidose. Eles observaram melhora temporária do nível glicêmico, mas o rapaz rejeitou o xenoenxerto e morreu 3 dias depois. Entre 1974 e 2003, foram realizados 705 transplantes de ilhotas pancreáticas em paciente com diabetes tipo 1 (ADS, 2002). O transplante de ilhotas oferece vantagens em comparação ao transplante de pâncreas por ser um procedimento menos invasivo, já que as ilhotas são isoladas do pâncreas de doadores falecidos e injetadas, via percutânea, na veia porta, ficando depositadas no fígado. Contudo, ainda é considerado um tratamento experimental.

Muitos grupos estão empenhados em aumentar a eficácia dos transplantes, para que um número maior de pacientes alcance independência da insulina. O primeiro estudo com resultados satisfatórios foi realizado por um grupo canadense da Universidade de Alberta, em Edmonton. Sete pacientes com diabetes tipo 1 que apresentavam hipoglicemia severa e instabilidade metabólica foram submetidos ao transplantes de ilhotas pancreáticas. Todos os pacientes alcançaram independência de insulina em um ano de acompanhamento, mostrando uma alta taxa de sucesso quando imunossuppressores não glicocorticóides foram usados e um número

adequado de ilhotas foi infundido (Shapiro *et al.*, 2000). Com a aplicação desse protocolo, denominado Protocolo de Edmonton, a porcentagem de pacientes alcançando independência de insulina aumentou para 50-80% (ADS, 2002). Entretanto, Ryan e colaboradores publicaram os resultados do acompanhamento de 65 pacientes que receberam transplante de ilhotas aplicando o Protocolo de Edmonton mostrando que, após 5 anos, apenas 10% dos pacientes transplantados permaneciam independentes de insulina (Ryan *et al.*, 2005). O transplante de ilhotas seguindo este protocolo ou suas variantes, foi realizado em mais de 500 pacientes de 53 centros, incluindo o Núcleo de Terapia Celular e Molecular (Nucel) (Eliaschewitz *et al.*, 2009).

A taxa de sucesso, medida pela insulino-independência em um ano, obtida nos três centros com maior experiência na América do Norte (Edmonton, Miami e Minneapolis) com a infusão de ilhotas obtidas de 1 a 4 pâncreas é de 82% (nos demais centros varia de 0% a 63%) e em todos se observa perda progressiva da insulino-independência. Três anos após o transplante, 50% dos pacientes permanecem livres de insulina e após cinco anos, apenas 13% dos pacientes não necessitam de insulina para controlar a sua glicemia. No entanto, o peptídeo C continua detectável em 80% dos pacientes e esta secreção residual da insulina traz o benefício da melhora ou o desaparecimento da labilidade, uma grande redução dos eventos hipoglicêmicos e da manutenção da hemoglobina glicada (A1c) dentro das metas recomendadas. A taxa de sobrevivência, um ano após o transplante, é de 97%, mas apenas 20% dos pacientes se tornam independentes de insulina (Eliaschewitz *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2005; Shapiro, 2006).

Um conjunto de fatores deve ser considerado para o sucesso do transplante, como minimização dos efeitos nocivos da preservação e do processamento das células durante o transplante, diminuição dos efeitos tóxicos sobre as ilhotas com o uso de imunossupressores não esteróides e padronização do número de células injetadas para suprir a produção de insulina e restaurar a glicemia em longo prazo. Não se podem ignorar os riscos de uma terapia a longo prazo com imunossupressores, como nefrotoxicidade entre outras complicações, sendo importante determinar o risco/benefício para os pacientes que irão receber esse tipo de tratamento (Stevens *et al.*, 2001). Um problema em potencial, que tem sido debatido recentemente entre os transplantadores de ilhotas pancreáticas, é a sensibilização imunológica contra antígenos HLA após este tipo de transplante. Este

parece ser um evento comum e põe em risco (ou, torna mais difícil a possibilidade de) transplantes futuros que possam vir a ser necessários, como de pâncreas ou rim (Campbell, *et al.*, 2007). Ainda, são necessários de 2 a 4 pâncreas para isolar o número de ilhotas (cerca de 850.000) adequado ao objetivo: conseguir a independência da insulina em um único paciente diabético (Senior, 2007). Assim, entre outras preocupações técnicas e financeiras que envolvem o procedimento, questões éticas devem ser abordadas, uma vez que os pâncreas, potencialmente aptos ao transplante total, são retirados do *pool* escasso de doadores (Ruggenti, 2008; Bromberg *et al.*, 2007 Robertson *et al.*, 2006).

Diante destes inconvenientes como problemas de rejeição, protocolos imunossupressores e a fonte escassa de doadores e, conseqüentemente, a insuficiência de células β pancreáticas, nos últimos anos se têm buscado fontes alternativas para obtenção dessas células, utilizando principalmente células-tronco de diferentes origens (Sharfmann, 2003). O potencial de células-tronco embrionárias na diferenciação de células β já foi demonstrado e muitos estudos têm sugerido a capacidade das células-tronco do adulto isoladas de diferentes órgãos e tecidos como adiposo, medula óssea (MO), intestino, baço, fígado e pâncreas neste processo (Soria, *et al.*, 2000).

1.3 CÉLULAS-TRONCO

Nos últimos vinte anos observou-se um crescente interesse no estudo do transplante celular para o tratamento do DM. O sucesso desta forma de terapia representaria a cura do DM com o fim de aplicações de insulina exógena, da monitorização da glicemia e do controle da dieta na tentativa de se manter a homeostase metabólica e de se reduzir a ocorrência das complicações tardias.

As células-tronco, por definição, devem ter capacidade ilimitada ou prolongada de auto-renovação, originando células indiferenciadas com as mesmas características, e ser capazes de se diferenciar em pelo menos um tipo celular especializado (Watt & Hogan, 2000).

Essas células podem ser classificadas quanto à origem em células-tronco embrionárias ou adultas, porém somente o zigoto e células derivadas das primeiras

divisões celulares são capazes de originar um organismo completo, sendo denominadas totipotentes.

1.3.1 Células-tronco embrionárias

Células pluripotentes são obtidas da massa celular interna de blastocistos pré-implantação e são denominadas células-tronco embrionárias (ES, do inglês *embryonic stem cell*), também podendo ser obtidas de células germinais primordiais (EG, do inglês *embryonic germinal cell*) retiradas da gônada de fetos ou carcinomas embrionários (EC, do inglês *embryonal carcinoma*). Essas células podem ser mantidas indefinidamente *in vitro* e são capazes de originar qualquer tipo celular do organismo. As células-tronco embrionárias representam uma ferramenta importante de estudo para o desenvolvimento de diversos tecidos (Hirashima, 1999). Muitos sistemas de diferenciação *in vitro* têm sido desenvolvidos para células-tronco embrionárias murinas, incluindo métodos reprodutíveis de diferenciação em precursores hematopoiéticos e neurais, cardiomiócitos, células secretoras de insulina, células endoteliais e vários outros tipos celulares (Amit & Itskovitz-Eldor, 2002).

Embora tenham características de grande interesse e diversas aplicações clínicas, existem restrições quanto ao potencial oncogênico e de rejeição ao hospedeiro que limitam o estudo e uso de células-tronco embrionárias humanas, sendo pesquisadas outras fontes para uso em terapias celulares (Thomson *et al.*, 1998; Donovan *et al.*, 2001; Wang, 2000).

1.3.2 Célula-tronco do adulto – “Células-tronco não embrionárias”

Mesmo em um organismo adulto, ainda persiste a necessidade de reposição de células, devido a processos como o *turnover* natural que ocorre em praticamente todos os tecidos e a lesões decorrentes de vários tipos de agressões. Esta reposição é feita, na maioria dos casos, a partir de uma pequena parcela de células que ainda permanece indiferenciada, as células-tronco do adulto.

A célula-tronco hematopoiética (HSC- *Hematopoietic stem cell*), por exemplo, é capaz de originar todos os tipos celulares do sangue, como eritrócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos (Nardi & Alfonso, 1999; Huss, 2000). Outros tipos conhecidos incluem a célula-tronco neural (Pagano *et al.*, 2000), epitelial (Morris *et al.*, 2004), hepática (He *et al.*, 2003) e mesenquimal (Pittenger *et al.*, 1999), entre outras. As células que compõem o sangue precisam ser constantemente repostas, e o local onde ocorre a hematopoiese após o nascimento é a medula óssea de ossos longos e chatos (Junqueira & Carneiro, 1999). As células sangüíneas são formadas a partir da célula-tronco hematopoiética, que num processo contínuo que envolve proliferação e diferenciação celular produzindo classes de progenitores e precursores cada vez mais comprometidos com determinados tipos celulares, culmina em células altamente diferenciadas e com funções específicas no organismo (Nardi & Alfonso, 1999).

Uma das etapas para a utilização das células-tronco nos seus vários âmbitos é o estabelecimento das condições de cultura apropriadas, que possibilitem sua expansão *in vitro*. Muitos avanços já foram feitos para o cultivo de HSC isoladas tanto da MO quanto de sangue de cordão umbilical (UCB, do inglês *umbilical cord blood*) (61,62), necessários devido à baixa freqüência dessas células na MO e UCB (0,5 – 1,0 %). A medula óssea contém, além da célula-tronco hematopoiética, uma outra população celular com características de célula-tronco, as células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês *mesenchymal stem cells*) (Huss, 2000; Friedenstein, 1976), com capacidade de diferenciação *in vitro* em células derivadas da linhagem mesenquimal, tais como adipócitos, osteoblastos, condrócitos e miócitos (Meirelles & Nardi, 2003). Células-tronco de adultos já foram isoladas de diferentes órgãos e tecidos, sendo uma fonte alternativa ao uso de ES (Prockop, 1997). Embora ainda seja muito controversa a questão da plasticidade dessas células, estudos recentes apontam para um aumento do potencial das células de adultos em relação ao inicialmente considerado.

Muitos trabalhos exploram a questão da plasticidade das células-tronco de adultos, ou seja, a capacidade que essas células têm de ultrapassar barreiras de linhagens e adotar o fenótipo e o padrão de expressão gênica de células de outros tecidos. Acreditava-se que estas células apresentassem uma plasticidade limitada, formando apenas alguns tipos celulares, geralmente aqueles do tecido do qual foram isoladas, por isso também chamadas de células-tronco tecido-específicas (Herzog

et al., 2003). Pesquisas recentes apontam para uma plasticidade das células-tronco tecido-específicas bem maior que o inicialmente suposto, mostrando que podem formar um repertório mais amplo de células especializadas. Os estudos iniciais, mostrando que células-tronco do adulto poderiam originar inclusive células com origens embrionárias diferentes (Jiang *et al.*, 2002a) foram, entretanto, desacreditados (Raff, 2003), acreditando-se hoje que esta plasticidade seja mais restrita.

A hipótese de fusão é sustentada por experimentos que mostram a ocorrência de fusão espontânea entre ES e células-tronco neurais (Ying *et al.*, 2002) ou células da medula óssea (Terada *et al.*, 2000), quando co-cultivadas. Esses trabalhos colocam em dúvida o fenômeno da transdiferenciação visto em outros trabalhos (Lagasse *et al.*, 2000), sugerindo que a plasticidade da célula-tronco pode estar relacionada à capacidade de se fundir com células do tecido lesado. É importante ressaltar que esses mecanismos não são mutuamente exclusivos, podendo ocorrer simultaneamente no organismo. A questão da plasticidade das células-tronco de adultos não foi totalmente elucidada. Alguns estudos apontam para a existência de uma célula ainda mais primitiva que as células-tronco tecido-específicas. As denominadas células progenitoras multipotentes de adultos (MAPCs do inglês *multipotent adult progenitor cells*) foram isoladas conjuntamente em culturas de MSCs de camundongos (Reyes *et al.*, 2001) e humanos (Jiang *et al.*, 2002b). MAPCs foram encontradas em órgãos como MO, músculo e cérebro de camundongos, e são capazes de se diferenciar em tipos celulares derivados dos três folhetos embrionários (Jiang *et al.*, 2002b). Entretanto, outros grupos ainda não conseguiram isolar MAPCs e reproduzir os resultados obtidos nesses trabalhos.

1.3.3 Células-tronco mesenquimais

Ainda não há um consenso entre os pesquisadores sobre a definição de MSCs. Desde os primeiros estudos até hoje, as MSCs já receberam várias denominações. Inicialmente, foram chamadas de unidades formadoras de colônia de fibroblasto (CFU-F, do inglês *colony-forming unit fibroblast*), passando a células

progenitoras mesenquimais, células de estroma de medula óssea à nomenclatura atual de células-tronco mesenquimais (Meirelles & Nardi, 2003; Phinney, 2002).

Diversos estudos mostram que, em ambientes adequados, as MSCs são capazes de se diferenciar em células de tecido mesodermal, endodermal e até mesmo células ectodérmicas (Lagasse *et al.*, 2000; Ferrari *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2001; Kopen *et al.*, 1999; Meirelles & Nardi, 2003).

Muitas tentativas de estabelecimento de cultivo de MSCs têm sido feitas utilizando-se diferentes metodologias, a fim de estabelecer condições de cultivo que mantenham suas características. O principal método de isolamento explora a capacidade que essas células têm de aderirem a diferentes substratos, possibilitando a remoção de células não aderentes contaminantes (principalmente células de origem hematopoiética) (DiGirolamo *et al.*, 1999; Banfi *et al.*, 2000). Os trabalhos com MSCs procuram caracterizar essas células quanto à morfologia e padrão fenotípico, determinando o perfil de marcadores de superfície em suas membranas, na tentativa de encontrar um marcador específico que permita seu isolamento. Diferentemente das HSCs, nenhum marcador se mostrou exclusivo para MSCs embora alguns deles sejam usados para obter uma fração enriquecida dessas células (Quirici *et al.*, 2002).

Outra característica importante das MSCs é sua capacidade de modulação da resposta imune. O papel imunossupressor das células-tronco mesenquimais pode ser evidenciado tanto em células autólogas quanto alogênicas (Aggarwal & Pittenger, 2005) e xenogênicas (Liu *et al.*, 2004).

MSCs humanas inibem a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, por um mecanismo dose-dependente e não apoptótico, mediado por fatores solúveis como TGFβ1 e HGF (DiNicola *et al.*, 2002). Essa inibição só ocorre antes da fase efetora, inibindo a formação de linfócitos ativos e NKs. Outro dado importante é que MSCs escapam da lise de linfócitos T citotóxicos e células NK alogênicos (Rasmusson *et al.*, 2003). Isto não seria esperado, pois MSCs apresentam antígenos via MHC classe I, alvos para lise de linfócitos T citotóxicos (Le Banc *et al.*, 2003) e NKs lisam células que expressam HLA I alogênico (Ruggeri *et al.*, 2001).

Em um trabalho recente, Aggarwal e Pittenger mostraram a função imunoregulatória *in vitro* das MSCs isoladas da medula óssea de humanos sobre diferentes populações de células do sistema imune (Aggarwal & Pittenger, 2005). De uma maneira geral, as MSCs desempenharam seu papel alterando o padrão de

secreção de diversas citocinas em células envolvidas no processo inflamatório. Essa modificação favorece a liberação de substâncias anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10, inibindo citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ . Adicionalmente, as MSCs parecem alterar o padrão de resposta de Th1 para Th2. Assim, o transplante de MSCs pode ser bastante interessante no tratamento de doenças autoimunes, transplantes de órgãos e Doença do Enxerto contra Hospedeiro, bem como em processos inflamatórios.

Um ponto que é alvo de muitas pesquisas, mas ainda não está bem definido, refere-se à possibilidade de que a capacidade imunomoduladora das MSC possibilite que se evite a rejeição de órgãos em procedimentos clínicos, substituindo assim os imunossuppressores convencionais.

Vários estudos têm indicado que MSCs podem ser obtidas de vários outros tecidos, além da medula óssea, e foi recentemente demonstrado que estas células estão distribuídas por todo o organismo (da Silva Meirelles *et al.*, 2006). MSCs coletadas de diferentes tecidos apresentam um padrão geral semelhante, quanto a características como imunofenótipo, plasticidade, etc, mas algumas diferenças sugerem que outras características biológicas sejam específicas. Esta ampla distribuição sugere ainda que as MSCs têm outras funções no organismo, sendo sugerido um papel regulador da homeostasia (da Silva Meirelles *et al.*, 2008).

1.4 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA (CPI)

Uma das abordagens na utilização de células-tronco como fonte de células para o tratamento do diabetes é sua diferenciação em células produtoras de insulina, sob condições específicas, e posterior transplante em animais diabéticos.

1.4.1 Células-tronco mesenquimais extra-pancreáticas

O processo através do qual células precursoras se diferenciam em outros tipos celulares, não relacionados ao seu tecido original, é chamado de transdiferenciação (Zhang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). Estratégias para induzir esta transdiferenciação se assemelham às usadas nos protocolos baseados em células embrionárias. Contudo, a transdiferenciação em células β a partir de células-tronco mesenquimais extra-pancreáticas é direcionada por determinantes ainda desconhecidos, que incluem interações célula-célula, sinais da matriz extracelular e a presença de combinações de fatores de crescimento, hormônios, citocinas e nutrientes (Roche *et al.*, 2003).

Células-tronco hepáticas (Yang *et al.*, 2002; Zalzman *et al.* 2003;Kojima *et al.*, 2003; Nakajima-Nagata *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005), células derivadas de tecido adiposo (Timper *et al.*, 2006), células-tronco intestinais (Fujita *et al.* 2004) e de esplenócitos (Kodama *et al.*,2003) têm sido estudadas na tentativa de induzir sua diferenciação em células produtoras de insulina. Quanto às células-tronco mesenquimais isoladas da MO, vários estudos buscam sua capacidade de diferenciação *in vitro* em células β , utilizando indutores como alta concentração de glicose e meio enriquecido com nicotinamida, controlando os níveis glicêmicos de camundongos diabéticos quando transplantadas (Tang *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2004; Chen *et al.*,2004; Wu *et al.*, 2007). Além dos indutores citados, destacam-se a ativina-A, a β -celulina e os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês *Fibroblast Growth Factor*), epidermal (EGF, do inglês *Epidermal Growth Factor*) e de hepatócitos (HGF, do inglês *Hepatocyte Growth Factor*) como potenciais promotores de diferenciação em células β pancreáticas (Sun *et al.*, 2007; Karnieli *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Outra estratégia bastante usada na transdiferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina é a transdução de fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento das células pancreáticas, como por exemplo o PDX-1 e MafA (Karnieli *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2009; Matsuoka *et al.*, 2007).

1.4.2 Células-tronco mesenquimais pancreáticas

Acredita-se que o pâncreas adulto, assim como outros órgãos e tecidos, possui seu próprio compartimento de células-tronco que são capazes de uma contínua auto-renovação, podendo se diferenciar em células pancreáticas.

Ainda existe controvérsia sobre a localização das células-tronco isoladas do pâncreas. Trabalhos mostram que elas podem ser encontradas tanto nos ductos pancreáticos quanto nas ilhotas (Lechner *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2003; Bonner-Weir *et al.*, 2000).

Evidências sugerem que células-tronco e células progenitoras estão presentes nas células ductais pancreáticas, expressando os marcadores citoqueratina 19 (CK-19, do inglês *cytokeratin 19*) e PDX-1 (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*), onde se diferenciam e migram para formar novas ilhotas tanto na organogênese quanto na regeneração tecidual (Lee *et al.*, 2004). A capacidade das células ductais em diferenciarem-se em CPI foi evidenciada por Bonner-Weir e colaboradores, em 2002. O grupo avaliou a capacidade de diferenciação das células ductais pancreáticas humanas cultivadas em Matrigel. Semanas após o isolamento, os agrupamentos celulares que se formaram, semelhantes a ilhotas, secretavam insulina *in vitro* e apresentavam reatividade para CK-19.

Ramiya e colaboradores descreveram, pela primeira vez, a geração *in vitro* de ilhotas pancreáticas a partir de células epiteliais do ducto pancreático de camundongos NOD (*non obese diabetes*) pré-diabéticos. Quando transplantadas em camundongos diabéticos, estas ilhotas compostas de células β e δ , reverteram o diabetes (Ramiya *et al.*, 2000). Utilizando uma metodologia de marcação com BrdU, Duvillie e colaboradores, conseguiram identificar células que, assim como as células-tronco, possuem as características de ciclos lentos de divisão, portanto, permanecem marcadas com o BrdU. Essas células foram encontradas no interior e à margem das ilhotas. Adicionalmente, foi possível mostrar que células BrdU positivas eram capazes de se diferenciar *in vitro* em células β . Sabe-se que as ilhotas pancreáticas são permeadas por uma rede de capilares, dessa forma, pode-se pensar que as células BrdU positivas podem estar envolvendo essa rede de capilares nas ilhotas (Duvillie *et al.*, 2003; Lechner *et al.*, 2005). Esses trabalhos reforçam os resultados encontrados pelo grupo de Meirelles e colaboradores, que propõem que células-tronco mesenquimais teriam uma localização perivascular (Meirelles, Chagastelles & Nardi, 2006).

Embora haja poucos estudos identificando células-tronco derivadas de células insulares, estudos mostram a população de células insulino-positivas reaparecendo nas ilhotas após a destruição das células β com estreptozotocina (STZ) (Guz *et al.* 2001). As células progenitoras nestina-positivas derivadas de ilhotas têm uma alta capacidade de proliferação *in vivo*, podendo se diferenciar *in vitro* em células com fenótipo hepático, pancreático exócrino e/ou ductal e endócrino, produzindo insulina, glucagon, GLP-1 e PDX-1 (Zulewski *et al.*, 2001). No entanto, a nestina não está só presente no pâncreas endócrino, células-tronco nestina-positivas derivadas de ductos pancreáticos também possuem características de precursores de células β , com expressão de PDX-1 (Nagasao, *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004).

Wang e colaboradores sugerem que o HGF é um potente regulador da função, proliferação e diferenciação das células β pancreáticas (Wang *et al.*, 2004). No pâncreas podemos encontrar populações celulares que possuem o receptor para o Fator de Crescimento de Hepatócitos (GHFr/c-Met) (Suzuki *et al.*, 2004).

Ainda em 2004, Seaberg e colaboradores isolaram precursores multipotentes de tecido pancreático. Estas células promoveram, *in vitro*, a proliferação clonal de células β , α , δ , bem como células do pâncreas exócrino. As células β geradas apresentaram capacidade secretora de insulina *in vitro* frente a diferentes concentrações de glicose em meio livre de soro. Este estudo reforçou a existência de precursores pancreáticos intrínsecos, uma vez que os mesmos não apresentaram marcadores de células-tronco embrionárias, mesodérmicas ou de crista neural (Seaberg, 2004). Já Banerjee e Bhonde isolaram células-tronco a partir de células β de camundongos tratados com STZ utilizando a combinação de Fator de Crescimento derivado de Queratinócitos (KGF, do inglês *Keratinocyte Growth Factor*) e Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF, do inglês *Fibroblast Growth Factor*). As células geradas a partir deste protocolo foram capazes de expressar PDX-1, bem como secretar insulina em resposta à glicose (Banerjee, 2003).

Evidências indiretas, através da análise da distribuição de células que expressam os marcadores PDX-1 e Ngn3 após a administração de STZ, sugerem a presença de progenitores de célula β no interior de ilhotas pancreáticas (Kodama, 2005). Joglekar e colaboradores observaram que as células-tronco isoladas de ilhotas pancreáticas de feto humano mantêm marcadores epigenéticos que indicam

uma conformação com o promotor ativo, caracterizando um sistema celular comprometido a diferenciar-se em células pancreáticas endócrinas (Joglekar, 2009).

Estudos têm demonstrado uma enorme vantagem das MSCs pancreáticas, comparadas às de origem extra-pancreática, não só pela sua alta capacidade proliferativa *in vitro*, mas principalmente por já estarem parcialmente programadas à diferenciação na direção do fenótipo endócrino. Esta característica pode levar a uma estratégia de diferenciação em células produtoras de insulina mais rápida e menos complexa do que às de outras fontes de células-tronco (Guz et al, 2001).

Porém, é necessário conhecer a biologia do desenvolvimento do pâncreas e os genes envolvidos para compreender os potenciais precursores pancreáticos de diferenciação *in vitro* em célula produtora de insulina. Embora seja necessário aperfeiçoar os protocolos baseados em células-tronco mesenquimais, além de investigar a capacidade de transdiferenciação de novas fontes celulares tecido-específicas, estas evidências sugerem que as MSCs são uma fonte potencial para futuras terapias regenerativas. Porém, o principal desafio ainda está em obter um produto que mimetize qualitativamente e quantitativamente, o mais próximo possível, as características das células β pancreáticas e seja capaz de restaurar a perda da função endócrina em organismos diabéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a capacidade de expansão e diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais murinas (mMSCs), isoladas do rim, pâncreas e medula óssea, avaliando sua capacidade de diferenciação em células produtoras de insulina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir as melhores condições de cultivo para expansão de MSCs murinas isoladas do rim, pâncreas e medula óssea;
- Definir as melhores condições de cultivo *in vitro* para diferenciação de MSCs murinas em células produtoras de insulina;
- Determinar a melhor fonte celular quanto à capacidade de diferenciação em células produtoras de insulina *in vitro*;
- Determinar a capacidade de mMSCs, após diferenciação *in vitro*, em reverter o diabetes quando transplantadas em camundongos diabéticos.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Este estudo foi realizado, após aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob normas de ética para pesquisa em modelos animais, com cuidados especiais para a utilização do menor número destes e para manejo da dor e sofrimento. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais entre outras providências, e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA, 2009).

A linhagem escolhida (BALB/c) como modelo biológico deste estudo foi criada e mantida sob condições de biotério convencional. O padrão genético murino isogênico desta linhagem é preservado através do método de acasalamento Brother x Sister que lhe confere homogeneidade gênica. Os animais foram criados na Coordenação de Produção e Experimentação Animal (CPEA) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, sob condições de biotério convencional. Nas mesmas condições, foram alojados, durante o experimento, no biotério do Instituto de Pesquisas Biomédicas (PUCRS) em estantes ventiladas, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro (06:00/18:00h) e temperatura controlada (21°C). Foram mantidos em gaiolas (máximo 5 animais/caixa) devidamente identificadas, em cama de maravalha de pinus selecionada e autoclavada e alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab CR-1® - Nuvital) e água ad libitum.

Os protocolos de analgesia e anestesia utilizados foram:

- Anestesia: dose única de 0,1mL de solução final de cloridrato de xilazina 2% (Rompun®, Bayer Animal Health) e cloridrato de ketamina 10%(Dopalen®, Agribands Brasil Ltda.) diluídos a 2mg/ml e 10mg/mL em solução salina (0,9%) (Alcon®, Alcon Labs. do Brasil Ltda.) respectivamente, para cada 10g de peso corporal por via intraperitoneal (ip).
- Analgesia: após cirurgia foi utilizado paracetamol 200mg/kg via oral (VO).

3.2 ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MURINAS

Linhagens de células-tronco mesenquimais murinas (mMSCs) foram estabelecidas a partir de MO, rim e pâncreas de camundongos BALB/c entre 4 a 6 semanas de idade, conforme metodologia previamente estabelecida por Meirelles & Nardi, 2003.

