

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**  
**(Bioquímica)**

FERNANDO HENRIQUE LOJUDICE

**Identificação de Genes Diferencialmente Expressos**  
**durante diferenciação de Células-Tronco e**  
**Caracterização de Células Progenitoras Mesenquimais**

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo  
Data do Depósito na SPG:  
14 de Fevereiro de 2008

**“De tudo, ficaram três coisas: A certeza de que estamos sempre começando... A certeza de que precisamos continuar... A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar... Fazer da interrupção, um caminho novo... Da queda, um passo de dança... Do medo, uma escada... Do sonho, uma ponte... Da procura, um encontro...”**

*Fernando Sabino, Certeza*

**A minha Mãe, meu maior exemplo de luta, por  
em momento algum me deixar desistir e por todo  
o amor e apoio necessário para chegar até aqui...**

## **Agradecimentos**

À Mari, por toda a orientação, apoio, amizade, paciência, exemplo e confiança depositada em mim, etc... muitas vezes acreditou em mim mais do que eu mesmo.

Às minhas duas “filhas”: Ilana e Paty, meus braços direito e esquerdo, cabeça, tronco e membros, motivos dos meus cabelos brancos, sem elas esse trabalho não existiria.

Ao “papai” Carlos e a “mamãe” Irê, por me terem “adotado” em São Paulo e me ensinado muito mais do que apenas técnicas de laboratório.

À Dra Lygia da Veiga Pereira do IB-USP, por ter aberto as portas de seu laboratório e me permitido aprender um pouco sobre células-tronco.

Aos Amigos da UIPH, Adriano, Flávia, Graça, Helene, Marluce, Miguel, Ícaro, Thiago, Carol, Gisella, Daniel, Letícia Labriola, Letícia Terra e Érica, por toda ajuda e bons momentos compartilhados.

À Patrícia Barros, pela