3.2.1 Estabelecimento de cultivo de mMSCs a partir da medula óssea

Para a obtenção das células-tronco mesenquimais de medula óssea, os camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. A seguir, os animais foram submersos em álcool 70% e levados ao fluxo laminar onde os fêmures dos mesmos foram dissecados e as epífises removidas, possibilitando a entrada da agulha 26-gauge na cavidade medular, onde foram injetados 2 mL de solução de Hank (Cultilab). O material obtido foi ressuspenso em 10mL de solução de Hank e centrifugado a 400 x g, a temperatura ambiente por 10 min.

Depois de desprezado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspendido em 10 mL de meio completo (MC), que consiste de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/low glucose – Gibco BRL) acrescido de 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 2,5 g/L de HEPES (Sigma), 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). Coletada uma alíquota de 100 µL, realizou-se contagem e avaliação da viabilidade pelo método de exclusão com azul trypan 0,4% (diluição 1:1) em câmara de Neubauer.

Novamente o material foi centrifugado e ressuspenso em MC numa concentração de 5×10^6 células viáveis por mililitro. Desta suspensão de células, 3,5 mL por poço são cultivadas em placa de 6 poços (TPP, Trasadingen, Suíça), incubadas em estufa umidificada com 5% de CO₂ no ar, a 37° C por 72 horas, quando então as células não-aderentes são removidas pela troca de meio (Meirelles & Nardi, 2003).

A taxa de repique (passagem) foi determinada pela cinética da cultura. Na primeira subcultura (P1), atingindo confluência mínima de 80%, as células foram

tratadas com tripsina (0,25-0,5% de tripsina/EDTA em HANK (sem Ca²⁺ e Mg²⁺) e transferidas para frascos de cultura de 25 cm² (TPP, Trasadingen, Suíça), com o triplo da área original (1:3), sendo repicadas quando necessário.

3.2.2 Estabelecimento de cultivo de mMSCs a partir do pâncreas e rim

O protocolo baseou-se na dissociação dos tecidos para preparo de suspensões celulares, que são então colocadas em cultivo e mantidas conforme já descrito para células originadas da medula óssea. Para o isolamento de células-tronco mesenquimais a partir de órgãos e tecidos extramedulares, os camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e levados ao fluxo laminar embebidos em álcool 70%.

O processo cirúrgico envolveu laparotomia mediana xifopúbica, possibilitando acesso aos órgãos de interesse. Realizou-se um corte longitudinal no rim e retirou-se uma fração do órgão de aproximadamente 5mm³ (córtex e medula renal). A mesma fração foi retirada do pâncreas. Os fragmentos foram lavados em solução de Hank, ligeiramente picotados e transferidos para tubos Falcon de 15 mL com 3mL de solução estéril de 1,5 g/mL de colagenase tipo 1 (Gibco) dissolvida em DMEM acrescido de 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma) e 2,5 g/L de HEPES (Sigma) sem soro.

Os tubos contendo os fragmentos dos órgãos foram incubados em banho-maria a 37°C entre 45 a 60 min. Após o período de digestão, os fragmentos foram dissociados mecanicamente e homogeneizados com auxílio de uma pipeta pasteur e acrescentou-se 10 mL de MC. Depois de centrifugar por 10 min a 400 x g, retirou-se o sobrenadante e o material obtido foi ressuspenso em 4 mL de MC. Esperou-se decantar e transferiu-se o sobrenadante para placas de 6 poços, onde as culturas foram mantidas até atingirem confluência mínima de 80%, em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ na atmosfera.

Assim como descrito no estabelecimento de cultura de mMSCs provenientes de medula óssea, a taxa de repique (passagem) foi determinada pela cinética da cultura. Na primeira subcultura (passagem 1 - P1), atingindo confluência mínima de 80%, as células foram tripsinizadas (0,25-0,5% de tripsina/EDTA em HBSS sem

Ca²⁺ e Mg²⁺) e transferidas para frascos de cultura de 25 cm² (TPP), com o triplo da área original (1:3), sendo repicadas quando necessário e transferidas para frascos de cultura de 75 cm² (TPP) com taxas de repique superiores (1:3, 1:4, etc.).

3.2.3 Caracterização das células-tronco mesenquimais murinas

De acordo com a International Society for Cellular Therapy (Dominici *et al.*, 2006), há no mínimo 3 características que devem ser comprovadas para que uma população celular seja classificada como célula-tronco mesenquimal. A primeira diz respeito à proliferação com células aderentes à superfície plástica. A segunda, quanto ao imunofenótipo, devendo ser positivas para CD105, CD73 e CD90, e negativas em mais de 95% das células em cultura para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 alfa ou CD19. E a terceira característica refere-se à capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e/ou condroblastos (Horwitz, 2005).

3.2.3.1 Análise morfológica qualitativa das mMSCs

As células foram rotineiramente observadas em microscopia de fase com microscópio invertido (Axiovert 25; Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) e fotografadas utilizando câmera digital (AxioCam MRc, Zeiss) e software AxioVision 3.1 (Zeiss).

3.2.3.2 Análise da expansão *in vitro* das células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais foram quantificadas em hemocítômetro pelo método de exclusão do azul trypan, sendo determinado o número total de células viáveis. Após, foi aplicada a fórmula abaixo indicando a concentração de células na suspensão (número de células por mL):

$$\text{concentração celular} = n \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

3.2.3.3 *Análise fenotípica das mMSCs por citometria de fluxo*

As células foram tripsinizadas, centrifugadas e incubadas por 30 minutos a 4° C, com anticorpos específicos para Sca-1, CD11b, CD13, CD29, CD44, CD45, CD49e e CD90.2 murinos, conjugados com ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen, San Diego, CA). O excesso de anticorpo foi removido por lavagem.

Foram coletados dados de pelo menos 10.000 eventos, utilizando o citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA), equipado com laser 488 nm e o programa CELLQuest (Becton Dickinson). Os dados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.8.

3.2.3.4 *Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica das mMSCs in vitro*

As culturas derivadas de MO, pâncreas e rim foram submetidas aos processos de diferenciação em adipócitos e osteoblastos na 4ª passagem.

Para induzir a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas por 4 semanas, em placas de 12 poços, em meio completo suplementado com 10⁻⁸ M de dexametasona, 2,5 µg/mL de insulina de pâncreas bovino, 100 mM de indometacina e 5 mM de rosiglitazona. O fenótipo de adipócitos foi avaliado pelo corante Oil Red O, evidenciando os vacúolos de gordura.

Durante 4 semanas da indução da diferenciação osteogênica, as células foram mantidas, em placa de 12 poços, em meio completo composto por 10⁻⁵ M de dexametasona, 100 µg de ácido ascórbico e 10 mM de β-glicerofosfato. Assim como na diferenciação adipogênica, o meio era trocado 2 vezes por semana. A atividade osteoblástica foi avaliada por corante Alizarin Red S que colore a matriz extracelular rica em cálcio.

3.3 PROTOCOLOS DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MURINAS EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA (CPI)

As células-tronco mesenquimais isoladas da MO, pâncreas e rim foram submetidas a diferentes protocolos de diferenciação em células produtoras de insulina.

Em cada um dos protocolos testados, as células estavam na passagem 4 (P4), cultivadas em triplicata em placa de 6 poços (TPP) com confluência superior a 80% ($\sim 4 \times 10^5$ células/mL), tanto as tratadas com meios indutores, quanto as mantidas em meio completo (controle). As células, assim como no isolamento e na manutenção, foram incubadas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ na atmosfera.

PROTOCOLO I (modificado de Chen *et al.*, 2004) - Durante 10 dias, as células foram cultivadas com 3 mL de L-DMEM (Dulbeccos's Modified Eagles's Medium/ low glucose) acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 20% de soro fetal bovino (Cultilab). Após este período, as células foram incubadas em meio L-DMEM sem soro suplementado com 10 mM/L de nicotinamida e 1 mM/L de β -mercaptoetanol. Passadas 24 horas, foi acrescido ao meio 23 mM/L glicose e incubadas por mais 10 horas. As mMSCs controles foram cultivadas em meio completo (MC).

PROTOCOLO II - Durante 7 dias as células foram mantidas em DMEM-F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco) com 1% de penicilina/estreptomicina, 2% de SFB, suplementado com 10 nM de nicotinamida.

PROTOCOLO III (modificado de Timper *et al.*, 2006) – Durante 3 dias as células foram mantidas em DMEM-F12 com 1% de penicilina/estreptomicina, sem soro, suplementado com 10 nM de nicotinamida (Sigma), 10 ng/mL de Activina-A (Sigma), 0,2 μ L/ mL de fator de crescimento de hepatócito (BioSource) e 10nM de exendina-4 (Sigma, St. Louis,. MO). As mMSCs controles foram cultivadas em meio completo (MC).

3.3.1 Coloração com ditizona

A ditizona (DTZ) é um agente quelante de íons de zinco (Zn^{2+}) os quais estão presentes nos grânulos de insulina, corando-os seletivamente. A solução estoque foi preparada pela diluição de 50 mg de DTZ (Merck; Whitehouse Station, NJ) em 5 mL de dimetil-sulfóxido (DMSO) e armazenada a $-20^{\circ}C$.

Com o objetivo de identificar as células que estão acumulando insulina, foram adicionados ao meio de cultura $10 \mu L/mL$ da solução estoque de DTZ esterilizada em filtro de nylon de $0,2 \mu m$, conforme descrito por Shiroi e colaboradores (Shiroi *et al.*, 2002). As culturas celulares foram incubadas a $37^{\circ} C$ por 20 minutos e depois lavadas três vezes com solução de Hank. As culturas foram então visualizadas em microscópio invertido (Axiovert 25; Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) e fotografadas utilizando câmera digital (AxioCam MRc, Zeiss) e software AxioVision 3.1 (Zeiss).

3.3.2 Extração e purificação de RNA

O RNA total das células diferenciadas e não diferenciadas foi extraído com 1 ml de Trizol-LS (Invitrogen, CA, USA) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

As amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 min a $4^{\circ} C$ e a fase aquosa removida e precipitada com álcool isopropílico, incubada por 10 min a temperatura ambiente, seguida de centrifugação a $12.000 \times g$ a $4^{\circ} C$ por 10 min. O precipitado foi lavado com etanol-DEPC (dietilpirocarbonato) 75%, centrifugado a $7.500 \times g$ a $4^{\circ}C$ por 5 min e secado a temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram ressuspensas em $10 \mu L$ de H₂O Milli-Q livre de RNAses com inibidor de ribonuclease RNase OUT ($40 U/\mu L$, Invitrogen, CA, USA). A seguir, as amostras foram utilizadas como molde para a transcrição reversa ou estocadas a $-80^{\circ}C$.

3.3.3 Transcrição reversa

Reações contendo 2 µg de RNA total (4 µL), 1 µL de Oligo dT (500 µg/mL), 1 µL de dNTP (10mM) e H2O Milli-Q q.s.p. 12 µL, foram preparadas, incubadas a 65° C por 5 min e resfriadas em gelo. Após término da incubação, foram adicionados 4 µL de 5x First Strand Buffer, 2 µL 0,1M DTT e 1 µL RNase OUT (40 U/µL, Invitrogen, CA, USA) e incubadas por mais 2 min a 37°C, seguidas da adição da enzima M-MLV (200 U/µL, Invitrogen, CA, USA) e incubação por 50 min a 37° C em termociclador. Após término da reação, a enzima foi inativada por 15 min a 70° C. Como último passo, para fazer a remoção do RNA complementar ao cDNA, as amostras foram incubadas com 1 µL (2 U) de RNAase H (Invitrogen, CA, USA) por 20 min a 37° C em termociclador. As amostras foram estocadas a -20° C até seu uso.

3.3.4 Reação em cadeia da polimerase – PCR

A amplificação das amostras a partir do cDNA foi realizada com os iniciadores específicos para insulina 1 (acesso no gene bank NM_008386.3), conforme detalhado na tabela 1. Como controle interno da extração, também foi amplificado um fragmento de 248 pb correspondente ao gene da *Gapdh* (acesso no gene bank NC_000072.5, tabela 1).

Tabela 1 - Primers empregados nos ensaios de RT-PCR para expressão gênica de insulina 1 e *Gapdh*.

Primer	direto (5' – 3')	Reverso (5' – 3')	Produto
Insulina 1	5'GGC ATC CAG TAA CCC CCA GCC3'	5'GAC GAA CGG GAG ACC CTC GG3'	248 pb
<i>Gapdh</i>	5'AAA ATG GTG AAG GTC GGT GT 3'	5'GTT AGT GGG GTC TCG CTC CT 3'	244 pb

Em todos os casos, foi utilizado 1,5 a 2,0 µL de cDNA molde em um volume final de 25 µL. As condições da reação, utilizando a enzima 0,5 µL Taq polimerase (5 U/µL, 4G, Brasil), foram as seguintes: 5 min a 94° C, 35 ciclos nas seguintes condições: 30 s a 94° C, 45 s a 60° C e 45 s a 72° C, seguidos de 5 min de

incubação a 72° C. As amostras foram visualizadas em gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídio (Invitrogen, CA, USA). O resultado das reações foi visualizado sob luz ultravioleta, detectando as bandas correspondentes à insulina 1 de 248 pb ou *Gapdh* de 244 pb.

3.3.5 Avaliação da expressão de insulina por Western Blot

Para determinar se as células tronco mesenquimais previamente tratadas com meios indutores eram capazes de expressar insulina, tanto células-tronco tratadas como não tratadas foram lavadas duas vezes com tampão gelado, lisadas em tampão contendo Tris-HCl 62,5 mM (pH 6.8), SDS 2%, 10% glicerol e azul de bromofenol, com 2 β-mercaptoetanol, sonicadas em banho de água a 4° C, centrifugadas por 10 min e o sobrenadante incubado a 95° C por 5 min.

Alíquotas de 15 µL foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, NJ, USA) por 18 horas a 23 V, 4° C. As membranas foram incubadas com leite em pó desnatado a 5% em TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) por 2 horas temperatura ambiente para bloquear ligações não específicas.

Subsequentemente, as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho contra insulina humana (1:300, clone H-86, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), seguido da incubação com o anticorpo secundário contra Ig de coelho, conjugado à peroxidase de raiz forte (1:2.000 Cell Signaling Technology, MA, USA) e detecção por quimioluminescência (Cell Signaling Technology, MA, USA) em filme de raio X.

Como controle, as membranas foram novamente incubadas com Tris-HCl 500 mM (pH 6.7), SDS 2%, e 2 β-mercaptoetanol, por 30 min a temperatura ambiente, para a completa remoção dos reagentes e novamente incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo contra actina (1:5.000, clone AC-15, Abcam, MA, USA) seguido de anticorpo secundário policlonal de coelho anti-Ig de camundongo conjugado à peroxidase de raiz forte (1:2.000, Abcam, MA, USA) e reveladas como especificado acima. Como controle positivo, foi feita a extração de proteínas a partir de pâncreas de camundongo BALB/c.

3.3.6 Implante de mMSCs em camundongos diabéticos induzidos

Para analisar a funcionalidade das células *in vivo*, após o processo de diferenciação em CPI, 10^6 células diferenciadas foram implantadas em camundongos BALB/c diabéticos (tabela 2).

Tabela 2 - Descrição dos grupos experimentais.

Grupo	Origem MSCs	n	Terapia celular
1	<i>Rim</i>	4	10^6 células diferenciadas
2	<i>Pâncreas</i>	4	10^6 células diferenciadas
3	<i>Pâncreas</i>	4	10^6 células não diferenciadas
4	-	4	Sem tratamento

A indução de diabetes foi realizada com uma dose única intraperitoneal de 200 mg/kg de estreptozotocina (Sigma), dissolvida em citrato de sódio- ácido cítrico, pH 4,2, em camundongos com 8 a 12 semanas de idade. A determinação da glicose sanguínea foi realizada através de glicofitas em monitor de glicemia (Accu-Chek Advantage II- Roche®). Para tanto, bastava uma gota de sangue retirada através de uma pequena picadela na ponta da cauda com uma lanceta. A mensuração da glicose e peso era realizada semanalmente. Foram considerados diabéticos os animais que apresentavam glicemia superior a 350 mg/dL. Além disto, outros aspectos característicos do diabetes foram observados, como ingestão hídrica, perda de peso e diurese excessiva.

Trinta dias após a indução, realizada a pesagem e aferição glicêmica, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma dose única de 0,1 mL de solução final de cloridrato de xilazina 2% (Rompun®, Bayer Animal Health, endereço) e cloridrato de ketamina 10%(Dopalen®, Agribands Brasil Ltda, endereço) diluídos a 2 mg/ml e 10 mg/mL, respectivamente, em solução salina (0,9%) (Alcon®, Alcon Labs. do Brasil Ltda.), para cada 10 g de peso corporal. Após tricotomia na região inferior dorso-lateral esquerda, foi exposto o rim através de uma incisão de 1,5 cm e, com auxílio de uma pinça fina reta, foram impantadas, sob a

cápsula renal, 10^6 células. Suturado, o animal foi colocado em placa aquecedora e monitorado até apresentar reações a estímulos externos.

Passado o efeito sedativo, os animais foram colocados em gaiolas individuais, devidamente identificadas e mantidos com ração balanceada padrão para roedores e água ad libitum. Os níveis de glicose e o peso dos animais foram registrados semanalmente. A reversão do diabetes foi considerada quando os animais apresentaram glicemia inferior ou igual a 250 mg/dL.

3.3.7 Estudo experimental cego

Para evitar tendenciosidade, a análise dos experimentos descritos nos itens 2.2 a 2.5 foi realizada às cegas pelo grupo do Laboratório de Transplantes do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, sob orientação da Dra. Florencia Barbé-Tuana.

As amostras enumeradas foram enviadas ao laboratório e após, em conjunto, os resultados foram analisados relacionando o número da amostra à fonte celular e protocolo. Exemplo: amostra 1 – mMSC pancreática+protocolo IV; amostra 2 – mMSC pancreática controle (não diferenciada); e assim por diante. O mesmo foi realizado durante a mensuração do peso e glicemia dos animais. Os camundongos foram enumerados na cauda com caneta permanente, porém as aferições dos transplantados eram realizadas sem que o observador soubesse da terapia celular aplicada.

3.3.8 Análise estatística

Todos os dados foram expressos por meio de média e desvio padrão (DP). Comparações estatísticas do grupo controle *versus* grupos tratados com CPIs ou mMSCs foram realizadas através da análise variância com fator único (ANOVA). Os grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando valor de $P < 0,005$ (SPSS 15.0).

4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS MURINAS

4.1.1 Análise morfológica qualitativa das mMSCs

As células foram cultivadas a partir de rim, pâncreas e MO de camundongos BALB/c seguindo protocolo já bem estabelecido de isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais em estado indiferenciado (Meirelles & Nardi, 2003). Conforme esperado, as células apresentaram morfologia fusiforme alongada, com núcleo central e alguns prolongamentos. Apresentaram altas taxas replicativas e aderiram às garrafas plásticas de cultivo celular (figura 1).

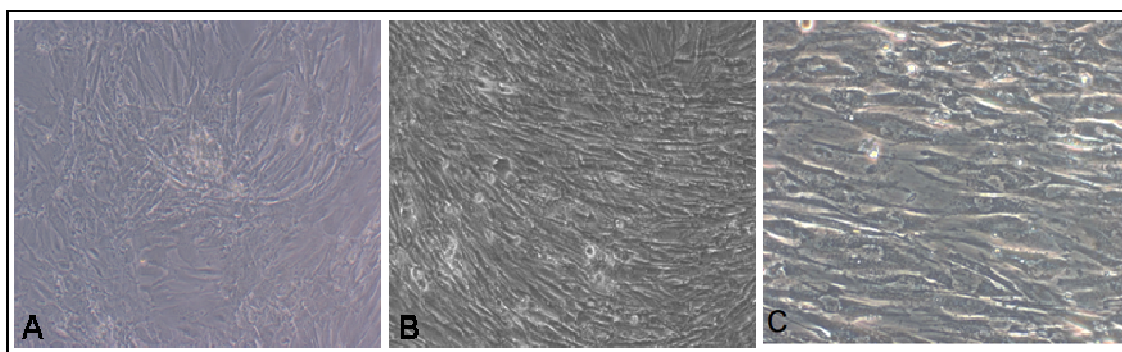


Figura 1 – Microscopia de contraste de fase de mMSCs indiferenciadas, após a 4ª passagem, isoladas de rim (A), pâncreas (B) e MO(C) de camundongos BALB/c e cultivadas em meio completo. Aumento de 200X (B) e 400X (A e C).

Embora o descarte de células não aderentes e adição de novo meio de cultura fossem realizados a cada 2 dias, diante da heterogeneidade celular da MO (figuras 2G e 2H), apenas após a segunda passagem houve remoção satisfatória (não total) de contaminantes hematopoiéticos e outros tipos celulares.

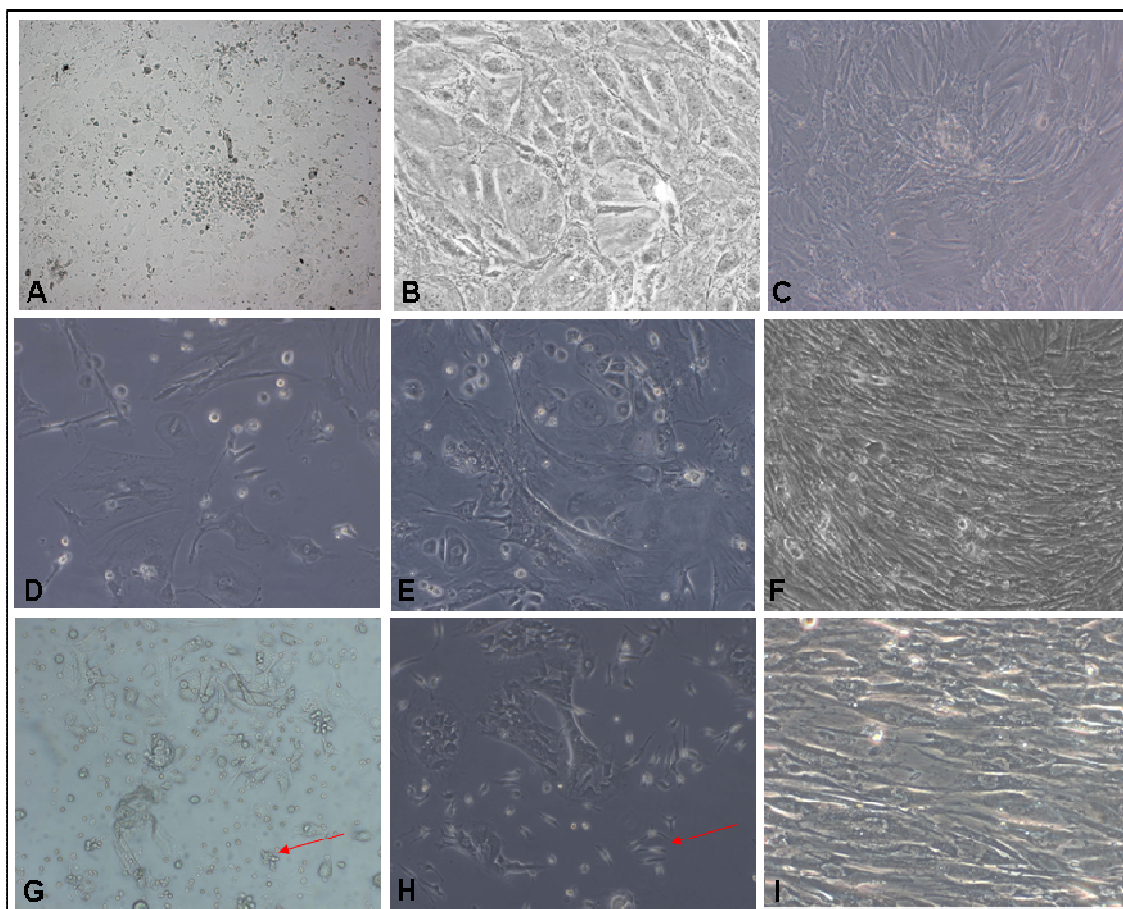


Figura 2 – Microscopia de contraste de fase de mMSCs indiferenciadas de rim (A-C), pâncreas (D-F) e MO (G-I) após 4 dias em cultura (A, D e G), 10 dias (B, E e H) e com mais de 30 dias em cultura (C, F e I). As setas vermelhas evidenciam a heterogeneidade celular da MO no início do cultivo. Aumento 50X (A) e 100X (B-I).

4.1.2 Análise da expansão *in vitro* das células-tronco mesenquimais murinas

Estimou-se a expansão das células com base na área ocupada pelas mMSCs (*population doubling-PD*). À área de crescimento ocupada pela cultura primária foi arbitrariamente dado o valor 1. Ao ocorrer a segunda passagem, a taxa de repique (1:3) foi multiplicada pelo número inicial resultando no valor 3 da área de crescimento acumulada. Este processo foi repetido a cada passagem, fornecendo uma curva de crescimento (figura 3) que é diretamente proporcional ao número de células.

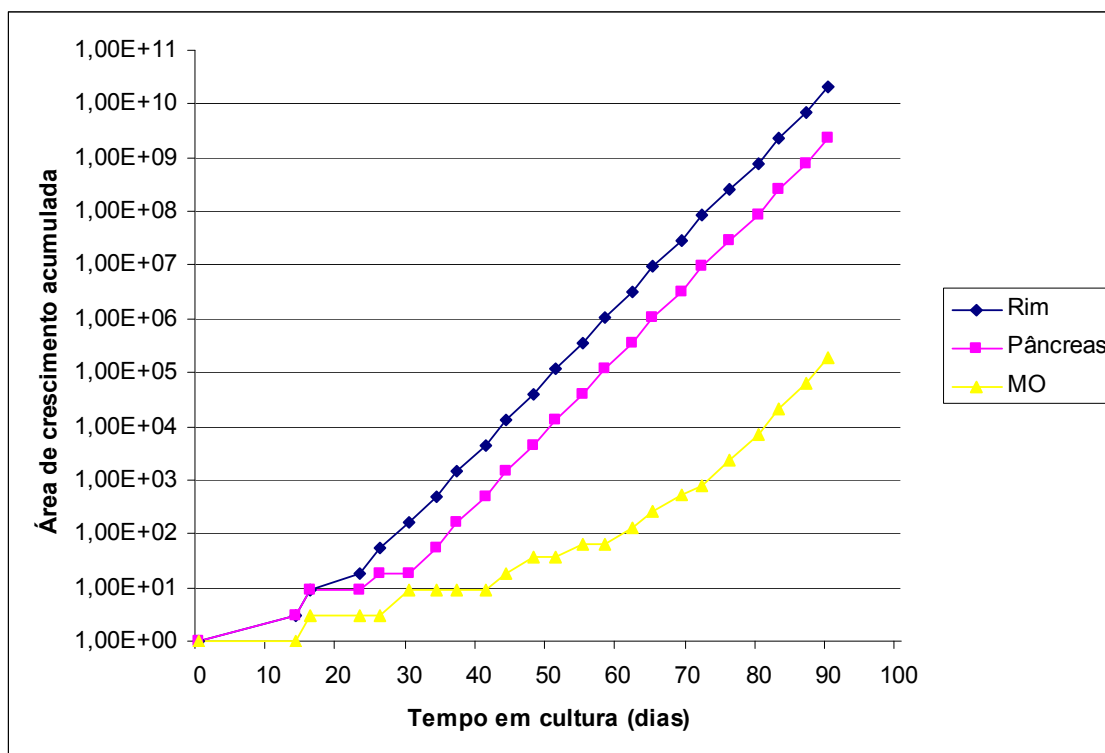


Figura 3 - Gráfico de comparação da cinética de crescimento das mMSCs oriundas de rim, pâncreas e MO.

Observou-se uma fase de latência na cultura primária da MO, quando comparada às mMSCs oriundas do rim e pâncreas. Além disso, neste trabalho e diante da forma como foi realizado o isolamento e a manutenção das células, nota-se (figura 3) um potencial de crescimento superior das mMSCs dos tecidos extramedulares comparados à área de crescimento das células provenientes da MO.

4.1.3 Análise fenotípica das mMSCs por citometria de fluxo

A visualização da presença dos marcadores celulares em ensaios de citometria de fluxo objetivou comprovar o fenótipo das células-tronco obtidas do rim, pâncreas e MO. As culturas na 4ª passagem foram submetidas à marcação com anticorpos específicos para Sca-1, CD13, CD11b, CD29, CD44, CD45, CD49e e CD90.2. As figuras 4 a 6 apresentam os resultados observados para mMSCs isoladas do rim, pâncreas e MO, respectivamente, plotados em forma de histograma.

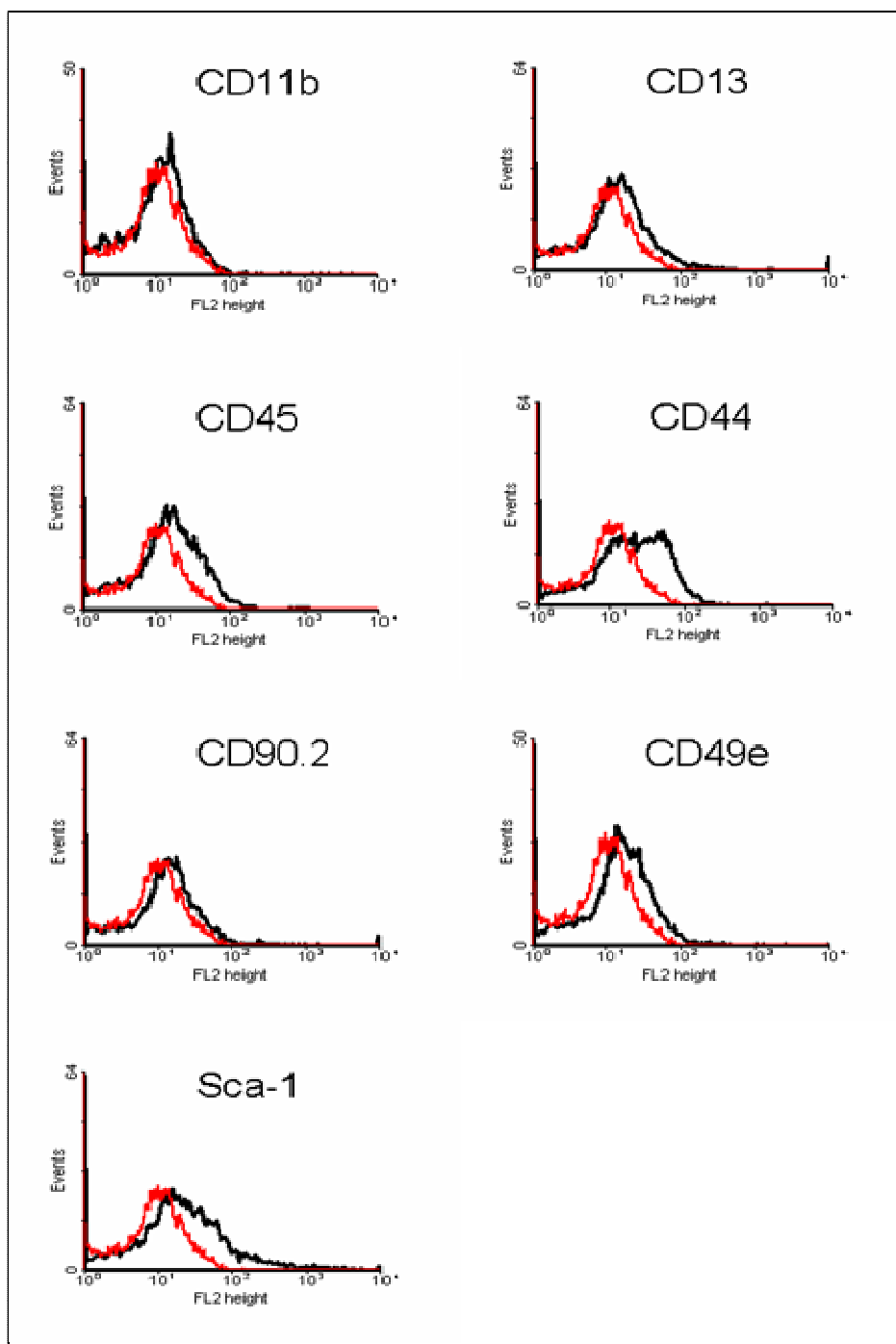


Figura 4 – Perfil imunofenotípico das mMSCs derivadas de rim. Os histogramas apresentam a expressão (traço preto) das moléculas selecionadas (Sca-1, CD13, CD11b, CD44, CD45, CD49e e CD90.2) comparadas com o controle isotípico negativo (traço vermelho).

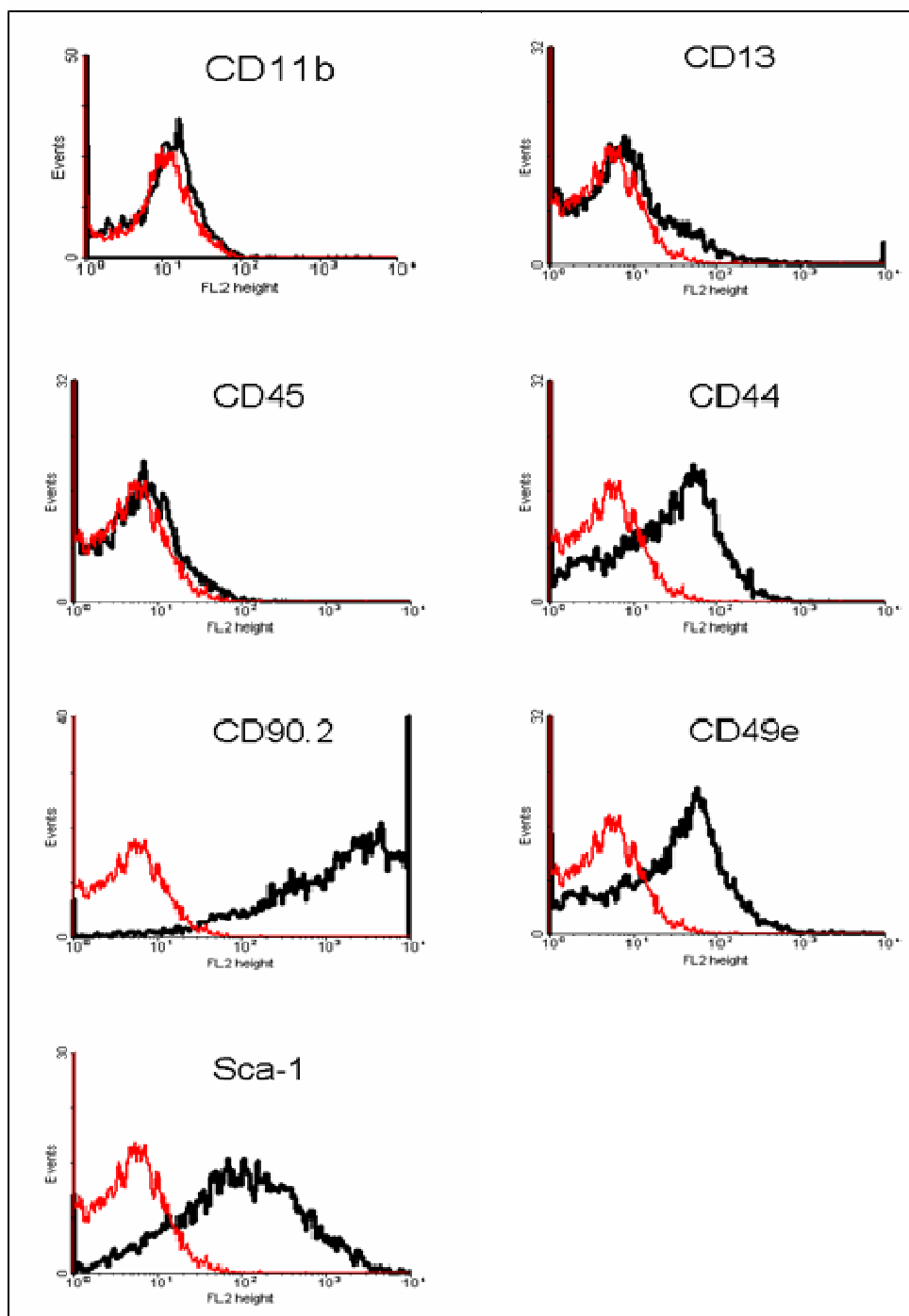


Figura 5 - Perfil imunofenotípico das mMSCs derivadas de pâncreas. Os histogramas apresentam a expressão (traço preto) das moléculas selecionadas (Sca-1, CD13, CD11b, CD44, CD45, CD49e e CD90.2) comparadas com o controle isotípico negativo (traço vermelho).

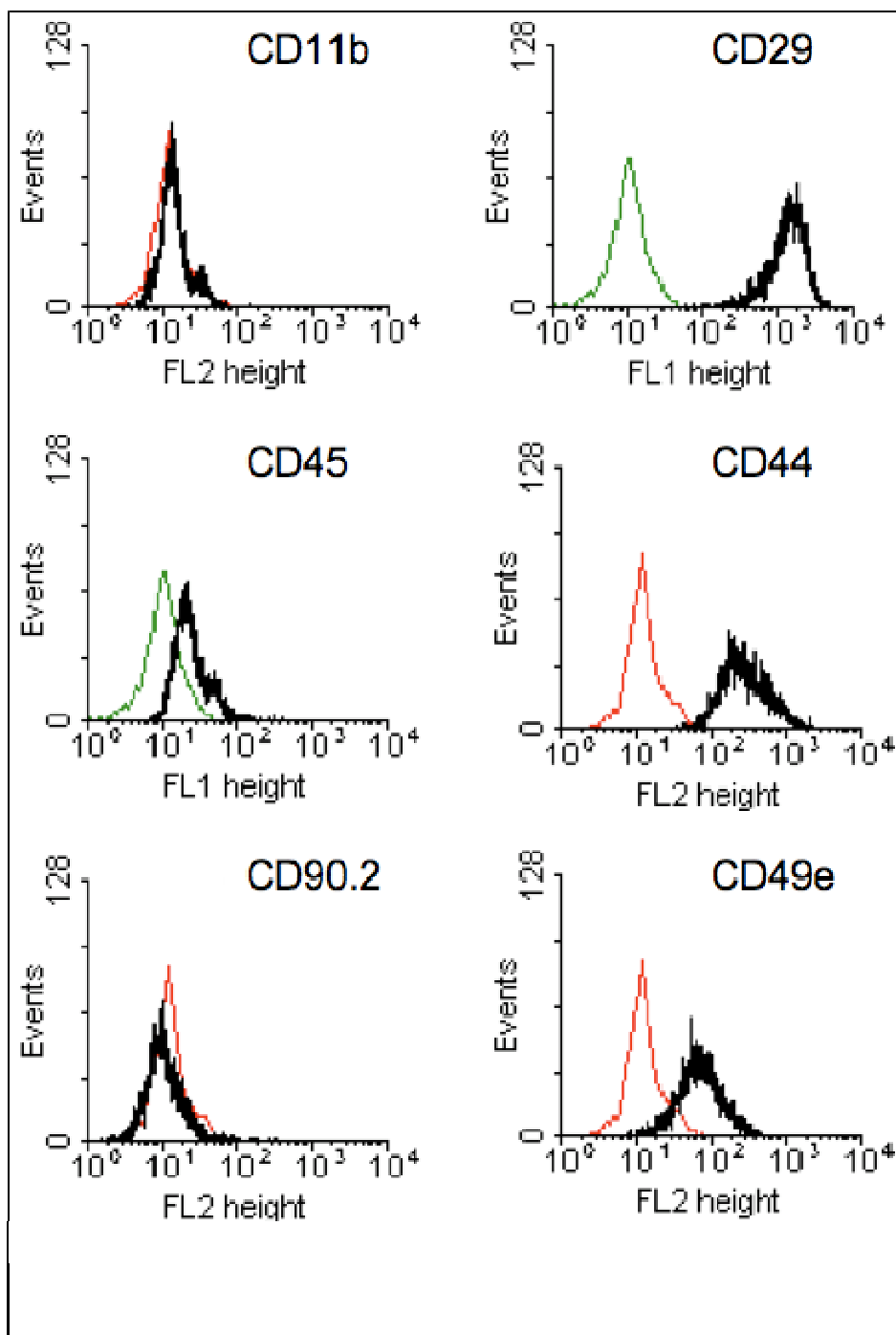


Figura 6 - Perfil imunofenotípico das mMSCs derivadas de MO. Os histogramas apresentam a expressão ((traço preto) das moléculas selecionadas (CD11b, CD29, CD44, CD45, CD49e e CD90.2) comparadas com o controle isotípico negativo (traço colorido).

4.1.4 Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica das mMSCs *in vitro*

As culturas derivadas de pâncreas, rim e MO também foram testadas quanto à sua potencialidade para diferenciação em osteoblastos e adipócitos. As células foram submetidas aos protocolos de diferenciação na 4ª passagem.

Os resultados mostraram que todas as culturas foram capazes de originar adipócitos e osteócitos, quando adequadamente induzidas (figura 7). Os vacúolos de gordura estão evidenciados pelo corante Oil Red O, principalmente nas células isoladas da MO, bem como sua capacidade de diferenciação osteogênica avaliada pelo corante Alizarin Red S que colore a matriz extracelular rica em cálcio.

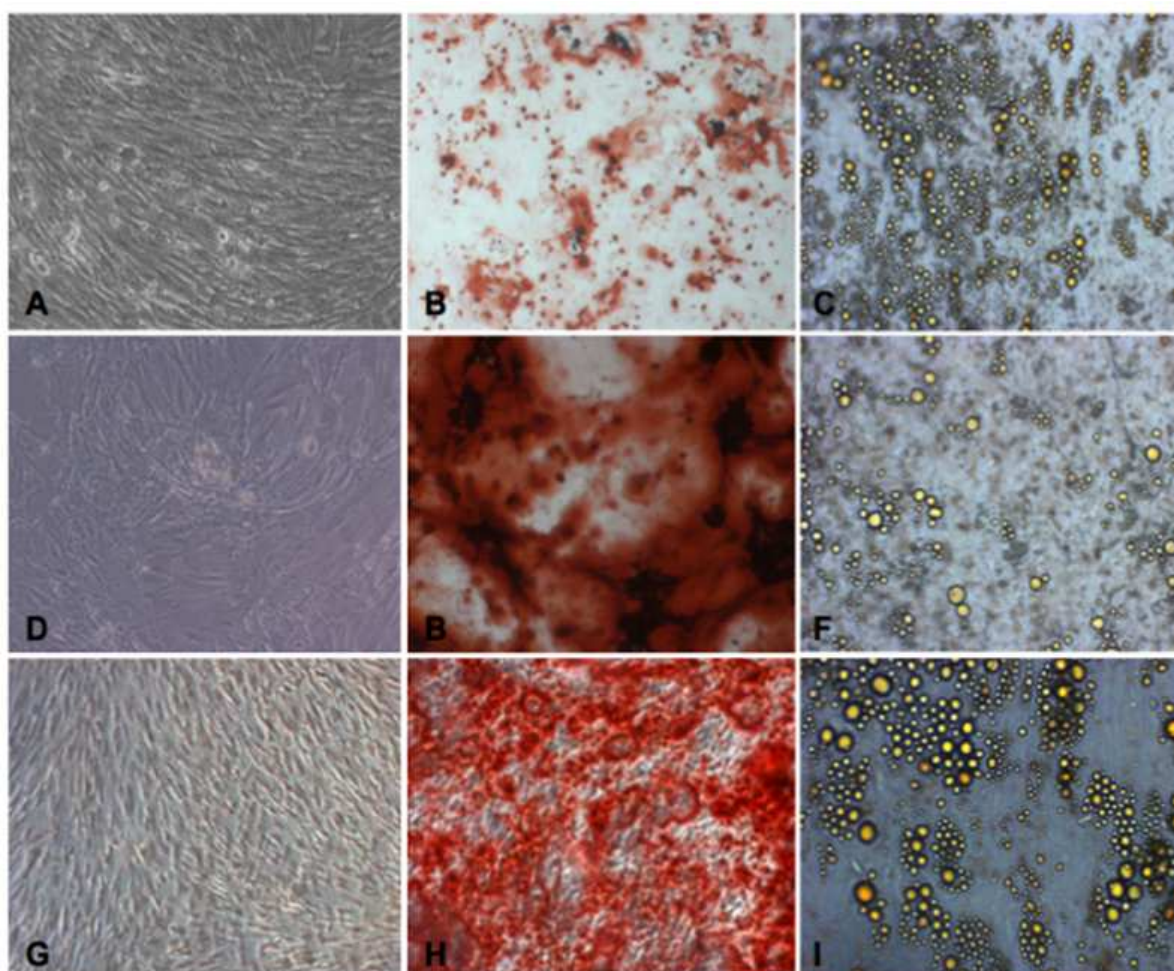


Figura 7 – Diferenciação osteo e adipogênica de mMSCs, após a 4ª passagem, derivadas de pâncreas (A -C), rim (D-E) e MO(G-I). Depósitos de cálcio na matriz extra-celular foram corados com Alizarin Red S (B, E e H). Vacúolos de gordura corados com Oil Red O (C, F e I). MSCs cultivadas em meio completo mantêm o aspecto convencional em microscopia de contraste de fase (A, C e F). Aumento de 50X (H), 100X (A-G).

4.2 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MURINAS EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA (CPI)

4.2.1 Protocolo I

Para o processo de diferenciação de células-tronco mesenquimais em células produtoras de insulina, utilizou-se o protocolo descrito por Chen e colaboradores (2004) para diferenciação em CPI a partir de MO de ratos Wistar. Embora as células tenham proliferado formando pequenos aglomerados (figura 8B e 8D), não foi possível detectar a presença de insulina nestas células, nem pelo método de coloração com ditizona (DTZ), tampouco pelo método de RT-PCR.

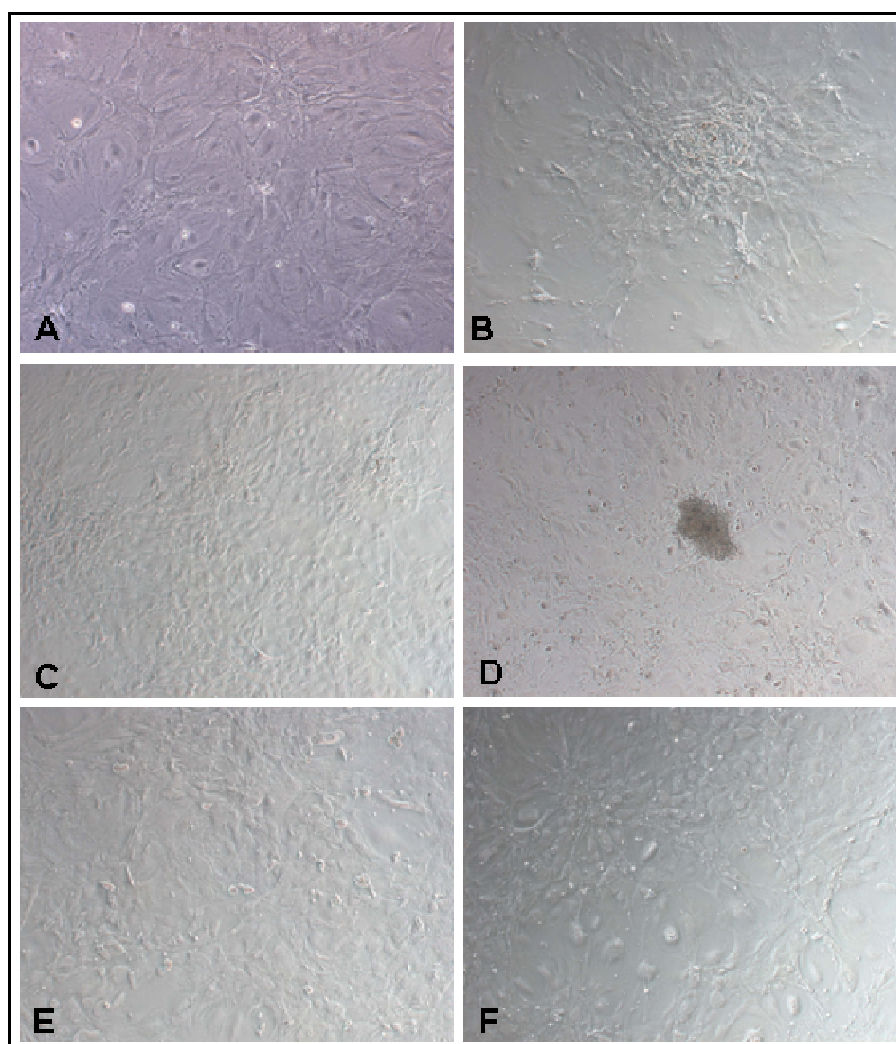


Figura 8 - Microscopia de contraste de fase de mMSCs em meio indutor para diferenciação em células produtoras de insulina, conforme o protocolo I. Células indiferenciadas coradas com

DTZ (em MC) oriundas de rim (A), pâncreas (C) e MO (E) e 11 dias após a incubação com meio indutor: rim (B), pâncreas (D) e MO (F) coradas com DTZ. Aumento de 50X (B, C e D) 100X (A, E e F).

4.2.2 Protocolo II

O protocolo aplicado às três populações de mMSCs isoladas de camundongos BALB/c, levou as células de rim e MO a assumirem morfologia endotelial com agrupamentos tridimensionais similares à angiogênese *in vitro* durante o período de exposição ao meio suplementado com nicotinamida e 2% de SFB. Já as culturas de células isoladas de pâncreas organizaram-se em pequenos *clusters* (figura 9D), porém ao tratá-las com ditizona, não houve alteração da coloração, indicando ausência de grânulos de insulina. Também não pudemos detectar a expressão de insulina através do método de RT-PCR.

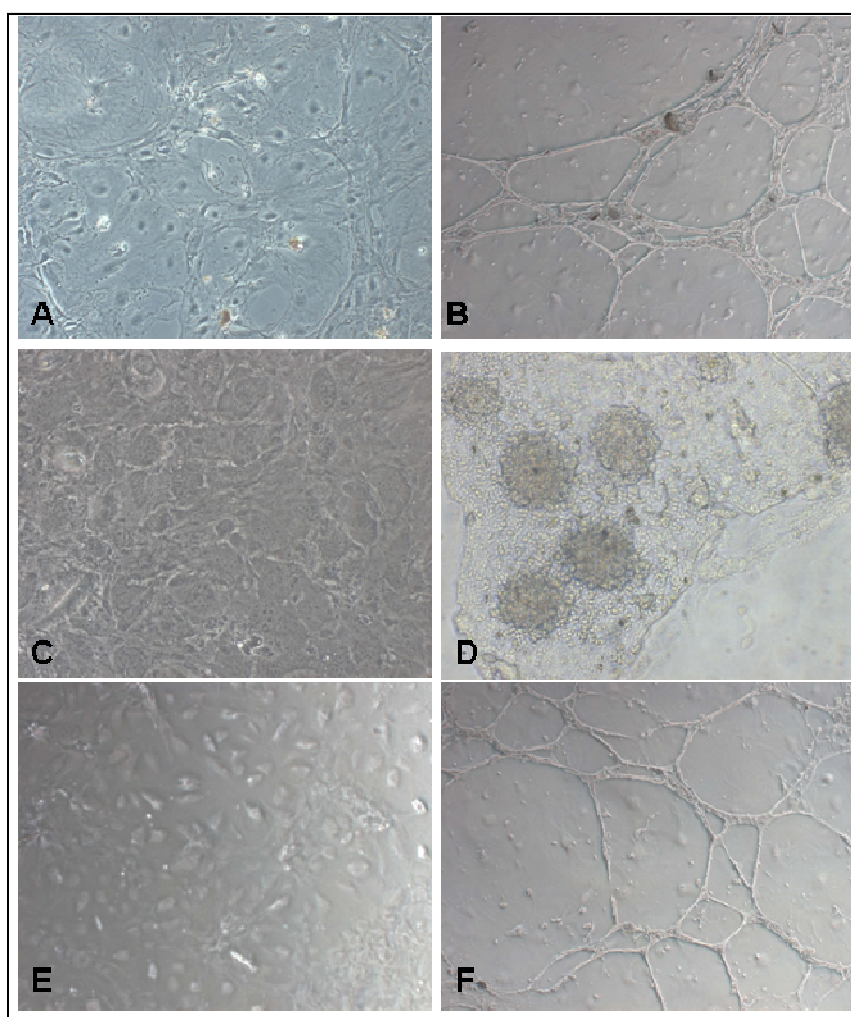


Figura 9 - Microscopia de contraste de fase de mMSCs em meio indutor para diferenciação em células produtoras de insulina. Células indiferenciadas coradas com DTZ (em MC) oriundas de

rim (A), pâncreas (C) e MO (E) e 7 dias após a incubação com meio indutor: rim (B), pâncreas (D) e MO (F) coradas com DTZ. Aumento de 50X (B e F), 100X (A, C e E) e 400X (D).

4.2.3 Protocolo III

Timper e colaboradores (2006) obtiveram sucesso ao diferenciar MSCs derivadas de tecido adiposo humano em células com fenótipo pancreático endócrino. O grupo observou, após a indução, a ativação da expressão dos genes da insulina, somatostatina e glucagon. Ao aplicarmos um protocolo similar, conforme descrito no item Metodologia, foi possível observar a formação de *clusters* e células ovais coradas com DTZ nas mMSCs derivadas de rim (figuras 10B e 10C) e MO (figuras 10H e 10I), porém quantitativamente e morfológicamente distintas entre si. Embora tenha sido observada esta mesma diferenciação em mMSCs de pâncreas (figuras 10E e 10F), quando o protocolo foi modificado, retirando do meio de indução estudado apenas a activina-A, pode-se verificar o aumento do número de células diferenciadas apresentando morfogênese de *clusters* secretores de insulina nesta população (figuras 11E e 11F).

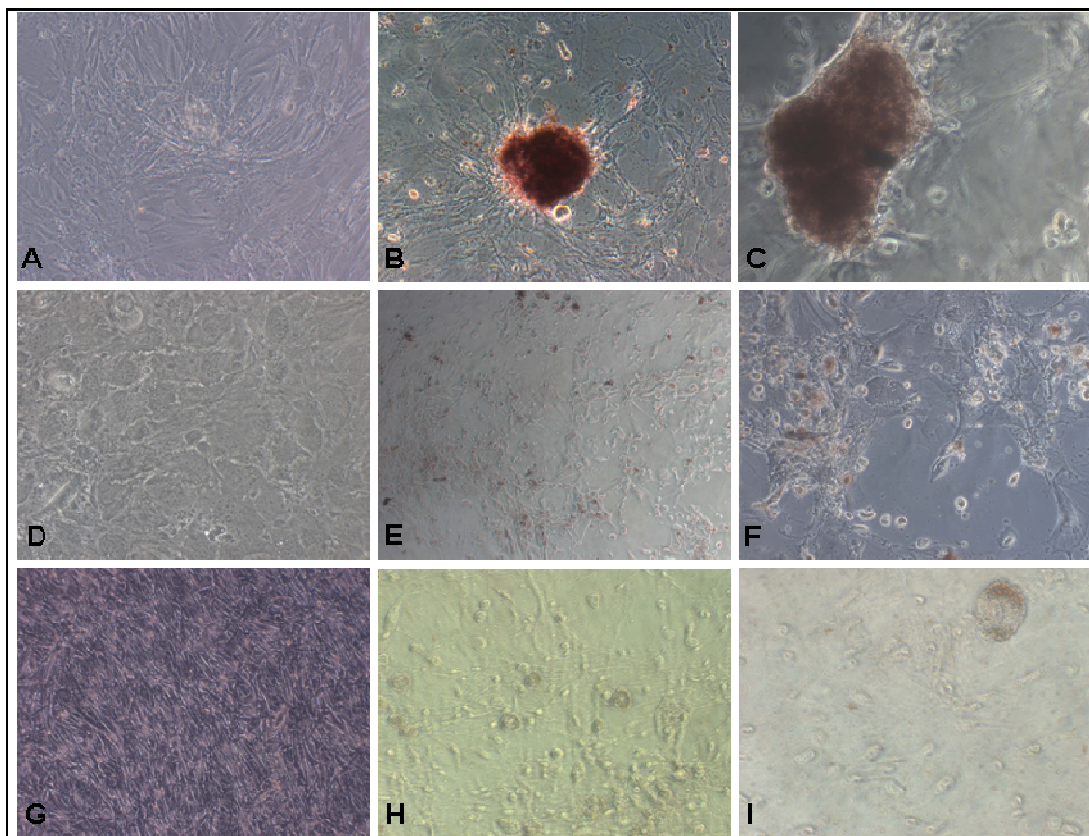


Figura 10 - Microscopia de contraste de fase de mMSCs em meio indutor suplementado com activina-A para diferenciação em células produtoras de insulina. Células indiferenciadas coradas com DTZ (em MC) oriundas de rim (A), pâncreas (D) e MO (G) e 3 dias após a incubação com meio indutor: rim (B e C), pâncreas (E e F) e MO (H e I) coradas com DTZ. Aumento de 50X (E e G), 100X (A, D e H), 200X(B e F) e 400X (C e I).

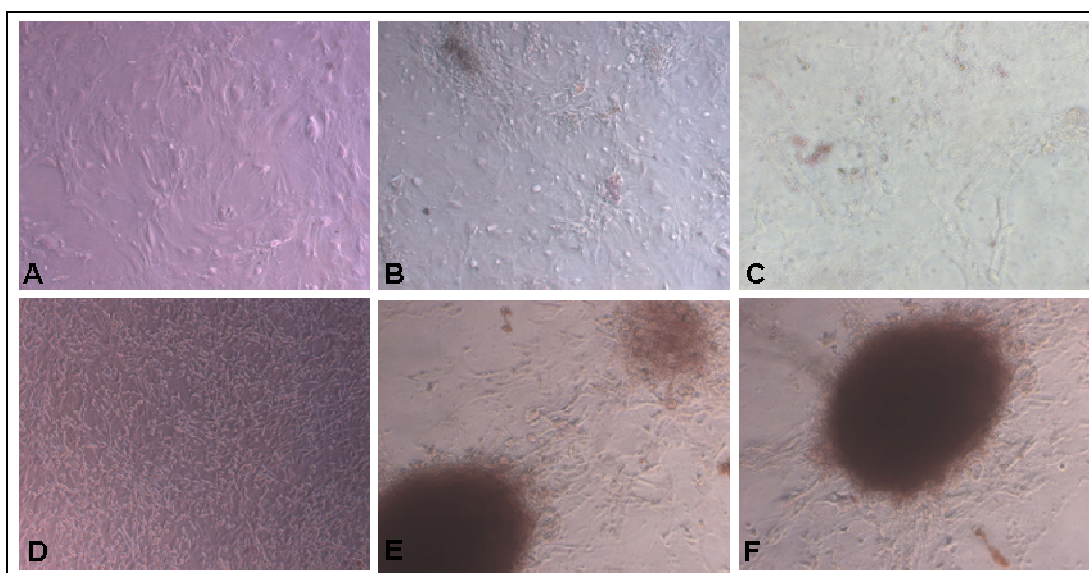


Figura 11 - Microscopia de contraste de fase de mMSCs em meio indutor sem activina A para diferenciação em células produtoras de insulina. Células indiferenciadas coradas com DTZ (em MC) oriundas de rim (A) e pâncreas (D) e 3 dias após a incubação com meio indutor: rim (B e C) e pâncreas (E e F) coradas com DTZ. Aumento de 50X (D), 100X (A e B) e 400X (C, E e F).

Quando comparamos as populações de células-tronco mesenquimais oriundas de rim em meio indutor suplementado com activina-A (figuras 10B e 10C) às expostas ao meio sem activina-A (figuras 11B e 11C), observamos que o processo de diferenciação e adoção de morfologia similar a células produtoras de insulina ocorre efetivamente somente nas tratadas com o indutor em questão.

Para avaliar a expressão do gene da insulina, amostras das populações de mMSCs submetidas ao protocolo III (tabela 3) foram analisadas através de reações RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*). Como controle positivo, foram utilizadas proteínas extraídas a partir de pâncreas de camundongo BALB/c.

Tabela 3 – Amostras de mMSCs submetidas ao meio de diferenciação em CPI para avaliação da expressão gênica da insulina por RT-PCR.

(mMSCS)	Protocolo de indução em CPI
Pâncreas	DMEM-F12 1% de penicilina/estreptomicina 10 nM de nicotinamida, 1 µL/5mL de HGF 10 nM de exendina-4
MO	DMEM-F12 1% de penicilina/estreptomicina 10nM de nicotinamida 10 ng/mL de Activina-A 1 µL/5mL de HGF 10 nM de exendina-4
Rim	DMEM-F12 1% de penicilina/estreptomicina 10 nM de nicotinamida 10 ng/mL de Activina-A 1 µL/5mL de HGF 10 nM de exendina-4
Pâncreas (controle)	HDMEM 10% SFB 1% de penicilina/estreptomicina

A figura 12 mostra a expressão do gene da insulina 1 após 3 dias de incubação das mMSCs em meio indutor de diferenciação *in vitro* em células-produtoras de insulina. O *Gapdh* foi escolhido como gene de expressão constitutiva comportando-se de maneira muito semelhante em todas as amostras. O gene da insulina 1 apresentou uma expressão importante na amostra de mMSCs

pancreáticas quando comparada ao controle (*Gapdh*). As amostras de origem renal e óssea medular apresentaram uma expressão discreta, porém detectável.

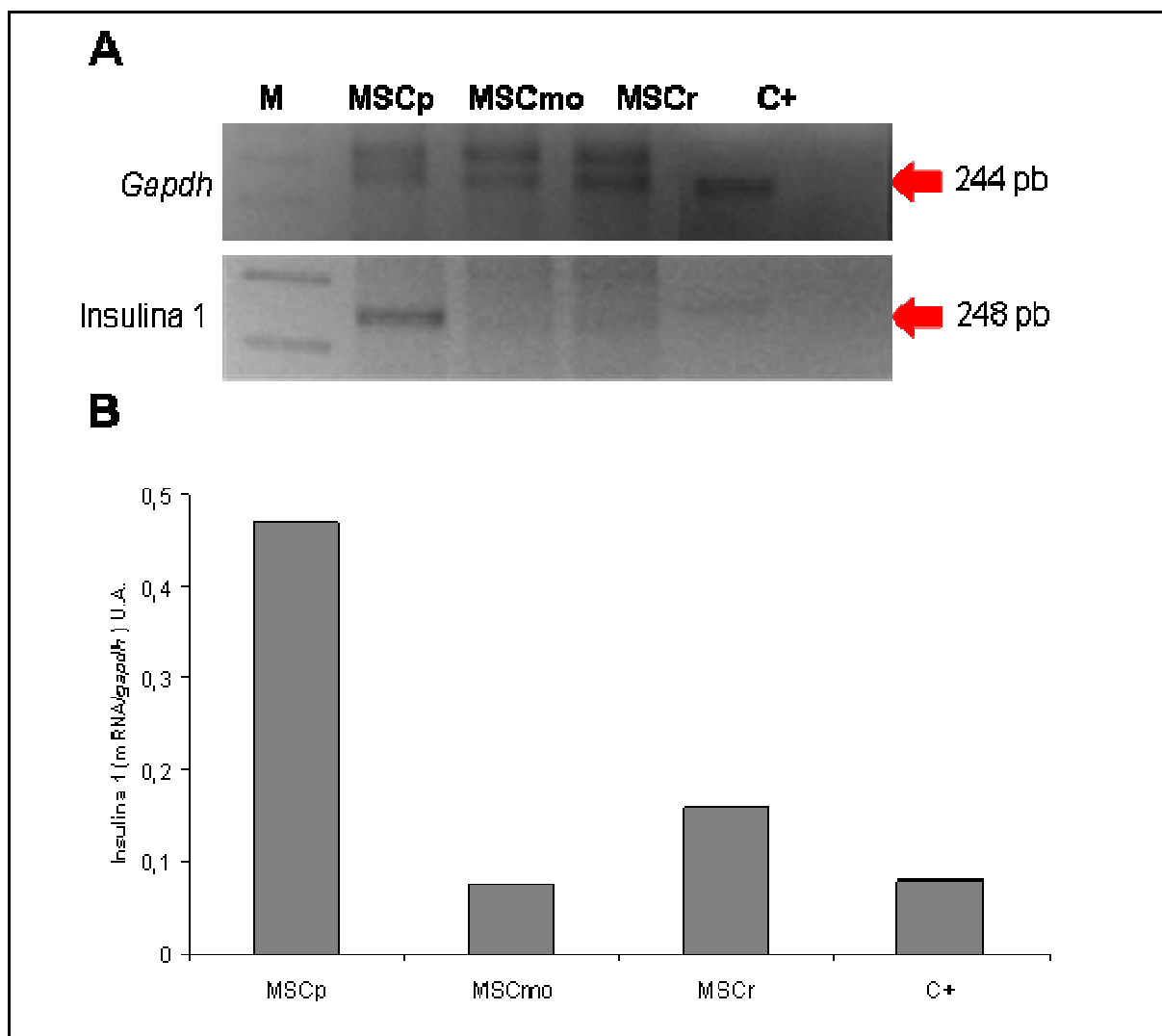


Figura 12 – (A) Expressão do gene da insulina 1 avaliada por RT-PCR em amostras de cDNA de mMSCs derivadas do pâncreas (MSCp), medula óssea (MSCmo), rim (MSCr) e controle positivo (C+), após 3 dias em meio indutor para CPI; M (marcador de peso molecular). **(B)** Gráfico das densidades ópticas das bandas de cada grupo, normalizadas pelo *Gapdh* (software *ImageJ 1.43*).

O mesmo resultado foi evidenciado quando submetemos as amostras a ensaios de Western Blot. A membrana apresentada na figura 13 evidencia a expressão de insulina principalmente na diferenciação de mMSCs derivadas de pâncreas em meio indutor sem ativina A.

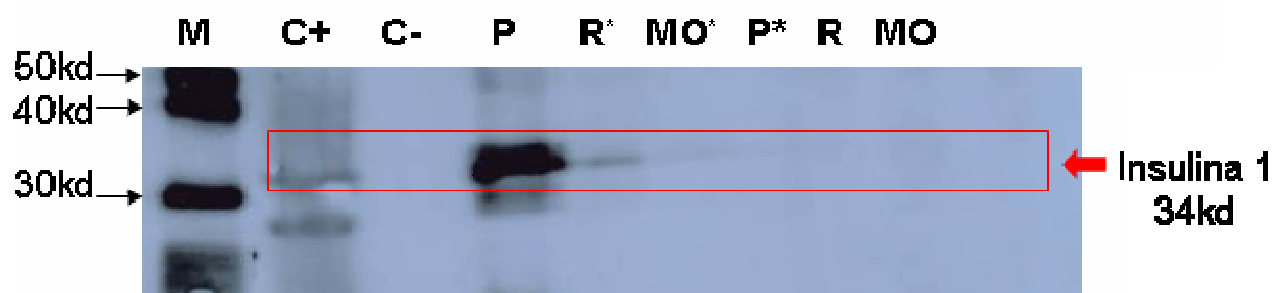


Figura 13 – Expressão de insulina 1 avaliada por Western Blot, após 3 dias em meio indutor com (*) ou sem ativina A para CPI em amostras de mMSCs derivadas do pâncreas (P), rim (R), medula óssea (MO), controle positivo (C+) e controle negativo (C-); M (marcador de peso molecular).

4.2.4 Implante de mMSCs em camundongos diabéticos induzidos

Um volume de 10^6 células diferenciadas autólogas foi implantado na cápsula renal de camundongos BALB/c diabéticos. A reversão do diabetes foi considerada quando os animais apresentaram glicemia inferior ou igual a 250 mg/dL. A funcionalidade das mMSCs de MO diferenciadas não foi avaliada diante do baixo número de células reativas à ditizona. Assim, por uma questão ética, não submetemos os animais à indução de diabetes por STZ e ao transplante de mMSCs derivadas da MO.

Embora expressassem o gene (conforme análise por RT-PCR) e a proteína insulina 1 (analisado por Western blot), *in vivo*, as células-tronco mesenquimais murinas derivadas de rim não apresentaram eficiência na reversão do diabetes (figura 14). Deste mesmo grupo, 2 animais morreram 72 horas após a cirurgia. Já os animais que receberam células diferenciadas de procedência pancreática, após 20 dias do implante em cápsula renal, foram capazes de reverter o estado hiperglicêmico dos animais (figura 15). Houve a morte de um animal 24 horas após a cirurgia. Não houve reversão do diabetes nos animais tratados somente com mMSCs não diferenciadas derivadas do pâncreas (figura 16), tampouco reversão espontânea nos animais não tratados (controle) (figura 17).

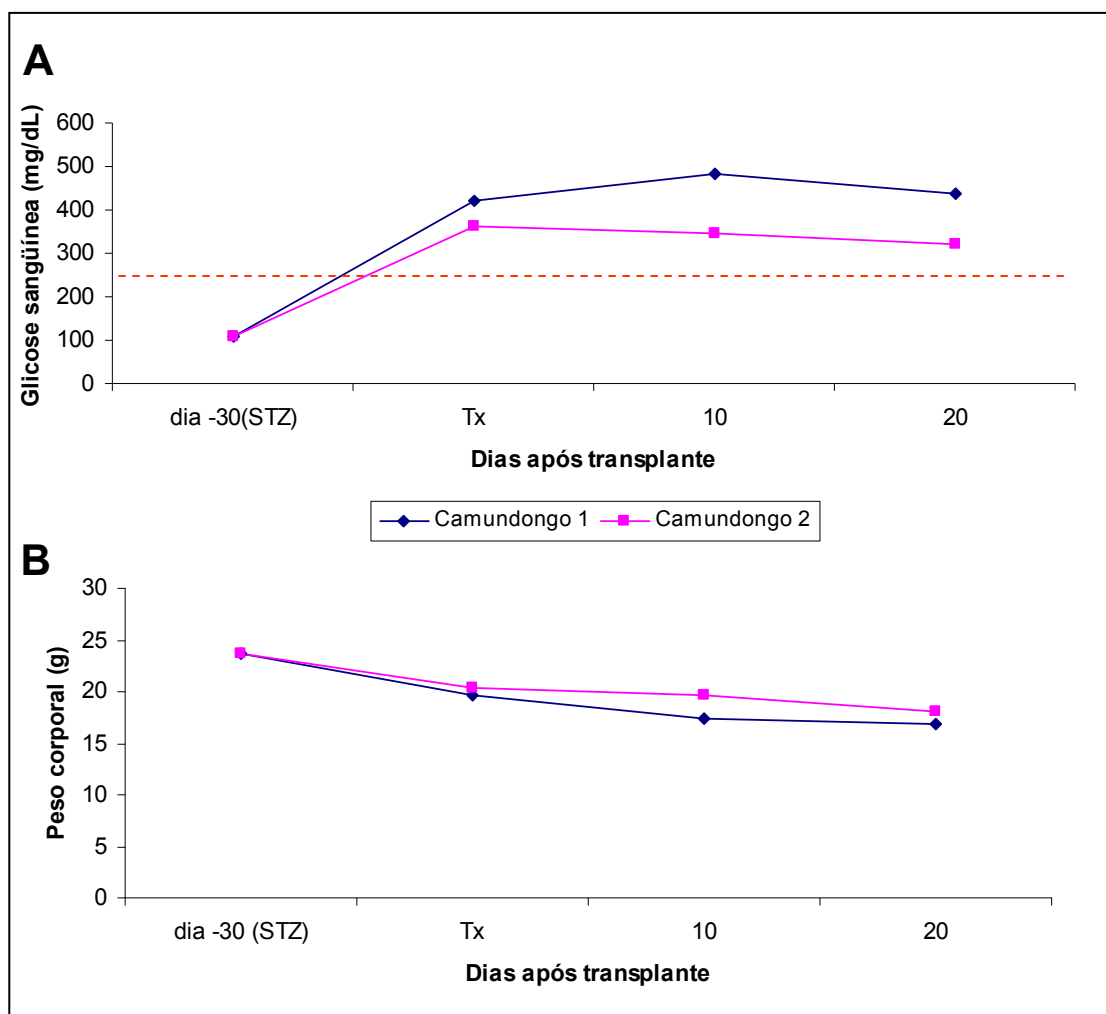


Figura 14 – Gráficos de glicemia (A) e peso corporal (B) de camundongos BALB/c diabéticos induzidos, tratados com implante autólogo sub capsular renal de mMSCs oriundas de rim após ensaio de diferenciação em CPI.

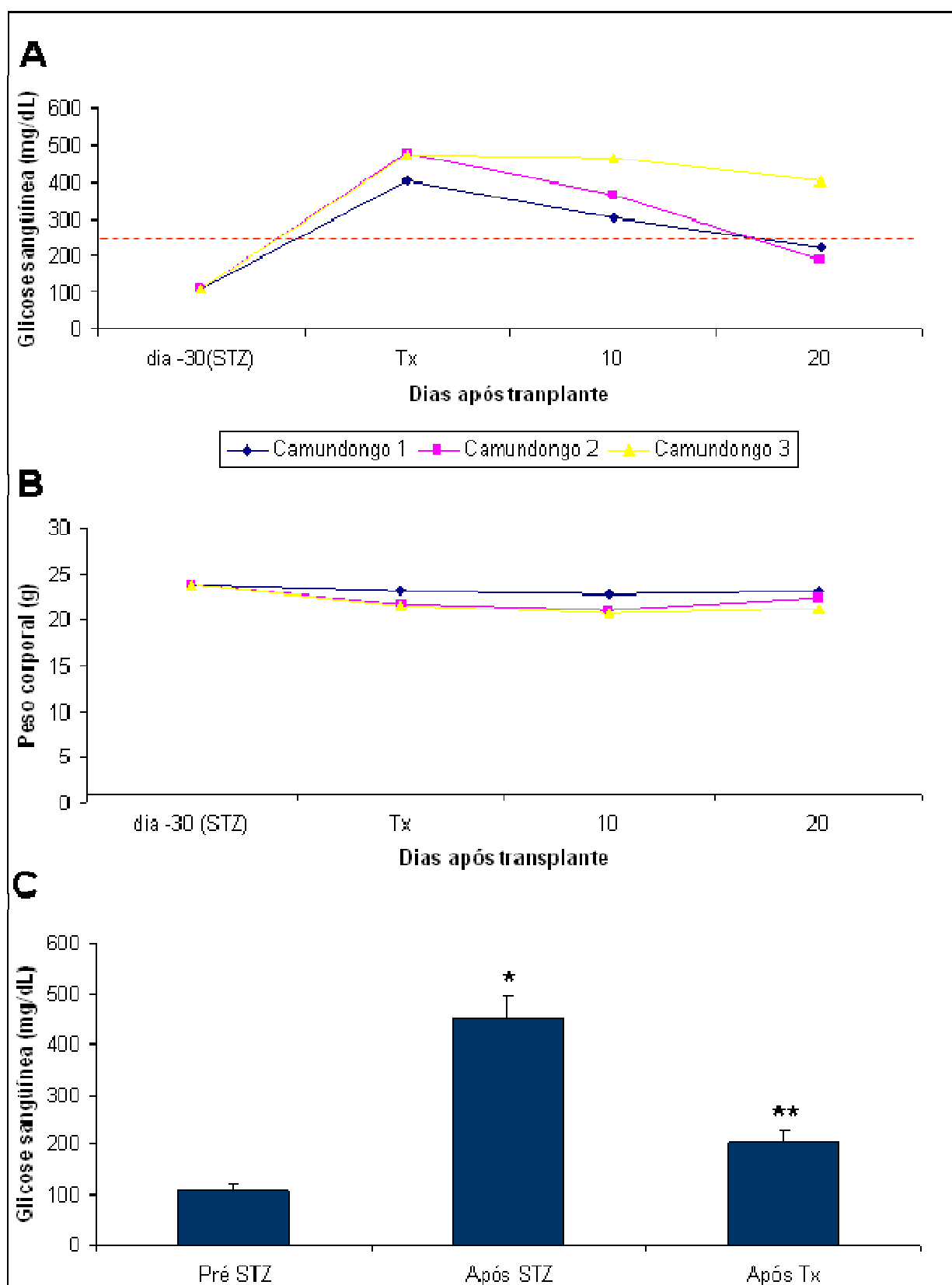


Figura 15 - Gráficos de glicemia (A) e peso corporal (B) de camundongos BALB/c diabéticos induzidos, tratados com implante autólogo sub capsular renal de mMSCs oriundas de pâncreas após ensaio de diferenciação em CPI. Glicose sanguínea dos animais antes e após transplante de mMSCs derivadas de pâncreas (C). Os dados são apresentados em média+DP

($n=4$ em cada grupo). $p<0.005$ ao comparar glicemia pré e após STZ. $**p<0.005$ ao comparar após STZ e após Tx.

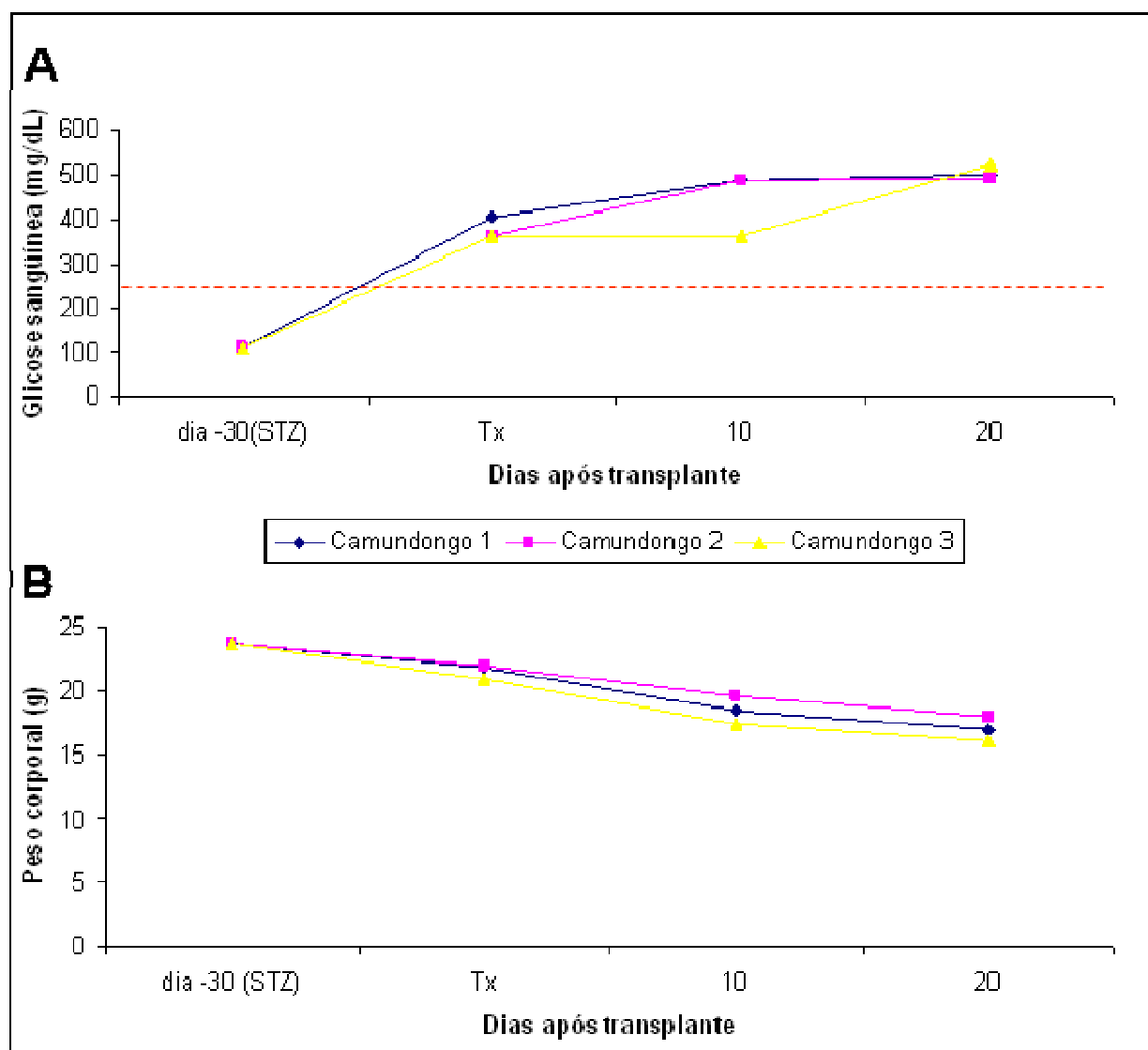


Figura 16 - Gráficos de glicemia (A) e peso corporal (B) de camundongos BALB/c diabéticos induzidos, tratados com implante autólogo sub capsular renal de mMSCs oriundas de pâncreas não diferenciadas.

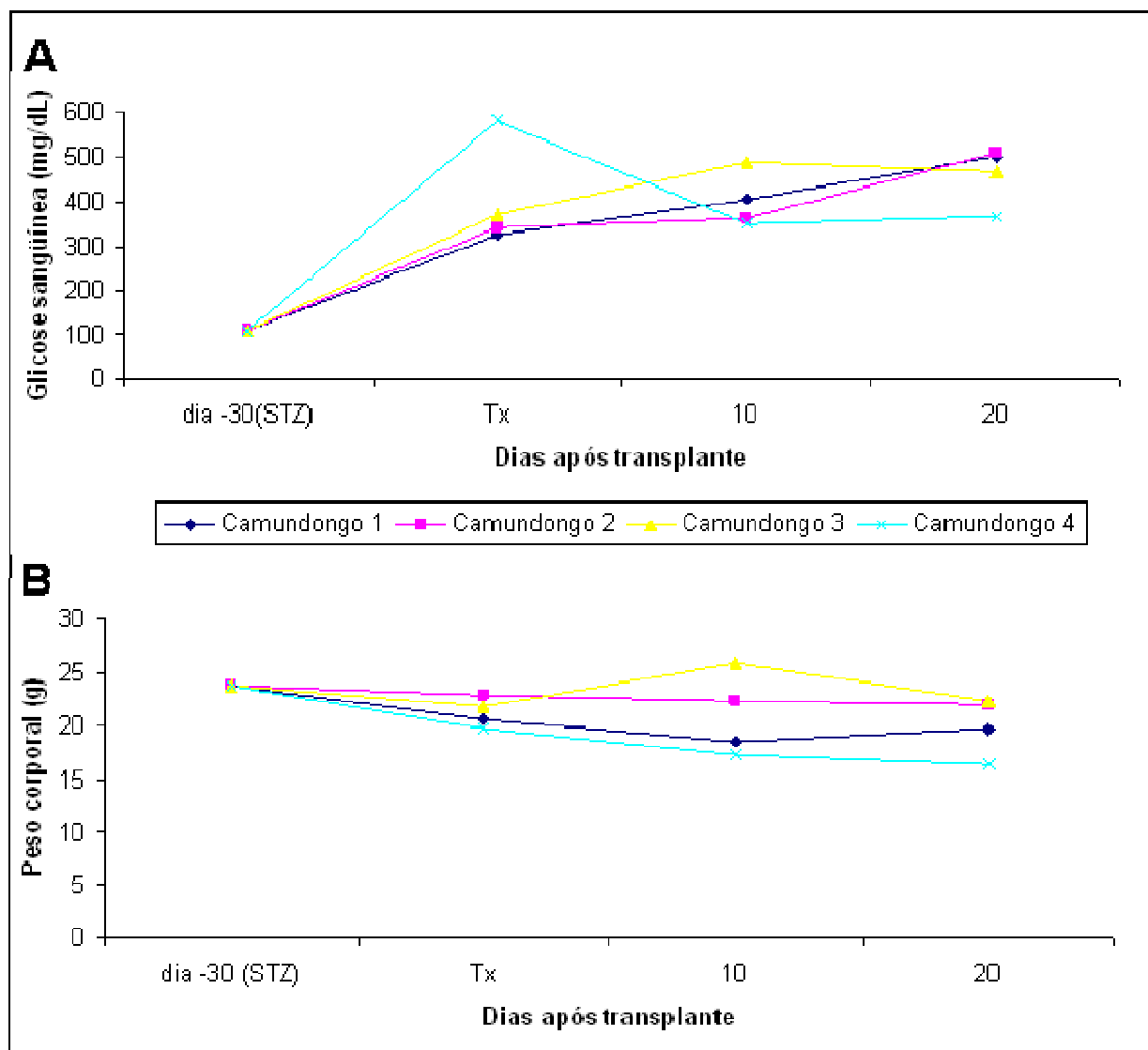


Figura 17 - Gráficos de glicemia (A) e peso corporal (B) de camundongos BALB/c diabéticos induzidos não tratados (controle).

5 DISCUSSÃO

A busca por alternativas terapêuticas para o DM1, voltadas à preservação e/ou regeneração da massa de células β e conseqüentemente à reconstituição do padrão fisiológico de secreção de insulina, tem sido exaustivamente realizada. Dentre as alternativas mais pesquisadas, destacam-se a capacidade regenerativa das células β (Nir, *et al.*, 2007; Teta *et al.*, 2007; Kopinke & Murtaugh, 2010), a contribuição de diferentes linhagens de células-tronco e possíveis precursores neste processo de regeneração, a capacidade imunomoduladora das células-tronco e o bloqueio da autoimunidade (Voltarelli *et al.*, 2007).

Tanto as células-tronco embrionárias quanto as mesenquimais têm mostrado ser potencialmente capazes de originar células produtoras de insulina *ex vivo* quando expostas a estímulos adequados (Zalzman *et al.*, 2003). Uma das limitações no uso das células-tronco embrionárias está relacionada com sua enorme capacidade proliferativa e o risco de desenvolvimento de teratocarcinomas. Assim, explorar a potencialidade plástica das células-tronco mesenquimais derivadas de múltiplos órgãos e tecidos tem sido alvo de estudo de vários grupos de pesquisa.

No presente trabalho, caracterizou-se as células isoladas de MO, rim e pâncreas de camundongos adultos BALB/c quanto à proliferação de células aderentes ao plástico, perfil fenotípico e capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos e adipócitos de acordo com o preconizado pela *International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.*, 2006). Conforme esperado, as células apresentaram morfologia fibroblastóide e alta taxa proliferativa, porém distinta entre as populações. Células estromais derivadas da medula óssea não constituem uma população homogênea (Liu *et al.*, 2009). Nas células de MO encontrou-se graus diversos de heterogeneidade nas culturas após isolamento e purificação, com pequenas células arredondadas entre as fibroblastóides (figura 2G) corroborado pela análise de imunofenotipagem (figura 6). É possível observar na figura 3 que, neste estudo, as populações celulares cresceram de maneira distinta, dando destaque às derivadas de tecidos extramedulares que possuem uma taxa de proliferação maior quando comparada à da MO nas mesmas condições de cultivo. Considerando que o rim é um órgão extremamente vascularizado e que a zona perivascular é o nicho das MSCs *in vivo* (Meirelles *et al.*, 2008), é possível compreender o elevado

potencial de estabelecimento de culturas de células mesenquimais a partir deste tecido, uma vez que uma boa taxa de expansão está diretamente relacionada ao número de células semeadas.

Na ausência de um marcador positivo próprio, as culturas de MSCs podem incluir um número de diferentes populações celulares, todas potencialmente variáveis em suas características fenotípicas e de crescimento, sendo a diferenciação mesenquimal um denominador comum (Bydlowski *et al.*, 2009). As três populações celulares estudadas neste trabalho apresentaram reatividade negativa para os marcadores hematopoiéticos CD11b e CD45. Nas culturas celulares de rim e pâncreas, foi analisada a expressão de moléculas como CD13, que regula a morfogênese endotelial e a motilidade celular e está distribuídas em células mielóides, endoteliais, do estroma de suporte da hematopoese, cerebrais; fibroblastos, monócitos entre outras, e a expressão de Sca-1 (antígeno de células-tronco 1, expresso em células hematopoiéticas murinas). Neste experimento observamos reatividade negativa para CD13, porém positiva para Sca-1 nas células oriundas do pâncreas. Somente a população celular derivada de MO foi analisada quanto ao marcador CD29, que liga-se a cadeias α para formar receptores envolvidos na adesão célula-célula e célula-matriz. Diferentemente das demais populações celulares, as células derivadas de rim se mostraram negativas para o antígeno de superfície CD44 (receptor para o hialuronato – abundante nos tecidos mesodérmicos) e CD49e (subunidade $\alpha 5$ da integrina). As células derivadas do rim e MO não expressaram o marcador hematopoiético CD90.2 (Kipps, 2001; Paraskevas, 2004; Meirelles, 2006). Em geral, o perfil imunofenotípico das populações celulares utilizadas neste estudo, bem como a capacidade de formar adipócitos e osteócitos, quando submetidas aos protocolos de diferenciação, foram critérios funcionais compatíveis à identificação de células-tronco mesenquimais genuínas.

Células-tronco adultas são capazes de responder a estímulos externos e podem adotar perfis de expressão e fenótipo funcional de células de outros tecidos. Logo, o nicho (estímulos bioquímicos produzidos pelo tecido ou meio de cultura no qual a célula está inserida) tem papel decisivo na sua plasticidade (Herzog *et al.*, 2003; Spradling *et al.*, 2001). Um dos critérios importantes na caracterização das MSCs está relacionado a sua capacidade em assumir diferentes fenótipos tais como condrócitos, osteoblastos, adipócitos ou células endoteliais, sob circunstâncias específicas, consistente com o desenvolvimento e a manutenção do órgão do qual

derivam. Esta plasticidade é considerada ortodoxa, já que permanece dentro do contexto da homeostasia tecidual (Bianco *et al.*, 2001). Submeteu-se as células derivadas de rim, pâncreas e MO a ensaios para via osteogênica e adipogênica. A diferenciação em adipócitos é iniciada por fatores que incluem insulina, dexametasona, indometacina e rosiglitazona. A diferenciação é acompanhada não só por alterações na morfologia celular, mas também pela ativação transcripcional de muitos genes o PPAR γ 2 (do inglês, *peroxisome proliferator activated receptor γ 2*) (Tagami *et al.*, 2003). Após quatro semanas de indução, verificou-se a presença de células contendo vacúolos de gordura com afinidade pelo corante Oil Red O (figura 7E e 7H) e morfologia mais arredondada.

O ácido ascórbico, a dexametasona, o β -glicerolfosfato e o SBF são necessários para a ativação da diferenciação em osteócitos. Esta via requer a expressão de genes como o Cbfa-1 (do inglês, *core binding factor alpha1*), fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e colágeno I (Minguell *et al.*, 2000). As células submetidas à diferenciação osteogênica mantiveram um aspecto fusiforme mais semelhante às células não induzidas e apresentaram aumento da atividade da fosfatase alcalina e deposição de uma matriz extracelular rica em cálcio, evidenciados pela coloração de Alizarin Red S.

Células-tronco progenitoras de células β estão presentes no pâncreas, chamando a atenção da comunidade científica por apresentam vantagens em relação às de outros tecidos, agregando características de alta taxa proliferativa com o fato de já estarem parcialmente diferenciadas na direção do fenótipo endócrino. Foram descritas populações de células-tronco pancreáticas derivadas de ilhotas (Janus *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004; Moriscot *et al.*, 2005; Karaoz *et al.*, 2010), ductos (Mezey *et al.*, 2000), células acinares pancreáticas (Azizi *et al.*, 1998; Woodbury *et al.*, 2000; Munoz-Elias *et al.*, 2004), em pâncreas de fetos e adultos (Vogel *et al.*, 2003; Mareschi *et al.*, 2006), mas não em células β (Atouf *et al.* 2007; Chase *et al.* 2007; Kayali *et al.* 2007; Morton *et al.* 2007; Weinberg *et al.* 2007). Células mesenquimais com potencial de diferenciação em produtoras de insulina também foram encontradas em tecidos extra-pancreáticos como fígado (Cai *et al.*, 2004), sistema nervoso central (Zhou *et al.*, 2001), baço (Habener, 2005), pele (Fellous *et al.*, 2009), medula óssea (Lechner *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2004; Moriscot, 2005; González, 2010) e tecido adiposo (Timper *et al.*, 2006). No entanto, não se

encontrou na literatura estudos que explorassem a capacidade de diferenciação das células mesenquimais renais em CPIs.

As culturas derivadas de pâncreas, rim e MO também foram avaliadas quanto à sua potencialidade para diferenciação em células produtoras de insulina, através de tratamento com três protocolos distintos. Chen e colaboradores (2004), isolaram células-tronco mesenquimais de MO de ratos e, após indução, obtiveram células produtoras de insulina funcional com expressão do gene e da proteína. Ao contrário do esperado, ao adaptarmos o protocolo de Chen e colaboradores (2004) às populações estudadas, observou-se formação de aglomerados celulares. No entanto, somente as mMSCs do pâncreas desenvolveram *clusters* e nenhuma das mMSCs coraram em presença de DTZ ou expressaram o gene da insulina. Embora o grupo de Chen tenha utilizado células de MO de outra espécie murina, as mMSCs medulares, neste estudo, não sofreram qualquer modificação na sua morfologia. Phuc e colaboradores (2010) utilizaram um protocolo similar ao descrito por Chen, utilizando MSCs isoladas de cordão umbilical humano, e obtiveram resultados satisfatórios com normalização dos níveis glicêmicos quando transplantadas em pâncreas de camundongos. São vários os estudos que utilizam a nicotinamida e o β -mercaptoetanol, que potencializa os efeitos endócrino-estimulatório da nicotinamida, como comprovados indutores para diferenciação em CPI, porém diante dos resultados encontrados, sente-se necessidade de aprofundamento da compreensão dos mecanismos no processo de (trans)diferenciação e adaptação do protocolo.

O segundo protocolo aplicado considerou o potencial da nicotinamida, inibidor da síntese da poli ADP-ribose que possui efeito estimulatório das células progenitoras do pâncreas em células produtoras de insulina e protetor da dessensibilização dos receptores de glicose (Tang *et al.*, 2004; Chao *et al.*, 2008). As células derivadas de pâncreas induzidas à diferenciação em CPI, após submetidas a este ensaio, organizaram-se em *clusters*, porém não responderam à coloração com ditizona e tampouco expressaram o gene da insulina 1. O mesmo ocorreu com as células derivadas de rim e MO, todavia assumindo morfologia endotelial com agrupamentos tridimensionais similares à angiogênese *in vitro* (figura 9B e 9F).

No presente trabalho, através do protocolo adaptado de Timper e colaboradores (2006), nós demonstramos que células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, rim e pâncreas possuem distintamente capacidade de

(trans) diferenciação em células aptas a adotar fenótipo endócrino pancreático expressando insulina 1 *in vitro*. Os mecanismos que levam à diferenciação de células adultas em células produtoras de insulina ainda são mal compreendidos, já os indutores utilizados neste estudo são reconhecidamente importantes neste processo. A exendina-4, descoberta na saliva do lagarto *Heloderma suspectum*, é um peptídeo sintético 53% homólogo ao hormônio GLP-1 (do inglês, *Glucagon like-peptide-1*) (Eng *et al.*, 1992) o que lhe confere características importantes no que diz respeito à diferenciação, aumento de massa celular e neogênese de ilhotas pancreáticas. Logo, é um potente secretagogo de insulina (Xu *et al.*, 1999; Hui *et al.* 2001; Abraham *et al.* 2002 Bai; Meredith G and Tuch, 2005). A nicotinamida é um inibidor da síntese da poli ADP-ribose e possui efeito estimulatório das células progenitoras do pâncreas em células produtoras de insulina (Tang *et al.*, 2004). Na necessidade de recriar *in vitro* um ambiente similar à fase embriogênica, as células mesenquimais foram induzidas a formar a endoderme pancreática enriquecendo o meio com ativina A, uma proteína da família do TGF- β (do inglês, *transforming growth factor β*) (D'Amour *et al.*, 2005).

Utilizando estes potentes fatores, conseguiu-se não somente induzir a formação de agregados celulares mimetizando a arquitetura de uma ilhota pancreática, como também a ativação do gene da insulina nas três populações celulares estudadas, assim como a expressão da proteína em questão. Segundo Timper e colaboradores (2006), este processo se deve ao fato do meio enriquecido estimular a ativação de fatores de transição *Ipf-1*, *Isl-1*, *Ngn-3* cruciais para o desenvolvimento de células endócrinas do pâncreas. Uma das questões inquietantes, contrariando uma gama de estudos que envolvem diferenciação endócrino pancreática (Kim *et al.*, 2000; Bonner-Weir & Weir, 2005), refere-se ao fator chave indutor deste processo, a ativina A. As mMSCs pancreáticas responderam de maneira distinta diante da adição ou não do indutor ao meio. As células que receberam meio suplementado com ativina não expressaram insulina 1 (figura 13). Na fase embrionária a ativina A desempenha um papel importante no desenvolvimento do pâncreas, enquanto que na fase adulta está envolvida na manutenção, reparo tecidual e ativação de fibroblastos.

A funcionalidade das CPIs *in vivo* foi observada nas células derivadas de pâncreas, quando transplantadas em cápsula renal de camundongos diabéticos induzidos. Não foi possível distinguir-se a origem das células progenitoras

pancreáticas, diferenciadas em CPIs através deste protocolo, uma vez que o fragmento inicial continha, além de células β , tecido acinar, endotelial e estromal. MSCs coletadas de diferentes tecidos apresentam um padrão geral semelhante, quanto a características como imunofenótipo, plasticidade, entre outras, mas algumas diferenças sugerem que outras características biológicas sejam específicas (da Silva Meirelles *et al.*, 2008). Por outro lado, não é possível afirmar que este achado advém de um possível privilégio tecido-específico, em que as células estejam parcialmente diferenciadas na direção do fenótipo endócrino. Para tanto seria necessário dar continuidade ao estudo e explorar de maneira mais aprofundada o potencial das células-tronco mesenquimais murinas derivadas de rim, já que elas comprovadamente expressaram o gene e a proteína insulina 1 *in vitro*, além de apresentarem uma alta taxa proliferativa quando estimuladas.

Esforços têm sido empreendidos na tentativa de elucidar os mecanismos etiológicos do DM1, além de avanços no tratamento, objetivando buscar soluções de impacto sobre a doença e melhoria da qualidade de vida das pessoas acometidas. A obtenção de um produto celular capaz de mimetizar efetivamente as características endócrinas das células β pancreática ainda é um grande desafio, mas promissor quando nos deparamos com o número de pesquisas engajadas em aperfeiçoar protocolos de terapia regenerativa e compreender o mecanismo que envolve todo este intrigante processo fisiológico regenerativo. Assim, ainda é necessário definir o real papel das células-tronco na terapia do DM1, seja na regeneração tecidual ou na imunorregulação.

6 CONCLUSÃO

- Levando em consideração a facilidade de isolamento, aderência ao plástico, propagação em cultura e imonofenotipagem, as células isoladas de rim, pâncreas e MO de camundongos BALB/c apresentaram-se como células-tronco multipotentes;
- Foi possível gerar células com características de CPIs, incluindo morfologia esférica, formação de *clusters*, secreção de insulina positiva para ditizona e expressão *in vitro* do gene e da proteína da insulina-1 a partir de células-tronco mesenquimais isoladas de rim, pâncreas e MO;
- As células produtoras de insulina derivadas de células-tronco mesenquimais pancreáticas podem reverter o estado hiperglicêmico quando transplantadas em cápsula renal de camundongos diabéticos induzidos, indicando que são capazes de diferenciarem-se *in vitro* em CPIs funcionais;

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe uma justificada, intensa e constante pesquisa em torno do DM1 em todo o mundo, particularmente, para um melhor entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença e avanços na prevenção e tratamento desta doença. Dentro desta proposta, o grupo do Laboratório de Transplantes do Instituto de Pesquisas Biomédicas e Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da PUCRS está empenhado em estudar, clínica e experimentalmente, etiologia, patogenia, diagnóstico e terapia do diabetes mellitus, em especial ao DM1.

Acredita-se que modelos animais experimentais são valiosas ferramentas para estudo das doenças humanas por eles mimetizadas, principalmente no campo de doenças autoimunes, oferecendo oportunidades de pesquisa na formulação de novas modalidades terapêuticas. Sendo assim, a pesquisa sobre DM1, do Laboratório de Transplantes, tem como principal objetivo a sedimentação dos conhecimentos da terapia celular do diabetes pela aplicação terapêutica de ilhotas pancreáticas e células-tronco através do uso de biomodelos de DM1. Biomodelos experimentais de DM1 têm viabilizado, dentro do grupo, a produção de pesquisas sobre transplante de ilhotas pancreáticas como tratamento alternativo para a doença, sobretudo ao que diz respeito aos diferentes métodos de isolamento, estresse oxidativo e efeito citoprotetor de tocoferóis na viabilidade e funcionalidade de ilhotas pancreáticas.

A presente tese inaugurou uma cooperação científica entre dois grupos com interesses em comum, o Laboratório de Transplantes (IPB/PUCRS) e o Laboratório de Imunogenética (UFRGS). O estudo que a autora apresenta abre espaços, facilitando ao grupo do Laboratório de Transplantes o desenvolvimento de projetos envolvendo células-tronco mesenquimais, *in vitro* e em modelos animais. A presença de vários fatores, assim como as limitações éticas impostas na investigação da doença em humanos faz com que sejam utilizados modelos animais.

O presente estudo utilizou, como receptores dos implantes celulares, camundongos BALB/c, cujo diabetes é induzido quimicamente por única dose de 200 mg/kg de estreptozotocina. A indução experimental de diabetes em animais

ocorre após a destruição química seletiva das células beta pancreáticas. A STZ, na dosagem de 160 a 250 mg/kg, tem um efeito citotóxico direto nas células beta de camundongos. Causa dano no ácido desoxirribonucléico (DNA), depletando Nicotina Adenina Dinucleotídeo (NAD⁺), que inibe a biossíntese e a secreção de insulina e, deste modo, inicia a morte das células beta, através da depleção de energia. Em doses sub-diabetogênicas (40mg/kg) a STZ pode produzir insulite pancreática, com morte progressiva das células beta levando também ao diabetes mellitus. O aparecimento de lesão inflamatória nas ilhotas sugere que, múltiplas baixas doses de STZ agem pela iniciação de reação imune mediada por células (Rayat *et al.*, 2000). Weide e Lacy demonstraram que a natureza da insulite é autoimune devido à indução de neo-antígenos nas ilhotas por ação da STZ (Weide & Lacy, 1991).

Assim, o modelo estudado para avaliar a reversão do diabetes pelo implante das IPCs, não mimetizou de forma fidedigna a doença na condição humana. Novos ensaios devem ser realizados em camundongos NOD (do inglês, *non-obese diabetic*) que desenvolvem diabetes através da destruição das células produtoras de insulina, de forma semelhante à observada em humanos (Kodama *et al.*, 2003). A utilização de camundongos NOD, ainda que possua ampla diferença imunológica funcional quando comparada ao homem, permitiria avaliar não só os efeitos das IPCs implantadas, como também os efeitos da autoagressão voltadas a elas e recidiva da doença. Embora se tenha observado normalização da glicemia nos camundongos que receberam IPCs derivadas de pâncreas, não podemos avaliar se isso se deve à atividade imunossupressora da célula e subsequente efeito protetor no tecido danificado ou apenas sua capacidade em produzir insulina. Em todo caso, houve um efeito, mesmo que indireto, proporcionando apoio endócrino às células pancreáticas.

Ainda, testes de imunohistoquímica do tecido renal, no qual as células foram implantadas, devem ser realizados para analisar a detecção da expressão de insulina. Otimizando o desenho experimental, mMSCs isoladas de camundongos transgênicos para a proteína verde fluorescente (GFP) diferenciadas em CPI e implantadas em animais diabéticos imunodeficientes (NOD/SCID), poderiam ser utilizadas como marcador, avaliando possível migração ao tecido lesado. Dados quantitativos da secreção de insulina, em resposta à glicose, não foram avaliados e sua análise será objetivo previsto na continuação deste estudo, bem como a

expressão de outros hormônios, além da insulina, importantes no processo de restauração glicêmica como glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático.

Mesmo que os achados não sejam aplicáveis diretamente às condições encontradas em humanos, visto a dificuldade clínica para obtenção de tecido renal ou mesmo de tecido pancreático para isolamento de células-tronco mesenquimais, estudos como os descritos na presente tese podem contribuir para a pesquisa básica na construção do conhecimento necessário em futuras abordagens do potencial terapêutico e de plasticidade das células-tronco mesenquimais. Assim, se entende que é preciso continuar investigando os intrigantes processos que envolvem a regeneração tecidual endócrina e a colaboração efetiva das MSCs à terapia no DM1.

REFERÊNCIAS

- Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H & Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulinproducing cells. *Endocrinology* 2002;143 3152–3161.
- Aggarwal S e Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell response. *Blood*, 2005; 105:1815-1822.
- American Diabetes Association. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2002. *Diabetes Care*, 2003; 26:917-932.
- Amit M, Itskovitz-Eldor J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J. Anat.*,2002; 200, 225–232.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, 2001; 358: 221-229.
- Atouf F, Park C H, Pechhold K, Ta M, Choi Y, Lumelsky N L. No evidence for mouse pancreatic beta-cell epithelialmesenchymal transition *in vitro*; *Diabetes*, 2007; 56 699–702.
- Azizi, S. A., Stokes, D., Augelli, B. J., DiGirolamo, C. & Prockop, D. J. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95, 3908-13.
- Bai L; Meredith G and Tuch BE. Glucagon-like peptide-1 enhances production of insulin in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells *Journal of Endocrinology*, 2005; 186:343–352.
- Balda CA, Pacheco-Silva A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. *Revista da Associação Médica Brasileira*,1999; 45 (2): 175-80.
- Banerjee M, Bhonde RR. Islet generation from intra islet precursor cells of diabetic pancreas: *in vitro* studies depicting *in vivo* differentiation. *JOP* , 2003; 4: 137-145.
- Banfi A, Muraglia A, Dozin B, *et al*. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cells therapy. *Exp Hematol*, 2000; 28:707-715.
- Bianco P, Riminucci M, *et al*. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 2001;19:180-92.

Bonner-Weir S & Weir C. New sources of pancreatic β -cells. *Nature Biotechnology* 2005; 23:7

Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, *et al.* *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *PNAS*, 2000; 97:7999-8004.

BRASIL. Lei 11.794, de 11 de outubro de 2008. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. 11 out. 2008.

Bromberg JS, Kaplan B, Halloran PF, Robertson RP. The islet transplant experiment: Time for a reassessment. *Am J Transplant* , 2007; 7: 2217–18.

Bydlowski, SP; Debes, AA; Maselli, LMF *et al.* Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. bras. hematol. Hemoter*, 2009;31(supl.1):25-35.

Cai J, Cheng A, Luo Y, *et al.* Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells, *J. Neurochem*, 2004; 88:212–226.

Cao, LZ, Tang, DQ, Horb ME *et al.* High Glucose Is Necessary for Complete Maturation of Pdx1-VP16–Expressing Hepatic Cells into Functional Insulin-Producing Cells. *Diabetes*, 2004; 53.

Cefalu, W. T. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Experimental biology and medicine*, v.226, n.1, Jan, p.13-26. 2001. Disponível em: <<http://www.ebmonline.org/cgi/reprint/226/1/13>>. Acesso em: 22 jan. 2008.

Cesarini PR, Mendonça E, Fernandes V *et al.* Prevalência dos marcadores imunológicos anti-GAD e anti-IA2 em parentes de primeiro grau de diabéticos do tipo 1 em amostra da população da grande São Paulo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2003;49(4): 395-400.

Chase L G, Ulloa-Montoya F, Kidder B L, and Verfaillie C M. Islet-derived fibroblast-like cells are not derived via epithelial-mesenchymal transition from Pdx-1 or insulin-positive cells. *Diabetes*, 2007; 56 3–7.

Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta cells. *World J Gastroenterol*, 2004;10:3016–20.

Conget, P. A.; Minguell, J. J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol*, 1999; 181:67-73.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26(9):2287-99.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119:2204-13.

da Silva Meirelles L, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol*, 2003;123:702-711.

da Silva Meirelles L, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Bioscience*, 2009; 14:4281-4298.

Delovitch TL, Singh B. The Nonobese Diabetic Mouse as a Model of Autoimmune Diabetes: Immune Dysregulation Gets the NOD. *Immunity*, 1997; 7: 727-738.

Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *British Medical Journal*, 2004; 24, 328: 750-754.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S e Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002; 99:3838-3843.

DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R e Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*, 1999; 107:275-281.

Dominici M, Le Blanc K, Muellerl, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006:315-317.

Donovan PJ e Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 2001; 414:92-97.

Duvillie B, Attali M, Aiello V, Quemeneur E, Scharfmann R. Label-retaining cells in the rat pancreas: location and differentiation potential *in vitro*. *Diabetes*, 2003;52:2035-42

Efrat S. Generation of insulin-producing cells from stem cells for cell replacement therapy of type 1 diabetes. *Isr Med Assoc*, 2004; J 6:1-3.

Eisenbarth GS. Animal Models of type 1 Diabetes: Genetics and immunological function. IN:L Type I diabetes: Molecular, Cellular, and Clinical Immunology [capítulo de livro on line] [capturado 2005 Ago 02]; Chapter 3: Disponível em: <<http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/oxch3.html>>.

Eisenbarth, GS, McCulloch, DK. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus [capturado 2006 nov 02]: Disponível em: <<http://patients.uptodate.com/topic.asp?file=diabetes/5832#references>>.

Eliaschewitz FG, Franco DR, Mares-Guia TR, *et al.* Transplante de ilhotas na prática clínica: estado atual e perspectivas. *Endocrinol Metab*. 2009; 53(1):15-23

- Eng J, Kleinman WA, Singh L, *et al.* Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue from *Heloderma suspectum* venom. *J Biol Chem* 1992; 267:7402–7405.
- Fellous TG, McDonald SA, Burkert J, *et al.* A methodological approach to tracing cell lineage in human epithelial tissues. *Stem Cells*, 2009; 27:1410-20.
- Fernandes APM, Pace AE, Zanetti ML, Foss MC, Donadi EA. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. *Rev Latino-am Enfermagem*, 2005;13(5):743-9.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 1998; 279:528-530.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF e Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976; 4:267-274.
- Froud T, Ricordi C, Baidal DA, *et al.* Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant*. 2005; 5:2037-46.
- Fujita Y, Cheung AT, Kieffer TJ. Harnessing the gut to treat diabetes. *Pediatric Diabetes*, 2004; 5:57-69(13).
- Gammaitoni L, Bruno S, Sanavio F, *et al.* *Ex vivo* expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hematopoietic reconstitution. *Exp Hematol*, 2003; 31:261-270.
- Gao R, Ustinov J, Pulkkinen M-A, *et al.* Characterization of Endocrine Progenitor Cells and Critical Factors for Their Differentiation in Human Adult Pancreatic Cell Culture. *Diabetes*, 2003; 52:2007-15
- González P, Santos TM, Calil A, *et al.* Expression of pancreatic endocrine markers by prolactin-treated rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 2010; 42(2):566-9.
- Guz Y, Nasir I, Teitelman G. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology*, 2001; 142: 4956–4968.
- Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology*, 2004;146:1025-1034.
- Hakenlien A, Landsverk HB, Robl JM, Skalhegg BS e Collas P. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol*, 2002; 20:460-466.

He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ e Feng MF. Activation, isolation, identification and *in vitro* proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif* , 2003; 37:177-187.

Herzog EL, Chai LC e Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 2003; 102(10):3483-3493.

Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S, Matsuyoshi N, and Nishikawa S. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an *in vitro* model of vasculogenesis. *Blood*, 1999; 93: 253–263.

Hui R, Wright C, Perfetti R Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1 positive pancreatic ductal cells into insulin-secretion cells. *Diabetes*, 2001; 50 785–796.

Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34⁻ hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells*, 2000;18:1-9.

Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D. & Hussain, M. A. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*, 2003; 111, 843-50.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001; 107:1395-1402.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002b; 418:41-49.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, *et al.* Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*, 2002a; 30:896-904.

Joglekar M V, Joglekar M V, Joglekar V , Hardikar AA. Human fetal pancreatic insulin-producing cells proliferate *in vitro*. *Journal of Endocrinology*, 2009; 201, 27–36

Junqueira LC e Carneiro J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan S.A. 1999; Rio de Janeiro, 427 pp.

K.A. D'Amour, A.D. Agulnick, S Eliazer, *et al.*, Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm, *Nat Biotechnol* , 2005; 23:1534-1541.

Karaoz E, Ayhan S, Gacar G, *et al.* Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy*. 2010;12(3):288-302.

Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S. Generation of insulinproducing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells*, 2007;25:2837–44.

Kayali A G, Flores L E, Lopez A D, *et al.* Limited capacity of human adult islets expanded *in vitro* to redifferentiate into insulin-producing beta-cells; *Diabetes*, 2007; 56 703–708.

Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz F. Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*, 1967;61(6):827-37.

Kempf MC, Andres A, Morel P, *et al.* Logistics and transplant coordination activity in the GRAGIL Swiss- French multicenter network of islet transplantation. *Transplantation*. 2005;79:1200-5.

Kim SK, Hebrok M, Li E, *et al.* Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev*. 2000; 14: 1866-1871

Kim SY, Lee SH, Kim BM, Kim EH, Min BH, Bendayan M, Park IS. Activation of nestin-positive duct stem (NPDS) cells in pancreas upon neogenic motivation and possible cytodifferentiation into insulin-secreting cells from NPDS cells. *Dev Dyn*. 2004;230:1–11.

Koczawara K, Schenker M, Schmid S, Kredel K *et al.* Characterization of antibody responses to endogenous and exogenous antigen in the nonobese diabetic mouse. *Clinical Immunology*, 2003; 106: 155-162.

Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science*, 2003; 302: 1223-1227.

Kodama S, Toyonaga T, Kondo T, Matsumoto K, Tsuruzoe K, Kawashim J *et al.* Enhanced expression of PDX-1 and Ngn3 by exendin-4 during beta cell regeneration in STZ-treated mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 327: 1170-1178.

Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, NeuroD-beta cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med.*, 2003; (5):504-5.

Kolb K, Mandrup-Poulsen T. An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia*, 2005; 48(6): 1038-50.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96:10711-10716.

Kopinke D, Murtaugh LC. Exocrine-to-endocrine differentiation is detectable only prior to birth in the uninjured mouse pancreas. *BMC Developmental Biology*, 2010; 10:38.

Kulmala P, Savola K, Reijonen H, *et al.* Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes*, 2000; 49:48-58.

Kulmala P. Prediabetes in children: natural history, diagnosis and preventive strategies. *Pediatric drugs*, 2003; 5(4): 211-21.

Labriola L, Peters MG, Krogh K, *et al.* Generation and characterization of human insulin-releasing cell lines. *BMC Cell Biol.* 2009; 10:49.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL e Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nature Med*, 2000; 6(11):1229-1234.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE e Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 2003; 57:11-20.

Lechner A, Leech CA, Abraham EJ, *et al.* Habener, Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATPbinding cassette transporter. *Biochem. Biophys.*2002; 293:670–674.

Lechner A, Nolana AL, Blackena RA, Habener JF. Redifferentiation of insulin-secreting cells after *in vitro* expansion of adult human pancreatic islet tissue. *Bioch Bioph Res Commun*, 2005; 327:581:8.

Lee M.-S., Chang I., Kim S. Death effectors of β -cell apoptosis in type 1 diabetes (2004) *Molecular Genetics and Metabolism*, 83 (1-2), pp. 82-92.

Li H, Lam A, Xu AM, Lam KS, Chung SK. High dosage of Exendin-4 increased early insulin secretion in differentiated beta cells from mouse embryonic stem cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2010; 31(5):570-7.

Li WC, Horb ME, Tosh D, Slack JM. *In vitro* transdifferentiation of hepatoma cells into functional pancreatic cells. *Mech Dev.* 2005; 122(6):835-47.

Libman I, Songer T, LaPorte R. How many people in the U.S. have IDDM ? *Diabetes Care*, 1993; 16: 841-2.

Lin G, Wang G, Liu G, *et al.* Treatment of Type 1 Diabetes with Adipose Tissue-Derived Stem Cells Expressing Pancreatic Duodenal Homeobox 1. *Stem Cells Dev.*, 2009;

Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2002; 31:391-410.

Liu J, Lu XF, Wan L, *et al.* Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line. *Transplant Proc*, 2004; 36:3272-3275.

Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2009;106(6):984-91.

Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, *et al.* Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem*, 2006; 97(4):744-54.

Matarese G, Sanna, V, Lechler R, *et al.* Leptin Accelerates Autoimmune Diabetes in Female NOD Mice. *Diabetes*, 2002;51(5):1356-1361.

Matsuoka, Ta H. Kaneto, R. Stein, *et al.* MafA Regulates Expression of Genes Important to Islet {beta}-Cell Function. *Mol. Endocrinol.*, 2007; 21(11): 2764 - 2774.

McNiece I, Briddell R. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Exp Hematol*, 2001; 29:3-11.

Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. & McKercher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science*, 2000; 290, 1779-82.

Milech A, Oliveira JEP. Diabetes Mellitus – Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar. São Paulo: Atheneu; 2004.

Moriscot C, de Fraipont F, Richard M J, *et al.* Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation *in vitro*; *Stem Cells* 2005; 23: 594–603.

Morris RJ, Liu Y, Marles L, *et al.* Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol*, 2004; 22(4):411-117.

Morton R A, Geras-Raaka E, Wilson L M, Raaka B M and Gershengorn M C. Endocrine precursor cells from mouse islets are not generated by epithelial-to-mesenchymal transition of mature beta cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 2007; 270 87–93.

- Munoz-Elias, G., Marcus, A. J., Coyne, T. M., Woodbury, D. & Black, I. B. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci*, 2004; 24, 4585-95.
- Nagasao J, Yoshioka K, Amasaki H, Mutoh K. Expression of nestin and IGF-1 in rat pancreas after streptozotocin administration. *Anat Histol Embryol*. 2004; 33: 1-4.
- Nakajima-Nagata N, Sakurai T, Mitaka T, *et al*. *In vitro* induction of adult hepatic progenitor cells into insulin-producing cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004; 318:625-30.
- Nardi NB e Alfonso ZC. The hematopoietic stroma. *Braz J Med Biol Res*, 1999; 32:601-609.
- Nir T, Melton DA, Dor Y: Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest*, 2007;117:2553-61.
- Obayashi H, Hasegawa G, Fukui M, *et al*. Tumor necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1*1502-DQB1*0601 allele and anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85:3348-51.
- Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, *et al*. Adult bone marrow-derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest*, 2004; 84:607-17.
- Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, *et al*. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells*, 2000; 18:295-300.
- Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 2002; 72:570-585.
- Phuc PH, Truc PL, Thuy DT *et al*. Regeneration of Pancreatic Cells of Type 1 Diabetic Mouse by Stem Cell Transplantation. Proceedings of the 3rd International Conference on the Development of BME in Vietnam. 2010.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284:143-147.
- Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1802-12.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells from nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997; 276:71-74.

Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, *et al.* Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*, 2002; 30:783-791.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:1-22.

Rayat GR, Singh B, Korbitt GS, Rajotte RV. Single injection of insulin delays the recurrence of diabetes in syngeneic islet-transplanted diabetic NOD mice. *Transplantation* 2000; 70: 976-985.

Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, *et al.* Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat Med*, 2000; 6:278-82.

Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B e Le Blanc K . Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, 2003; 76:1208-1213.

REDCDM. The 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*, 2003; 26 Suppl :5-20.

Rewers M, Klingensmith GJ. Prevention of Type 1 Diabetes. *Diabetes Spectrum*, 1997; 10(4): 282-292.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, *et al.* Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2003; 98(9):2615-2625.

Robertson RP, Davis C, Larsen J, *et al.* Pancreas and islet transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 935–39.

Roche E, Sepulcre MP, Enseñat-Waser R, Maestre I, Reig JA, Soria B. Bio-engineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells: A review of progress. *Med Biol Eng Comput*, 2003; 41: 384-391.

Rosmalen JGM, Leenen PJM, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 2002; 13(5): 209-214.

Ruggenenti P, Remuzzi A, Remuzzi G. Decision time for pancreatic islet-cell transplantation. *The Lancet*, 2008; 371.

Ruggeri L, Capanni M, Martelli MF e Velardi A. Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Curr Opin Hematol*, 2001; 8(6):355-359.

Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, *et al.* Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005; 54:2060-9.

Ryan EA, Paty BW, Senior PA, *et al.* Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*, 2005; 54:2060-2069.

Salminen KK, Vuorinen T, Oikarinen S, *et al.* Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. *Diabet Med*, 2004; 21:156- 64.

SBCAL. Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório.. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 24 fev. 2009.

Scharfmann R. Alternative sources of beta cells for cell therapy of diabetes. *Eur J Clin Invest*, 2003; 33:595-600.

Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, *et al.* Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol*, 2004; 22(9):1115-24.

Senior PA, Zeman M, Paty BW, Ryan EA, Shapiro AMJ. Changes in renal function after clinical islet transplantation: four-year observational study. *Am J Transplant* 2007; 7: 91–98.

Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, *et al.* International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006; 355:1318-30.

Shapiro J, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM e Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 2000; 343(4):230-238.

Shaw JE , Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research an clinical practice*, 2009; 87; 4-14.

Shiro A, Yoshikawa I, Yokota H, *et al.* Identification of Insulin-Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Zinc-Chelating Dithizone. *Stem Cells* , 2002; 20:284-292.

Skyler, J. S. Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies. *Journal Médicinal Chemistry*, 2004.

Soria B, Roche E, Berná G, Leon-Quinto T, Reig JA e Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*, 2000; 49:1-6.

Stevens RB, Matsumoto S e Marsh CL. Is islet transplantation a realistic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future? *Clinical Diabetes*, 2001; 19(2):51-60.

Sun Y, Chen L, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Sun L, *et al.* Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells *in vitro*. *Chin Med J (Engl)*, 2007;120:771-6.

Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes*, 2004; 53: 2143-2152.

Tagami, M, Ichinose, S, Yamagata, K. *et al.* Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. *Cell Tissue Res.*, 2003; 312: 31-40.

Tambascia MA, Geloneze Neto B. Resistência à insulina. In Godoy-Matos AF, editor. Síndrome Metabólica. São Paulo: *Atheneu*; 2005.p.47-53.

Tang DQ, Cao LZ, *et al.* *In vivo* and *in vitro* characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*, 2004; 53 (7): 1721-32

Terada N, Hamazaki T, Oka M, *et al.* Bone marrow cell adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2000; 416:542-545.

Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA. Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* , 2007; 12:817-26.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998; 282:1145-1147.

Timper K, Saboek D, Eberhardt M, *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, , somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 341:1135-40.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. *The Lancet*, 1998; 352: 854-865.

Vogel W., Grunebach F., Messam C.A., *et al.* Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells, *Haematologica*, 2003; 88: 126-133.

Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, *et al.* Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2007;297:1568-76.

Voltarelli, JC, Couri CEB, Rodrigues, MC. *et al.* Terapia celular no diabetes mellitus. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31(Supl. 1):149-156.

Wang R, Li J, Yashpal N. Phenotypic analysis of c-Kit expression in epithelial monolayers derived from postnatal rat pancreatic islets. *J Endocrinol*, 2004;182:113–122.

Watt FM e Hogan BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 2000; 287:1427-1430.

Weide, L.G., and P.E. Lacy. 1991. Low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. *Diabetes*. 40:1157

Weinberg N, Ouziel-Yahalom L, Knoller S, Efrat S and Dor Y. Lineage tracing evidence for *in vitro* dedifferentiation but rare proliferation of mouse pancreatic beta-cells; *Diabetes* 2007 56 1299–1304.

Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. & Black, I. B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000; 61, 364-70.

Wu XH, Liu CP, Xu KF, *et al.* Reversal of hyperglycaemia in diabetic rats by portal vein transplantation of isletlike cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol*, 2007;13:3342–9.

Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999; 48(12):2270-2276.

Yang L, Li S, Hatch H, *et al.* *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone producing cells. *PNAS*, 2002; 99:8078-83.

Ying Q, Nichols J, Evans EP e Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 2002; 416:545-548.

Zalzman M, Gupta S, Giri RK, *et al.* Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *PNAS*, 2003; 100:7253-8

Zalzman M, Anker-Kitai L, Efrat S: Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype. *Diabetes*, 2005; 54: 2568-2575.

Zecchin HG, Carnevali JBC, Saad MJA. Bases moleculares da resistência à insulina. In Godoy-Matos AF, editor. Síndrome Metabólica. São Paulo: *Atheneu*; 2005.p.19-46.

Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT, Yeh ET. Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes *in vivo*. *Circulation*, 2004; 110(25):3803-7.

Zhang YH, Wang HF, Liu W, *et al.* Insulin-Producing Cells Derived from Rat Bone Marrow and their autologous transplantation in the duodenal wall for treating diabetes. *The Anatomical Record*, 2009; 292:728–735.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, *et al.* The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the sidepopulation phenotype, *Nat. Med*, 2001; 7:1028–1034.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 2001; 414, 782-787.

Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ *et al.*: Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*, 2001; 50: 521-533.

ANEXO 1 – Artigo de revisão publicado na revista *Csientia Medica*: Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogénia auto-imune.

ARTIGO DE REVISÃO

Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogénia auto-imune

*Type 1 diabetes mellitus: multifactors that
confer susceptibility to the autoimmune
pathogenesis*

PATRICIA SESTERHEIM¹
DAVID SAITOVITCH²
HENRIQUE L. STAUB³

RESUMO

Objetivos: revisar dados de literatura concernentes aos fatores que conferem suscetibilidade à patogénia auto-imune do diabetes mellitus tipo 1.

Fonte de dados: revisão de artigos especializados no assunto publicados em bancos de dados nacionais e internacionais (SCIELO, LILACS e PUBMED).

Síntese de dados: a etiopatogénia do diabetes mellitus tipo 1 está associada a fatores inflamatórios, genéticos e ambientais. Nesta revisão, abordamos o papel da auto-imunidade humoral e celular que culmina com a disfunção das células-beta produtoras de insulina. A precocidade da presença de alguns auto-anticorpos como anti-ilhotas pancreáticas, anti-insulina e anti-ácido glutâmico descarboxilase é uma característica importante nesta patologia. Os diversos fatores genéticos associados ao deflagramento do diabetes mellitus tipo 1, sobretudo os associados ao sistema de antígenos leucocitários humanos, acabam por potencializar a apresentação de antígenos das ilhotas para o sistema imune. Por fim, fatores ambientais como exposição viral também contribuem

ABSTRACT

Aims: To review the literature data concerning the factors which confer susceptibility to the autoimmune pathogenesis of type 1 diabetes mellitus.

Source of data: Review of specific articles on the issue published in national and international databases (SCIELO, LILACS, PUBMED).

Summary of the findings: The etiopathogenesis of type 1 diabetes mellitus is associated to immunoinflammatory, genetic, and environmental factors. In this review, we approach the role of humoral (autoantibodies) and cellular autoimmunity which culminate with the dysfunction of insulin-producers beta-cells. The precocity of the presence of some autoantibodies such as anti-islet cell antibodies, anti-insulin and anti-GAD65 are important characteristics of this pathology. The diverse genetic factors related to development of type 1 diabetes mellitus, mostly those linked to the human leucocyte antigen system, surely increment the presentation of islet antigens to the immune system. Lastly, environmental factors, such as viral exposure, also contribute to the break of immunological tolerance observed in these patients.

¹ Bióloga. Mestre em Ciências Médicas-Nefrologia. Doutoranda em Medicina e Ciências da Saúde com ênfase em Nefrologia da PUCRS.

² Médico Nefrologista. Pós-Doutor e Mestre em Imunologia dos Transplantes. Professor Adjunto de Nefrologia e Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS. Professor da Disciplina de Imunologia dos Transplantes e Nefrologia V da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da PUCRS.

³ Médico Reumatologista. Doutor em Reumatologia e Mestre em Imunologia Clínica. Professor Adjunto de Reumatologia da Faculdade de Medicina PUCRS. Professor da Disciplina de Imunologia Básica e Pesquisa da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da PUCRS.

para a quebra de tolerância imunológica observada nesses pacientes.

Conclusões: o diabetes mellitus tipo 1 é uma entidade de etiopatogenia altamente complexa. Diversos fatores genéticos e ambientais potencializam os mecanismos de auto-imunidade humoral e celular que levam à insulite. O risco de hipoglicemia severa observada com o tratamento insulínico e as complicações crônicas do diabetes mellitus tipo 1 justificam pesquisas contínuas em relação à etiopatogenia desta entidade, o que contribuirá para abordagens terapêuticas mais eficazes.

DESCRIPTORIOS: DIABETES MELLITUS/imunologia; DIABETES MELLITUS/etiologia; DIABETES MELLITUS; FATORES DE RISCO.

Conclusions: Type 1 diabetes mellitus has a highly complex etiopathogenesis. A variety of genetic and environmental factors potentialize the mechanisms of humoral and cellular autoimmunity which generate insulitis. The risk of severe hypoglycemia usually seen with insulin therapy and the chronic complications related to type 1 diabetes mellitus justify continuous research on the etiopathogenesis of this entity, so providing new therapeutic strategies.

KEYWORDS: DIABETES MELLITUS/immunology; DIABETES MELLITUS/etiology; DIABETES MELLITUS; RISK FACTORS.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva de células-beta pancreáticas produtoras de insulina.¹ Compreende um grupo clínica e geneticamente heterogêneo de doenças que apresentam, como característica comum, níveis elevados de glicemia e distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas devido à produção ou ação deficiente da insulina no organismo. Paralelamente, caracteriza-se por alterações estruturais em diversos sistemas orgânicos, incluindo microangiopatia (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macroangiopatia (doença coronariana, insuficiência arterial periférica, entre outras).²

Considerada como uma das doenças crônicas mais comuns em crianças e adultos jovens, o DM1 pode se desenvolver em qualquer faixa etária, sendo mais freqüente antes dos 20 anos de idade. A instalação clínica é abrupta, acometendo cerca de 0,3% das populações caucasianas, com pico de início da doença entre os 11 e 12 anos de idade.³

Globalmente, de 10 a 20 milhões de pessoas estão afetadas pela doença na atualidade.⁴ Nos Estados Unidos, estima-se que 123.000 crianças e 1,4 milhões de adultos apresentem DM1. Anualmente, no mínimo 60.000 crianças são diagnosticadas em todo o mundo, incluindo 12.000 nos Estados Unidos⁵ e de 18 a 20/100.000 crianças no Reino Unido.⁶

O DM1 caracteriza-se por ser doença multifatorial, dependente da complexa interação

entre resposta imunológica, fatores genéticos predisponentes e influência do meio-ambiente na destruição das células-beta produtoras de insulina.^{3,6} O entendimento dos aspectos envolvidos no desenvolvimento desta patologia constitui a base para a detecção e prevenção do DM1.

AUTO-IMUNIDADE HUMORAL

Ao contrário do que se admitia previamente, a evolução da doença não é aguda, e sim um processo de auto-agressão lenta, que provavelmente se desenvolva durante anos, numa fase pré-clínica. No período de manifestação da doença, com a presença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já estão em número muito diminuído ou ausentes.⁷

A presença de infiltrado inflamatório do tipo linfomononuclear, configurando insulite, e a ausência de células beta, caracterizam o quadro histológico do DM1. As células secretoras de outros hormônios, como glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, também presentes nas ilhotas pancreáticas, são poupadas. Entretanto, o predomínio numérico das células que secretam insulina termina por gerar atrofia das ilhotas.⁷

A história natural do DM1 inclui quatro estágios distintos: (I) pré-clínico: auto-imunidade dirigida contra as células-beta, com diminuição aguda e progressiva da resposta insulínica à glicose intravenosa ou oral; (II) início do diabetes clínico; (III) remissão transitória; (IV) diabetes associado a complicações agudas, crônicas e óbito.⁸

O estágio pré-clínico é caracterizado pela presença de auto-anticorpos contra constituintes da célula-beta pancreática, que participam da sua autodestruição.⁸ A descrição dos auto-anticorpos anti-ilhotas pancreáticas reforçou o papel da auto-imunidade na fisiopatologia do DM1 (Tabela 1).⁸

TABELA 1 - Auto-anticorpos envolvidos no desenvolvimento do DM1.

Auto-anticorpos	Características
Anti-GAD	<ul style="list-style-type: none"> - apresenta alta prevalência no início do DM1 e tem sido detectado vários anos antes da instalação da doença; - anticorpo contra enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) identificada como sendo o auto-antígeno das células beta pancreáticas; - GAD é considerado um dos mais importantes antígenos envolvidos na patogênese do DM1; - método de detecção do anticorpo anti-GAD é imunoprecipitação (125I GAD65).
Anti-ilhotas - ICA	<ul style="list-style-type: none"> - marcador do DM1: dada a etiologia auto-imune da doença, a presença deste anticorpo é indicativa de atividade da doença; - positivo em 80% dos pacientes com tempo de DM1 inferior a 5 anos, porém a sua sensibilidade cai após 5 anos do diagnóstico; - detectado pela técnica de imunofluorescência indireta;
Anti-insulina - IAA	<ul style="list-style-type: none"> - anticorpo que pode ocorrer de forma espontânea ou após uso de insulina; - apresenta positividade próxima a 100% nos diabéticos com menos de 5 anos do diagnóstico, passando para 62% nos diabéticos com 5 a 15 anos de doença e 15% após 15 anos de diagnóstico; - o radioensaio é importante para o diagnóstico precoce de DM Tipo 1 (auto-anticorpos) e anti-insulina ELISA é um ensaio indireto destinado a dosagem quantitativa de anticorpos da classe IgG anti-insulina exógena (insulina aplicada pelo paciente).

Uma ampla variedade de marcadores, como os anticorpos anticélulas das ilhotas (I-CAs), anti-insulina (IAAs), anti-ácido glutâmico descarboxilase (GAD-65) e antitirosina fosfatases IA-2 e IA-2B, estão relacionados ao desenvolvimento do DM1.⁹ Geralmente, pelo menos um desses marcadores está presente em 85-90% dos indivíduos com hiperglicemia de jejum, observada no início da doença.¹⁰

Auto-anticorpos anti-insulina (*insulin auto-antibodies*-IAA) são detectados em cerca de 50% dos pacientes diabéticos recentemente diagnosticados, sendo mais comuns em crianças do que

entre jovens e adultos. O papel da insulina como auto-antígeno ainda não é conhecido, tampouco o local ou como a insulina é processada e apresentada ao sistema imune adaptativo.¹

O principal auto-antígeno envolvido na patogênese do DM1 é o ácido glutâmico descarboxilase (GAD), uma enzima que cataliza a formação do ácido gama-amino-butírico (GABA), neuroinibidor do sistema nervoso central, a partir do L-glutamato.^{11,12} Duas formas são reconhecidas expressas nos tecidos humanos: GAD65 e GAD67. Anticorpos anti-GAD65 são detectados em cerca de 50 a 80% dos pacientes diabéticos em fase inicial.¹¹

Já os anticorpos anticélulas das ilhotas reconhecem receptores de membrana do tipo proteína tirosina fosfatase (PTP - *protein tyrosine phosphatases*), ou seja, o antígeno de células de ilhotas (ICA512 - *islet cell antigen 512*) ou antígeno da ilhota 2 (IA-2 - *islet antigen 2*). Geralmente, este grupo de auto-anticorpos é detectado após o aparecimento do anticorpo anti-GAD65, e praticamente confirma o diagnóstico da doença, ocorrendo em cerca de 50 a 70% dos pacientes diabéticos. O auto-antígeno IA-2 beta (*islet antigen 2 beta*) ou IAR (*islet anti-gen receptor*), receptor de membrana das células-beta pancreáticas, pode ser reconhecido por auto-anticorpos anti-ilhotas e detectado em cerca de 50% dos pacientes.¹³⁻¹⁴

Embora o efeito patogênico destes auto-anticorpos não esteja bem caracterizado, sua detecção possibilita rastrear indivíduos com risco elevado para o desenvolvimento da doença.⁸

IMUNIDADE CELULAR

Doenças auto-imunes como o DM1 envolvem a interação de diferentes subpopulações de linfócitos e células apresentadoras de antígenos. Entre estas populações celulares, estão incluídos os linfócitos CD4+ e CD8+, células B, células matadoras naturais (NK - *natural killer*), macrófagos e células dendríticas, que desempenham importante papel na geração da resposta auto-imune.¹⁵

Em modelos animais, os camundongos NOD (*non-obese diabetes*) são os mais utilizados para o estudo da doença espontânea em todo o mundo. Nesses animais, a destruição das células produtoras de insulina mimetiza aquela observada em humanos.¹⁶⁻¹⁸ Assim, análises imunohistoquímicas de tecido pancreático revelam que os primeiros tipos celulares a infiltrarem as ilhotas

de Langerhans são as células dendríticas e os macrófagos, promovendo a insulite.^{19,20}

A apresentação de auto-antígenos específicos das células beta pancreáticas pelos macrófagos e/ou células dendríticas para os linfócitos T CD4+, constitui-se como o primeiro evento no processo de auto-imunidade visto no DM1.²⁰

Ativados, os macrófagos secretam citocinas que induzem a migração celular e estimulam vários tipos celulares a secretarem radicais livres extremamente tóxicos às células beta-pancreáticas. Durante o processo de insulite, que parece ocorrer com maior intensidade em ilhotas onde existam células beta metabolicamente ativas, os linfócitos TCD8+ são as células predominantes. Tais linfócitos, após reconhecimento dos auto-antígenos pancreáticos, efetuam a destruição das células-beta por citólise através da liberação de perforinas e granzimas, e também por indução de apoptose. Dessa maneira, macrófagos, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ atuam sinergicamente na destruição das células-beta pancreáticas.^{12,21}

Na migração das células inflamatórias, o que caracteriza a insulite, ocorre a importante participação de moléculas de adesão como as integrinas LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) presentes na superfície dos linfócitos, as ICAMs (*intercellular adhesion molecule*), a integrina $\alpha 4\beta 7$ encontrada na superfície de linfócitos, e a MadCAM-1 (*mucosal addressin*) expressa na superfície endotelial.²²

O linfócito TCD4+ ativado secreta várias citocinas, cuja principal ação é promover a proliferação e a diferenciação de linfócitos T e de outras células, incluindo linfócitos B e macrófagos. A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-1 beta (IL-1 β) por células apresentadoras de antígeno e células T, favorece a iniciação e a perpetuação da resposta inflamatória e auto-imune no DM1.²³

Os linfócitos B também participam da patogenia do DM1, seja apresentando auto-antígenos, preferencialmente a ácido glutâmico descarboxilase ou, ainda, como plasmócitos secretores de auto-anticorpos.¹³ Ao longo do tempo, as células-beta vão diminuindo em número, assim como a intensidade do processo inflamatório.²⁴

SUSCETIBILIDADE GENÉTICA

A suscetibilidade ao DM 1 é herdada. Um risco aumentado é observado em parentes em

primeiro grau de uma pessoa afetada pela doença. Porém, 85% de casos novos não contemplam tal linhagem familiar.²⁵

O polimorfismo de cinco genes é conhecido por influenciar o risco do DM 1: HLA-DQ α , HLA-DQ β , HLA-DR, pré pró-insulina e o gene PTPN22. Entre esses, os principais marcadores genéticos envolvidos na apresentação de antígenos das ilhotas e no controle da resposta imune ao DM1 são os loci HLA-DQ/DR.¹⁵

A susceptibilidade ao desenvolvimento do DM1 está mais relacionada a determinados haplótipos HLA de classe II específicos do que a alelos isolados. Em caucasianos, o maior risco de desenvolver a doença está relacionado ao genótipo HLA-DR3-DQA1*0501-DQB1*0201/DR4-DQA1*0301-DQB1*0302. A associação negativa mais forte está relacionada ao genótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602.²⁶

Mais de 90% dos pacientes com DM1 portam ou HLA-DR3, DQB1*0201 ou DR4, DQB1*0302, comparativamente a 40% de controles com um ou outro haplótipo. Além disso, aproximadamente 30% dos diabéticos cursam com ambos os haplótipos, o que gera maior suscetibilidade à doença. A prevalência desse genótipo de alto risco é muito elevada em algumas populações. Aproximadamente 5% das crianças com o genótipo DR4, DQB1*0302/DR3, DQB1*0201 desenvolvem DM1, contra aproximadamente 0,3% do total das crianças.¹⁵ Estudos sugerem que um subconjunto dos alelos DR4, tais como DRB1*0403, diminui o risco de desenvolvimento de DM1. O alelo DQB1*0602 do HLA confere proteção ao desenvolvimento do DM1.²⁷

Genes não-HLA também podem estar associados ao deflagramento do DM1. Exemplos incluem o polimorfismo do gene da insulina situado no cromossomo 11²⁸ e, mais recentemente, os genes para o TAP (transportador envolvido na apresentação de antígenos).²⁹ Algumas dezenas de loci genéticos associados ao desenvolvimento do DM1 estão em processo de estudo. O projeto de mapeamento do genoma humano deve auxiliar em tais investigações. Evidências adicionais do papel de genes não-MHC no deflagramento do DM1 advêm dos estudos em camundongos da linhagem NOD.

FATORES AMBIENTAIS

Os determinantes ambientais mais estudados no DM1 podem ser classificados em 3 grupos: infecções virais (citomegalovírus, rubéola, caxumba, sarampo), dieta precoce na infância

(amamentação versus introdução precoce de ingredientes do leite de vaca, cereais e glúten) e toxinas (por exemplo, derivados de N-nitroso). Outros fatores não-genéticos modificadores da doença incluem administração de vacinas, estresse emocional, influências climáticas, sazonalidade, agentes sanitários e acesso aos cuidados de saúde.^{5,6,30}

De acordo com Atkinson e Eisenbarth³⁰ os agentes ambientais agem como modificadores da patogênese da doença, podendo servir como "gatilhos".

A liberação local de citocinas pró-inflamatórias decorrentes de infecção viral constitui fator central na perda da tolerância aos auto-antígenos e na ativação de linfócitos autorreativos. A associação entre os processos de inflamação e auto-imunidade tem sido extensamente ligada à ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas no local da lesão. Além disso, tais citocinas são capazes de recrutar e ativar células apresentadoras de antígenos e linfócitos T autorreativos, o que perpetua o processo de auto-imunidade nas ilhotas.¹⁴

O evento imunológico inicial no desenvolvimento da doença, decorrente da infecção viral, parece ser a produção de IFN- γ pelas células beta produtoras de insulina. A secreção da citocina está associada à hiperexpressão das moléculas HLA de classe I e de classe II na superfície de células beta. A partir desses eventos, a apresentação de auto-antígenos pelas células beta-pancreáticas aos linfócitos T autorreativos pode ocorrer, dando início à cascata de processos inflamatórios, culminando na insulite.¹⁴

CONCLUSÕES

O DM1 é uma doença auto-imune órgão-específica de alta complexidade patogênica. Nesta revisão, priorizamos a abordagem dos fatores intrínsecos que induzem à agressão humoral (auto-anticorpos diversos) e celulares às células-beta da ilhota pancreática. O crucial papel das células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e linfócitos B na imunopatogênese desta entidade foi detalhado.

Embora as estratégias de tratamento que corrigem a insulino-dependência (transplante de pâncreas, transplante de ilhotas pancreáticas e, mais recentemente, terapia celular, principalmente células-tronco) estejam sendo exaustivamente estudadas, o risco de hipoglicemias severas e a ocorrência de complicações crônicas

justificam a necessidade de pesquisas contínuas na compreensão etiopatogênica do DM1. O entendimento progressivamente mais detalhado da patogenia da doença culminará com estratégias terapêuticas cada vez mais efetivas.

REFERÊNCIAS

1. Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002;31:391-410.
2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. *Lancet.* 1998;352:854-65.
3. Milech A, Oliveira JEP. Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar. São Paulo: Atheneu; 2004.
4. Libman I, Songer T, LaPorte R. How many people in the U.S. have IDDM? *Diabetes Care.* 1993;16:841-2.
5. Rewers M, Klingensmith GJ. Prevention of type 1 diabetes. *Diabetes Spectr.* 1997;10:282-92.
6. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ.* 2004;328:750-4.
7. Balda CA, Pacheco-Silva A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. *Rev Assoc Med Bras.* 1999;45:175-80.
8. Cesarini PR, Mendonça E, Fernandes V, et al. Prevalência dos marcadores imunológicos anti-GAD e anti-IA2 em parentes de primeiro grau de diabéticos do tipo 1 em amostra da população da grande São Paulo. *Rev Assoc Méd Bras.* 2003;49:395-400.
9. Koczwara K, Schenker M, Schmid S, et al. Characterization of antibody responses to endogenous and exogenous antigen in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol.* 2003;106:155-62.
10. The 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.* 2003;26(Suppl 1):S5-20.
11. Woo W, LaGasse JM, Zhou Z, et al. A novel high-throughput method for accurate, rapid, and economical measurement of multiple type 1 diabetes autoantibodies. *J Immunol Methods.* 2000;244:91-103.
12. Fernandes APM, Pace AE, Zanetti ML, et al. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2005;13:743-9.
13. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3696-902.
14. Obayashi H, Hasegawa G, Fukui M, et al. Tumor necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1*1502-DQB1*0601 allele and anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3348-51.
15. Eisenbarth GS, McCulloch DK. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus [citado 2006 nov 2];[2p.]. Disponível em: <http://patients.uptodate.com/topic.asp?file=diabetes/5832#references>.
16. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity.* 1997;7:727-38.

17. Rosmalen JGM, Leenen FJM, Pelegri C, et al. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:209-14.
18. Eisenbarth GS. Animal models of type 1 diabetes: genetics and immunological function. In: *Type 1 diabetes: molecular, cellular, and clinical immunology* [Internet] [chap. 3; 28p.] [citado 2005 ago 2]. Disponível em: <http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/owch3.html>.
19. Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S, et al. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science.* 2003;302:1223-7.
20. Salminen KK, Vuorinen T, Oikarinen S, et al. Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2004;21:156-64.
21. Kulmala P, Savola K, Reijonen H, et al. Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. *Childhood Diabetes in Finland Study Group. Diabetes.* 2000;49:48-58.
22. Yang XD, Michie AS, Mebius RE, et al. The role of cell adhesion molecules in the development of IDDM. Implications for pathogenesis and therapy. *Diabetes.* 1996;45:705-10.
23. Matarese G, Sanna V, Lechler RI, et al. Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice. *Diabetes.* 2002;51:1356-61.
24. Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, et al. The histopathology of pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia.* 1986;29: 267-74.
25. Kulmala P. Prediabetes in children: natural history, diagnosis and preventive strategies. *Pediatr Drugs.* 2003;5:211-21.
26. Thorsby E, Ronningen KS. Particular HLA DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1993; 36:371-6.
27. Lohmann S, Laue U, Nietzschmann TM, et al. Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes.* 51:2474-80.
28. Julier C, Hyer RN, Davies J, et al. Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4 dependent diabetes susceptibility. *Nature.* 1991; 354:155-9.
29. Faustman D, Li XP, Lin HY, et al. Linkage of faulty major histocompatibility complex class I to autoimmune diabetes. *Science.* 1991;254:1756-61.
30. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2001;358:221-9.

Endereço para correspondência:

PATRICIA SESTERHEIM
 Laboratório de Nefrologia do Instituto de
 Pesquisas Biomédicas do HSL-PUCRS
 Av. Ipiranga, 6698, 7º andar
 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil
 Fone: (51) 3320-3500 f. 3340
 E-mail: paty.bio@terra.com.br

ANEXO 2 – Artigo submetido no dia 27 de maio de 2010 ao jornal *Biochemical and Biophysical Research Communication*.

From: "BBRC (ELS)" bbrc@elsevier.com

Date: May 27, 2010 2:58:41 PM GMT-03:00

To: nardi@ufrgs.br

Subject: Biochemical and Biophysical Research Communications: Submission Confirmation

Title: Differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, kidney and pancreas into insulin-producing cells and reversal of diabetes in a murine model

Corresponding Author: Dr Nance Beyer Nardi

Authors: Patrícia Sesterheim, MSc; Pedro C Chagastelles, MSc; Florencia M Barbé-Tuana, PhD; Tiago P Dalberto, MSc; Bruna P Madrugada, Bel; Marinalda Predebon, Bel; Ivan F Antonello, PhD; David Saitovitch, PhD;

Dear Dr Nardi,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Biochemical and Biophysical Research Communications.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Biochemical and Biophysical Research Communications as an author:

<http://ees.elsevier.com/bbrc/>

Your username is: NanceNardi

If you need to retrieve password details, please go to:
[http://ees.elsevier.com/\[YBBRC\]/automail_query.asp](http://ees.elsevier.com/[YBBRC]/automail_query.asp)

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Biochemical and Biophysical Research Communications. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,
Charlotte Dudley
BBRC Journal Manager
Elsevier
525 B Street, Suite 1800
San Diego
CA 92101-4495
USA
Tel: (619) 699 6857

Our new self-help site at <http://epsupport.elsevier.com/> describes a range of EES topics, answers frequently asked questions, and provides interactive EES tutorials for authors, editors and reviewers.

Elsevier Editorial System(tm) for Biochemical and Biophysical Research Communications

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, kidney and pancreas into

insulin-producing cells and reversal of diabetes in a murine model

Article Type: Regular Article

Keywords: Mesenchymal stem cell; diabetes; cell differentiation; cell therapy; insulin-producing cell.

Corresponding Author: Dr Nance Beyer Nardi, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Patrícia Sesterheim, MSc

Order of Authors: Patrícia Sesterheim, MSc; Pedro C Chagastelles, MSc; Florencia M Barbé-Tuana, PhD; Tiago P Dalberto, MSc; Bruna P Madrugada, Bel; Marinalda Predebon, Bel; Ivan F Antonello, PhD; David Saitovitch, PhD; Nance Beyer Nardi, PhD



Dr Nance Beyer Nardi
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
C. P. 15053, 91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil Fax: 55 51 33087311 Phone:
55 51 33086740 E-mail:nardi@ufrgs.br

27 May 2010

To The Editorial Board Biochemical and Biophysical Research Communications

Dear Sir

I am very happy to submit the manuscript "Differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, kidney and pancreas into insulin-producing cells and reversal of diabetes in a murine model", by Sesterheim et al., to your attention for publication in Biochemical and Biophysical Research Communications. In this work, we have used our large experience in mesenchymal stem cells to explore their possible therapeutic use for type 1 diabetes. Our results show that BALB/c mesenchymal stem cells derived from the pancreas, bone marrow and kidney differentiate into insulin-producing islet-like clusters. This is, to our knowledge, the first time that this potential is shown for kidney-derived mesenchymal stem cells. Furthermore, pancreas-derived insulin-producing cells were able to revert streptozotocin-induced diabetes in BALB/c mice.

We believe that the use of the immunoprivileged mesenchymal stem cell for treating diabetes opens important possibilities such as the production of an "off-the-shelf" therapeutic product. This alternative should be available for clinical studies in the near future.

This work is unpublished, and there is no significant overlap between the submitted manuscript and any other paper under consideration or in press elsewhere. We have no conflicts of interest related to this study. The protocols were in compliance with the institution's guidelines, after approval by the Research Ethics Committee.

In thanking you for your attention, I look forward to hearing from you.

Yours sincerely,

Nance Beyer Nardi

Differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, kidney and pancreas into insulin-producing cells and reversal of diabetes in a murine model

Patrícia Sesterheima, Pedro Cesar Chagastellesb, Florencia M. Barbé-Tuanaa,

Tiago Pires Dalbertob, Bruna Pinho Madrugaada, Marinalda Predebona, Ivan

Carlos Ferreira Antonelloc, David Saitovitcha, Nance Beyer Nardib,d,*

a Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Nefrologia), Laboratório de

Transplante, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av Ipiranga

6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

b Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av

Bento Goncalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

c Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Nefrologia), Laboratório de

Nefrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av Ipiranga

6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

d Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul. Av Princesa Isabel 370, 90620-

000, Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author at: Departamento de Genética, Universidade Federal do

Rio Grande do Sul. Av Bento Goncalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS,

Brazil. Telephone: +55 51 33086740. Fax: +55 51 33087311.

E-mail address: nardi@ufrgs.br (N.B. Nardi)

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

Abstract

The generation of insulin-producing cells (IPC) from embryonic or adult stem cells has been seen as a promising alternative for the treatment of type I

diabetes. Low efficiency and lack of response to extracellular levels of glucose, however, point to the need for further studies in this field. Mesenchymal stem cells (MSC), currently considered the most promising type of adult stem cells, may be obtained from virtually any tissue or organ. The present study aimed at investigating the potential of MSC derived from BALB/c bone marrow, kidney and pancreas to differentiate into IPC. We present evidence that MSC derived from these three tissues are capable of differentiation into IPC when cultured under specific inducing conditions. Differentiated cells form islet like clusters that express insulin at the molecular and protein level. Insulin-producing cells originated from pancreas-derived MSC are able to reverse streptozotocin-induced diabetes when implanted under the kidney capsule of BALB/c mice. The immunoregulatory properties of MSC raise the possibility of developing an "off-the-shelf" therapeutic product for treating type 1 diabetes in the near future.

Keywords:

Mesenchymal stem cell. Diabetes. Cell differentiation. Cell therapy. Insulin-producing cell.

Abbreviations: bmMSC, bone marrow-derived mesenchymal stem cell ; CM, culture medium; IPC, insulin-producing cell; kIPC, kidney-derived insulin-producing cell; kMSC, kidney-derived mesenchymal stem cell; MSC, mesenchymal stem cell; pIPC, pancreas-derived insulin-producing cell; pMSC, pancreas-derived mesenchymal stem cell.

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus type 1 (T1DM) is an autoimmune syndrome

characterized by the selective destruction of insulin-producing beta-cells in pancreatic islets. Therapeutic alternatives for T1DM, aiming at the preservation and/or regeneration of the mass of beta-cells, and therefore the reconstitution of the physiological level of insulin secretion, have been intensively studied.

Although the therapeutic potential of bone marrow transplantation is under investigation [1], the establishment of insulin-releasing cell lines from mature cell types [2] and the regenerative capacity of beta-cells [4-5] have been extensively explored.

The generation of insulin-producing cells (IPC) from embryonic and adult stem cells has been the focus of intensive study during the last decade. Signals regulating the in vitro differentiation of embryonic [6] and induced pluripotent stem (iPS) cells [7] into IPC are well documented. Beta cells have also been produced from a number of adult stem cells, including liver-, gut- and adiposederived stem cells [8]. The low efficiency of these processes and the generation of cells without full responsiveness to extracellular levels of glucose, however, point to the need for new studies to identify the source of regenerative cells.

Mesenchymal stem cells (MSC) [9], currently considered the adult stem cells with greatest therapeutic potential for non-hematologic diseases [10], have also been investigated for the potential for in vitro differentiation into beta cells [11].

Different inducers have been used, including high glucose or nicotinamide concentrations in the culture medium [12,13], and addition of activin-A, betacellulin, and fibroblast (FGF), epidermal (EGF) or hepatocyte (HGF) growth factor [14-16]. The transduction of transcription factors involved in the development of

the pancreatic cells, such as PDX-1 and MafA, has also been used for the transdifferentiation of stem cells in IPC [15,17,18].

MSC may be obtained from other tissues, besides bone marrow, and recently we showed that they are distributed throughout the organism [19,20]. MSC cultures derived from different tissues show similar patterns of morphology, culture kinetics, immunophenotype or plasticity, but have also some tissue-specific differences. In this context, pancreas-derived MSC may be expected to be already partially programmed to differentiate into an endocrine phenotype, having thus a greater potential to differentiate into IPC. The present study aims at comparing mesenchymal stem cells derived from the bone marrow, kidney and pancreas for their capacity to originate functional insulin producing cells and to revert diabetes in a murine model.

2. Materials and methods

2.1. Animals

BALB/c mice were housed at the PUCRS animal facility. Food and water were supplied ad libitum. Guidelines of the Ethics Committee on the Use of Animals (Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil) were strictly observed.

2.2. Isolation and expansion of mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells cultures were established from 4–6 week old BALB/c bone marrow (BM), kidneys and pancreas, according to previously described methodology [19]. Culture medium (CM) was composed of Dulbecco's Modified Eagle Medium/low glucose (DMEM, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) with 3.7 g/l

sodium bicarbonate (this and all other reagents were from Sigma, St Louis, MO, unless otherwise indicated), 2.5 g/l HEPES, 10% fetal bovine serum (Cultilab, SP, Brazil) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). Primary cultures were established by plating the cells into 6-well culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland), with incubation at 37°C in with 5% CO₂, for 72 hours. Nonadherent cells were then removed by replacing the medium, and the adherent layer was refed every 3 or 4 days. For subculturing, cells were incubated with 0.25% trypsin and 0.01% EDTA and replated. Split ratios were initially 1:2 or 1:3, and as the culture kinetics accelerated the ratios were set to values ranging from 1:6 to 1:15.

2.3. Characterization of murine mesenchymal stem cells

For qualitative morphological analysis, MSC cultures were routinely observed by phase microscopy with an inverted microscope (Axiovert 25; Zeiss, Hallbergmoos, Germany) and photographed using a digital camera (AxioCam MRc, Zeiss). The growth kinetics of MSC cultures were analyzed by quantification of viable MSC, stained with trypan blue and counted in a Neubauer chamber.

2.4. Flow cytometry

For detection of surface antigens, the cells were trypsinized, centrifuged, and incubated for 30 minutes at 4°C with phycoerythrin (PE)- or fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibodies against murine Sca-1, CD11b, CD13, CD29, CD31, CD44, CD45, CD49e, and CD90.2 (Pharmingen BD, San Diego, CA). The cells were analyzed using a FACScalibur cytometer equipped

with 488 nm argon laser (Becton Dickinson, San Diego, CA) with the CellQuest software. At least 10,000 events were collected per sample.

2.5. In vitro adipogenic and osteogenic differentiation of MSC

The capacity of 4th-passage MSC cultures derived from the BM, pancreas and kidney to differentiate into the adipogenic and osteogenic lineages was investigated as previously described [19]. To induce adipogenic differentiation, the cells were cultivated for 4 weeks on CM supplemented with 10^{-8} M dexamethazone, 2.5 μ g/ml bovine pancreas insulin, 100 mM indomethacin and 3.5 μ M rosiglitazone. Adipocytes were revealed by staining with Oil Red O solution. Osteogenic differentiation was induced by culturing MSC for 4 weeks in CM supplemented with 10^{-5} M dexamethasone, 5 μ g/ml ascorbic acid 2-phosphate and 10 mM β -glycerophosphate. Osteoblasts were revealed by staining the calcium deposition with Alizarin Red S stain at pH 4.2.

2.6. Differentiation of mesenchymal stem cells into insulin producing cells (IPC)

MSC cultures at the 4th-5th passage were maintained for 3 days in DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco) without serum, supplemented with 1% penicillin/streptomycin, 10 nM nicotinamide, 10 ng/ml activin-A, 50 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) and 10 nM exendin-4. Control MSC cultures were maintained in CM without any inducer. The production of insulin by differentiated cells was analyzed by dithizone staining (DTZ), RT-PCR and western blotting.

2.7 - RT-PCR

Total RNA was extracted from differentiated and non-differentiated cells, or from

pancreatic tissue for positive control, with 1 ml Trizol-LS (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. RNA samples were resuspended in 10 µl Milli-Q RNase-free water with 40 U/µl RNase Out ribonuclease inhibitor (Invitrogen).

Reverse transcription (RT) was performed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen). Polymerase chain reaction (PCR) was performed with Gapdh and insulin 1 specific primers (access to gene bank NM_008386.3). The sense insulin primer was 5'-GGCATCCAGTAACCCCCAGCC-3 and the antisense primer was 5'-GACGAACGGGAGACCCTCGG-3. For the Gapdh gene, sense and antisense primers were 5'-AAAATGGTGAAGGTCGGTGT-3 and 5'-GTTAGTGGGGTCTCGCTCCT-3', respectively. PCR reactions contained 1.5 to 2.0 µl cDNA in a final 25 µl volume, with 0.5 µl Taq polymerase (5 U/µL 4G, Uniscience, SP, Brazil). Amplification was carried out in a Perkin-Elmer thermocycler using 5 min at 94°C, 35 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 45 sec, and 72°C also for 45 sec, followed by a 5-min incubation at 72°C. PCR products were electrophoresed on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide (Invitrogen), originating insulin 1 and Gapdh bands of 248 bp and 244 bp, respectively. The optical density of the bands was quantified with the ImageJ software version 1.4 and normalized with Gapdh expression.

2.8 - Western blotting

For immunoblot analysis, differentiated and non-differentiated cells were lysed in Tris-HCl buffer (pH 6.8) with 2% SDS, 10% glycerol and 2-β-mercaptoethanol. Equal amounts of protein were separated on 12% SDS-PAGE, transferred to

nitrocellulose membranes (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, NJ) and probed overnight with polyclonal rabbit antibody against human insulin (1:300, clone H-86, Santa Cruz Biotechnology, CA), incubated with HRPconjugated anti-rabbit Ig antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and detected by chemiluminescence (Cell Signaling Technology) on X-ray film.

Protein samples extracted from BALB/c pancreas were used as positive controls.

2.9. Induction of experimental diabetes by streptozotocin and cell treatment

BALB/c mice aged 8 to 12 weeks were treated with a single intraperitoneal injection of 200 mg/kg of streptozotocin freshly dissolved in 1 M citrate buffer, pH

4.5. Blood glucose levels were determined weekly using Roche Accu-Chek

Advantage II glucose meter. Body weight was also determined every week.

Animals presenting blood glucose levels above 350 mg/dl were considered diabetic and used for cell transplantation.

Thirty days after the induction of diabetes, the mice were treated with 10⁶ differentiated IPC or undifferentiated MSC. The cells were implanted under the kidney capsule and the animals were analyzed for blood glucose levels and body weight on days 10 and 20 after transplantation. The experimental groups (n=4) consisted of mice treated with pancreas-derived IPC (pIPC), kidney-derived IPC (kIPC), pancreas-derived MSC (pMSC), or control mice treated with culture medium only (Ct). The diabetes was considered reversed when the animals presented blood glucose levels below 250 mg/dl for at least two consecutive readings.

2.10. Statistical analysis

Results are shown as means+SEM. The significance of difference was evaluated by the paired Student's t-test. When more than one group was compared with a control, the significance was estimated by one-way analysis of variance (ANOVA). $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Establishment and characterization of murine MSC

MSC cultures were successfully established from BALB/c kidneys (kMSC), pancreas (pMSC) and bone marrow (bmMSC). The adherent cells were fusiform and elongated, with central nuclei and cytoplasmic prolongations. BM, kidney and pancreas-derived MSC were negative for the hematopoietic markers CD11b and CD45, and positive for CD44 and CD49e (data not shown). pMSC and kMSC were tested for CD13 and Sca-1 surface markers, with negative results except for the expression of Sca-1 on pMSC. Only bmMSC were analyzed for expression of CD29, with positive results. Variable expression of CD90.2 was seen in all MSC types (not shown).

MSC derived from the three tissues showed similar adipogenic and osteogenic capacity (Fig. 1A-I). Analysis of the growth kinetics of cultures originated from the different tissues showed high replication rates (Fig. 1J). BM cultures, however, showed a latency phase and an overall lower growth potential when compared to kMSC and pMSC.

3.2. In vitro differentiation of MSC into insulin-producing cells

Kidney MSC induced with CM supplemented with nicotinamide, activin-A, HGF and exendin-4 originated clusters of oval IPC positively stained for DTZ (Fig.

2A,B). This treatment induced only a small number of DTZ-positive cells in bmMSC (Fig. 2C,D), and had no effect on pMSC (Fig. 2E,F). Removal of activinA from the inducing medium, however, resulted in the production of DTZ-positive IPC in pMSC (Fig. 2G,H), but not in kidney or bone marrow-derived MSC (not shown). Activin-A was therefore included in the inducing medium for differentiation of kidney and bone marrow cells only.

Insulin gene expression in MSC submitted to differentiation into IPC for 3 days was analyzed by RT-PCR. The insulin 1 gene was highly expressed in pancreatic-derived insulin-producing cells (pIPC) (Fig. 3A,B). Kidney and bone marrow IPC presented a mild but detectable expression of the insulin 1 gene. Expression results were relative to Gapdh.

In agreement with RNA expression, at the protein level, insulin production was detected by western blotting. Cultures of pIPC had particularly strong insulin expression, as evidenced in Fig. 3C.

3.3. In vivo activity of insulin-producing cells

Insulin-producing cells differentiated from pancreas or kidney-derived MSC were investigated for their potential to revert STZ-induced diabetes in BALB/c mice.

Thirty days after STZ treatment, 106 IPC or MSC were implanted under the kidney capsule. Blood glucose levels and body weight were determined on days 10 and 20 after cell transplantation. The results showed no spontaneous reversion of diabetes in untreated (control) animals or in mice treated with nondifferentiated pancreas-derived MSC or with kidney-derived IPC (Fig. 4). Only mice treated with pancreas-derived IPC presented a significant reversal in

hyperglycemia, on day 20 after cell transplantation (Fig. 4A,C).

4. Discussion

In the present study, we characterized MSC cultures derived from the BM, kidney and pancreas of adult BALB/c mice for their proliferative potential, immunophenotypic profile and the capacity for in vitro differentiation into osteoblasts and adipocytes, according to the criteria of the International Society for Cellular Therapy [21]. A lower rate of cell proliferation of bone marrow-derived MSC cultures has already been reported [19], and may be associated to increased heterogeneity of this population [22]. On the other hand, the existence of a perivascular niche for MSC [20] may explain the high potential for the establishment of these cultures from the kidney, a highly vascularized organ. Despite some variation, the immunophenotypic profile of cultures derived from the three tissues was consistent with the standard pattern described for MSC [10]. Cultures were also similar in their potential to differentiate into the osteogenic and adipogenic pathways.

Pancreas, kidney and BM-derived MSC were also evaluated for their capacity to differentiate into insulin-producing cells. The potential to originate IPC has been described for MSC derived from extra-pancreatic tissues such as the liver [23], central nervous system [24], spleen [25], skin [26], bone marrow [27,28] and adipose tissue [29]. However, to our knowledge the capacity of kidney-derived MSC to originate IPC has not yet been investigated. Our results showed that a modification of the protocol proposed by Timper and collaborators [29] was able to induce bone marrow, kidney and pancreas-derived MSC to differentiate into

cells with an endocrinal pancreatic phenotype and expressing insulin in vitro.

The mechanisms responsible for the differentiation of adult stem cells into insulin-producing cells are still poorly understood, but several inducers are important in this process. Exendin-4, a synthetic peptide, is 53% homologous to the glucagon like-peptide-1 hormone [30], which explains its ability to induce the differentiation, proliferation and neogenesis of pancreatic islets [31]. Nicotinamide is an inhibitor of poly(ADP-ribose) synthesis and stimulates the differentiation of pancreas progenitor cells into IPC [12]. Finally, activin A has been shown to induce the differentiation process into the pancreatic lineage, with an efficiency dependent on concentration, culture conditions and time of application [32]. The use of these powerful factors in the MSC cultures resulted not only in the induction of cellular aggregates resembling the architecture of pancreatic islets, but also in the activation of the insulin 1 gene. Contrary to other studies [33,34], we observed that activin A, considered as the key inducer of this process, inhibits the differentiation of pMSC into IPC. This result was repeatedly observed at the cellular, genetic and protein level, and further experiments are necessary to determine the pathways involved in the process.

Insulin-producing cells originated from pancreas-derived MSC were able to reverse STZ-induced hyperglycemia, when implanted under the kidney capsule of diabetic mice. IPC originated from kidney-derived MSC, although expressing the insulin 1 gene (as shown by RT-PCR) and secreting insulin (as shown by western blotting), were not able to reverse diabetes in vivo. Whereas this difference is possibly related to the lower expression of the insulin 1 gene in

kIPC, it is also possible that other tissue-specific characteristics, involving for instance a partially defined genetic preprogramming towards the endocrine phenotype, are responsible for the phenomenon. As already suggested, MSC derived from different tissues share general patterns of proliferation capacity, immunophenotype and plasticity, but may exhibit some other tissue-specific biological characteristics [20]. Interestingly, Neshati and collaborators [35] have recently reported that rat bone marrow MSC treated with high glucose concentration, nicotinamide and beta-mercaptoethanol differentiate into IPC and can reverse hyperglycemia in rat model of diabetes.

Efforts have been made to understand the etiologic mechanisms of T1DM and to find new therapeutic alternatives for the disease. Obtaining a cellular product that can effectively mimic the endocrine characteristics of the pancreatic beta cells remains a major challenge. The immunoregulatory activity of MSC and cells differentiated from them may avoid the need for tissue matching between MSC donor and recipient [36], MSC may be the first cell type able to be used as an "off-the-shelf" therapeutic product [37], as recently shown for the treatment of severe graft-versus-host disease [38].

Funding

This research was supported by grants from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico (CNPq).

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

The authors thank Dr Melissa Markoski, from the Molecular and Cellular Cardiology Laboratory of Instituto de Cardiologia/RS, for laboratory support, Gabriela Miró Filipetti from Universidade Luterana do Brasil for assistance with photographic work, and Silvana Lunardini Alves from IPB/PUCRS for technical support.

References

- [1] J.C. Voltarelli, C.E. Couri, A.B. Stracieri, et al., Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 297 (2007) 1568-1576.
- [2] L.Labriola, M.G. Peters, K. Krogh K, et al., Generation and characterization of human insulin-releasing cell lines, *BMC Cell. Biol.* 10 (2009) 1-16.
- [3] T. Nir, D.A. Melton, Y. Dor, Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2553-2561.
- [4] M. Teta, M.M. Rankin, S.Y. Long, et al., Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors, *Dev. Cell.* 12 (2007) 817-826.
- [5] D. Kopinke & L.C. Murtaugh, Exocrine-to-endocrine differentiation is detectable only prior to birth in the uninjured mouse pancreas, *Dev. Biol.* 10 (2010) 1-16.
- [6] S. Champeris Tsaniras, P.M. Jones, Generating pancreatic {beta}-cells from embryonic stem cells by manipulating signaling pathways, *J. Endocrinol.* (2010) 1-55.

- [7] H. Noguchi, Production of pancreatic beta-cells from stem cells, *Curr. Diabetes Rev.* 6 (2010) 184-190.
- [8] C. Aguayo-Mazzucato, S. Bonner-Weir, Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus, *Nat. Rev. Endocrinol.* 6 (2010) 139-148.
- [9] A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhyan, N.V. Latsinik, et al., Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues, Cloning in vitro and retransplantation in vivo, *Transplantation* 17 (1974) 331-340.
- [10] L. da Silva Meirelles, N.B. Nardi, Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells, *Front. Biosci.* 14 (2009) 4281-4298.
- [11] L. Vija, D. Farge, J.F. Gautier, et al., Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes, *Diabetes Metab.* 35 (2009) 85-93.
- [12] D.Q. Tang, L.Z. Cao, B.R. Burkhardt, et al., In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow, *Diabetes* 53 (2004) 1721-1732.
- [13] X.H. Wu, C.P. Liu, K.F. Xu, et al., Reversal of hyperglycaemia in diabetic rats by portal vein transplantation of isletlike cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells, *World J. Gastroenterol.* 13 (2007) 3342-3349.
- [14] Y. Sun, L. Chen, X.G. Hou, et al., Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro, *Chin. Med. J.* 120 (2007) 771-776.

- [15] O. Karnieli, Y. Izhar-Prato, S. Bulvik, S Efrat, Generation of insulinproducing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation, *Stem Cells* 25 (2007) 2837–2844.
- [16] Y.H. Zhang, H.F. Wang, W. Liu, et al., Insulin-Producing Cells Derived from Rat Bone Marrow and their autologous transplantation in the duodenal wall for treating diabetes, *Anat. Rec.* 292 (2009) 728–735.
- [17] G. Lin, G. Wang, G. Liu, et al., Treatment of Type 1 Diabetes with Adipose Tissue-Derived Stem Cells Expressing Pancreatic Duodenal Homeobox 1, *Stem Cells Dev.* 18 (2009) 1399-406
- [18] T. Matsuoka, H. Kaneto, R. Stein, et al., MafA regulates expression of genes important to islet β -cell function, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 2764 - 2774.
- [19] L. da Silva Meirelles, P.C. Chagastelles, N.B. Nardi, Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues, *J. Cell. Sci.* 119 (2006) 2204-2213.
- [20] L. da Silva Meirelles, A.I. Caplan, N.B. Nardi, In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells, *Stem Cells* 26 (2008) 2287-2299.
- [21] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 4 (2006) 315-317.
- [22] J. Liu, X.F. Lu, L. Wan, Y et al., Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line, *Transplant. Proc.* 36 (2004)

3272-3275.

[23] J. Cai, A. Cheng, Y. Luo, et al., Membrane properties of rat embryonic multipotent neural stem cells, *J. Neurochem.* 88 (2004) 212–226.

[24] S. Zhou, J.D. Schuetz, K.D. Bunting, et al., The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the sidepopulation phenotype, *Nat. Med.* 7 (2001) 1028–1034.

[25] J.F. Habener, D.M. Kemp, M.K. Thomas, Transcriptional regulation in pancreatic development, *Endocrinology* 146 (2005) 1025-1034.

[26] T.G. Fellous, S.A. McDonald, J. Burkert, et al., A methodological approach to tracing cell lineage in human epithelial tissues, *Stem Cells* 27 (2009) 1410-20.

[27] B. Moriscot C, F. de Fraipont, M.J. Richard, et al., Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro, *Stem Cells* 23 (2005) 594–603.

[28] P. González, T.M. Santos, A. Calil, et al., Expression of pancreatic endocrine markers by prolactin-treated rat bone marrow mesenchymal stem cells, *Transplant. Proc.* 42 (2010) 566-569.

[29] K. Timper, D. Saboek, M. Eberhardt, et al., Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (2006) 1135-1140.

- [30] J. Eng, W.A. Kleinman, L. Singh, et al., Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue from *Heloderma suspectum* venom, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 7402–7405.
- [31] L. Bai L, G. Meredith, B.E. Tuch, Glucagon-like peptide-1 enhances production of insulin in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells, *Endocrinology* 186 (2005) 343–352.
- [32] S. Sulzbacher, I.S. Schroeder, T.T. Truong, A.M. Wobus, Activin A-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors-the influence of differentiation factors and culture conditions, *Stem Cell Rev.* 5 (2009) 159-173.
- [33] S.K. Kim, M. Hebrok, E. Li, et al., Activin receptor patterning of foregut organogenesis, *Genes Dev.* 14 (2000)1866-1871.
- [34] S. Bonner-Weir, C. Weir, New sources of pancreatic β -cells, *Nat. Biotech.* 23 (2005) 857-861.
- [35] Z. Neshati, M.M. Matin, A.R. Bahrami, A. Moghimi, Differentiation of mesenchymal stem cells to insulin-producing cells and their impact on type 1 diabetic rats, *J. Physiol. Biochem.* (2010).
- [36] G. Siegel, R. Schäfer, F. Dazzi, The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells, *Transplantation* 15 (2009) S45-S49.
- [37] G. Brooke, M. Cook, C. Blair, et al., Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells, *Semin. Cell. Dev. Biol.* 18 (2007) 846-858.
- [38] V.K. Prasad, K.G. Lucas, G.I. Kleiner, et al., Efficacy and safety of ex-vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric

patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study, *Biol. Blood Marrow Transplant.* (2010).

Legends

Fig. 1. Plasticity and growth kinetics of MSC derived from BALB/c pancreas (pMSC, A-C and J), kidney (kMSC, D-F and J) and bone marrow (bmMSC, G-I and J). MSC cultivated in complete medium maintain their conventional aspect in phase microscopic contrast (A, D, G). Osteogenic differentiation is shown by staining of calcium deposited in the extracellular matrix with Alizarin Red S (B, E, H). Adipogenic differentiation is revealed by the staining of lipid vacuoles with Oil Red O (C, F, I). Magnifications, x100. (J) Comparative growth kinetics of cultures originated from different tissues. Growth curves of representative MSC populations from bone marrow, kidney and pancreas are plotted.

Fig. 2. Morphology of MSC cultured in IPC-inducing medium with or without activin A and stained with DTZ. Islet-like clusters are not observed in control MSC cultured with CM without inducers (A, C, E, G). Kidney-derived MSC (A, B) readily differentiated into DTZ-positive cells (B) when cultured in inducing medium with activin A. BM-derived MSC (C, D) were also able to originate DTZ-positive cells in the presence of activin A (D), but with much lower efficiency. Pancreas MSC (E-H) do not originate DTZ-positive cells when cultured in presence of activin A (F), but removal of this factor resulted in consistent formation of DTZ-positive clusters (H). Magnifications, x100.

Fig. 3. Insulin gene expression in MSC submitted to differentiation into IPC for 3 day-culture in inducing medium. (A) RT-PCR of IPC differentiated from MSC

isolated from the pancreas (pIPC), bone marrow (bmIPC) or kidney (kIPC) show different levels of expression of the insulin 1 gene. M, molecular weight marker; Ct+, positive control (pancreas). Expression results were relative to Gapdh. (B) Optical density of the bands, quantified with the ImageJ software version 1.4 and normalized with Gapdh expression. (C) Insulin production detected by western blotting in normal pancreas (Ct+) or in IPC differentiated from MSC isolated from the pancreas (p), bone marrow (bm) or kidney (k), cultured for 3 days in presence (*) or absence of activin A. The arrow points the 34-kb band corresponding to insulin 1. M, molecular weight marker; Ct-, negative control (washed membrane).

Fig. 4. Blood glucose levels and body weight of STZ-induced diabetic mice implanted with insulin-producing cells or undifferentiated MSC. Thirty days after the STZ treatment [STZ (d-30)], 10⁶ IPC or MSC were implanted under the kidney capsule (day 0). Blood glucose levels and body weight were determined on days 10 (d10) and 20 (d20) after cell transplantation. (A) Blood glucose levels remained at high levels in mice treated with kidney-derived IPC (kIPC) and pancreas-derived MSC (pMSC), and showed decrease only in mice treated with pancreas IPC (pIPC). (B) Body weight was similar in treated and control animals. (C) The quantitative analysis of blood glucose levels in mice treated with pancreas-derived IPC showed a significant reversal in hyperglycemia, on day 20 after cell transplantation. Data are presented as means±SD (n=4/group). *p<0.05 as compared with its mean value before STZ treatment; **p<0.05 as compared with its mean value before cell transplantation.

Figure 1

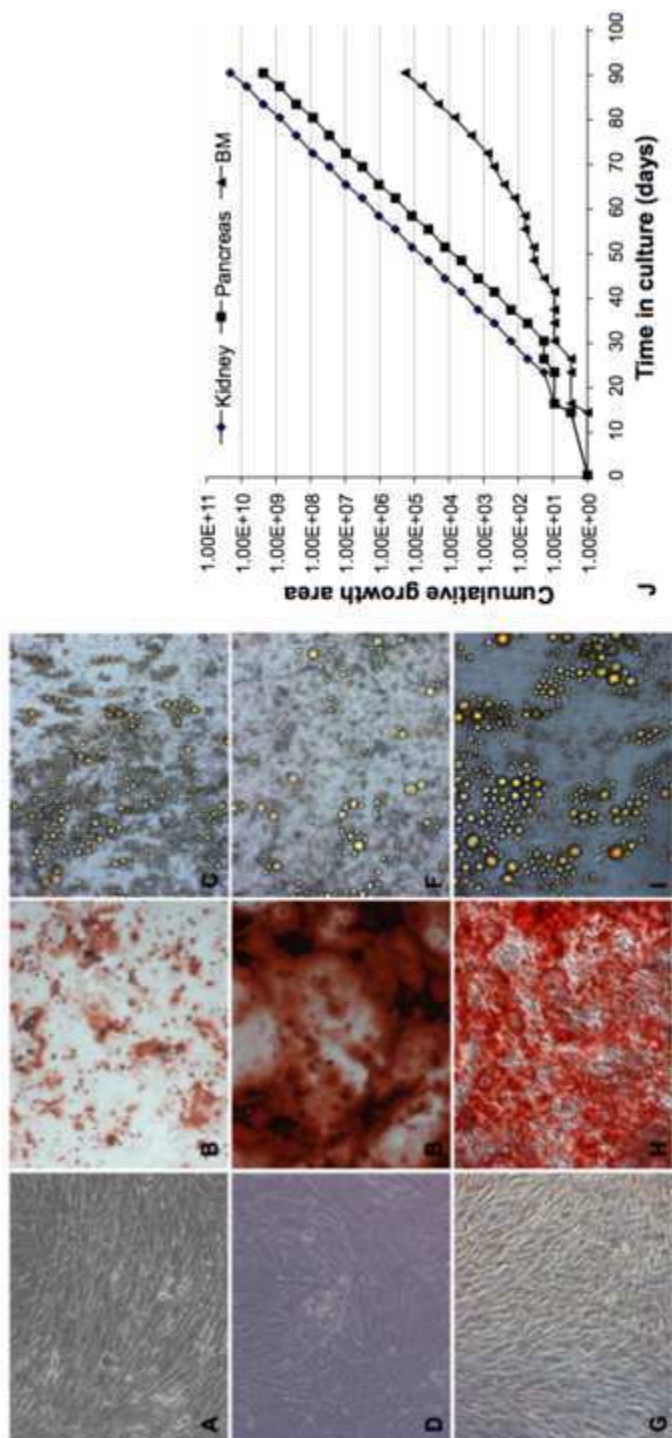


Figure 2

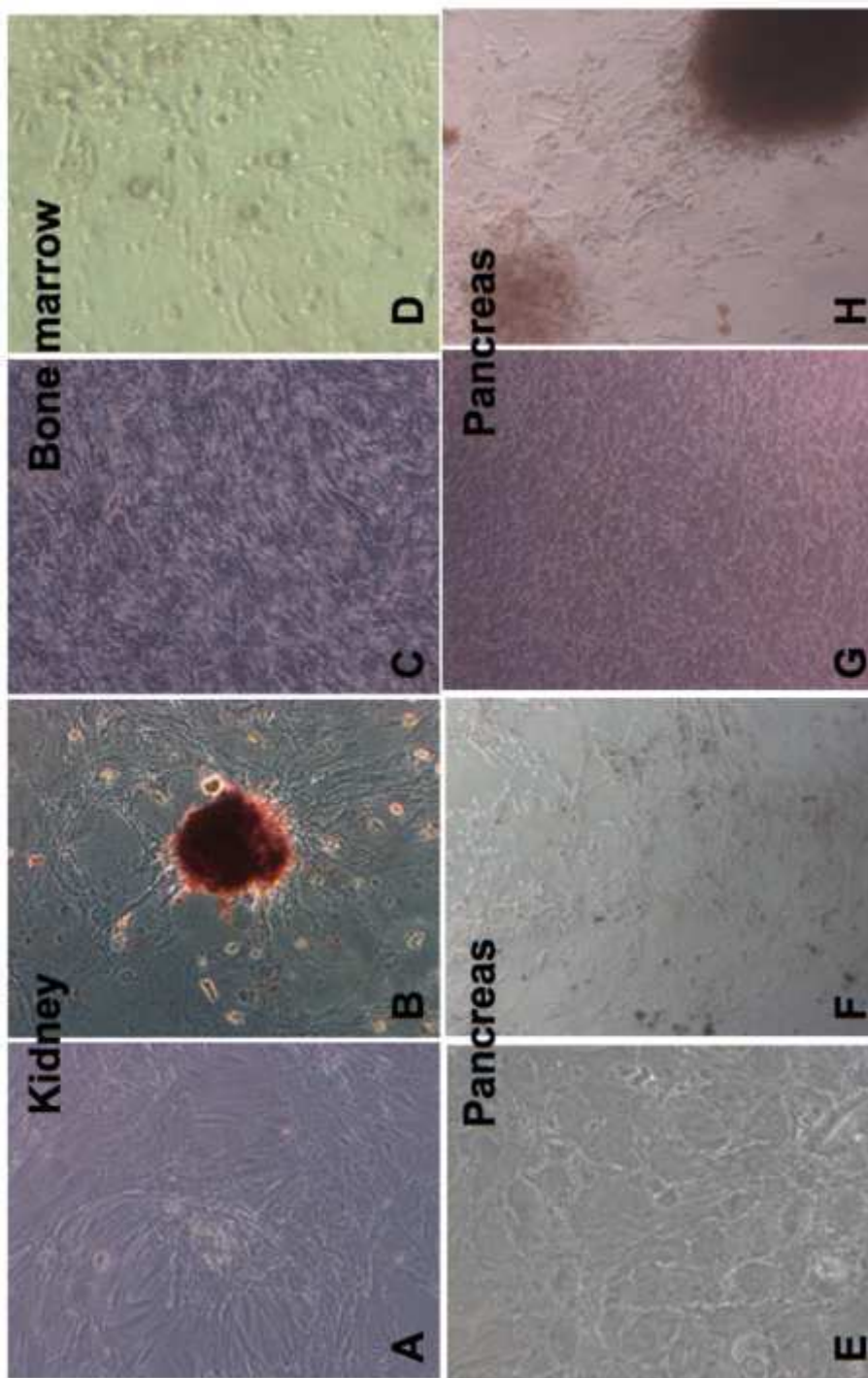


Figure 3

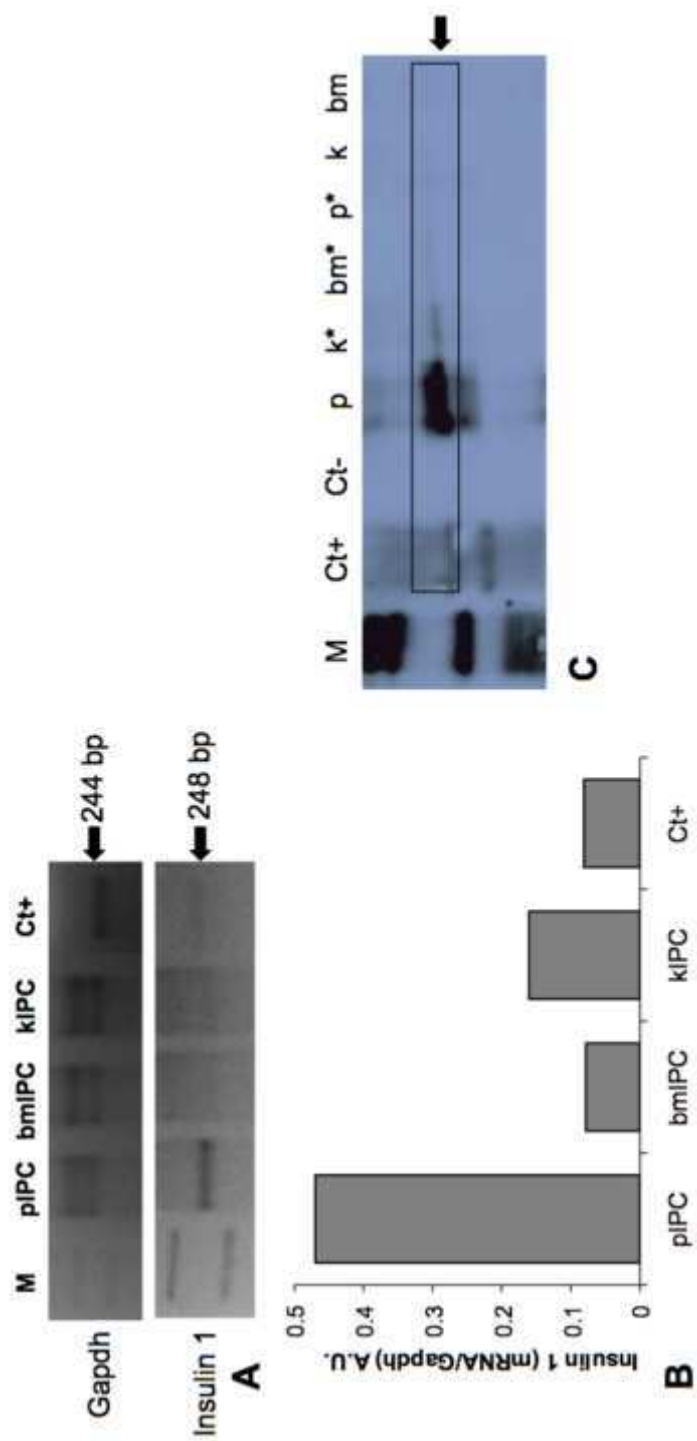


Figure 4

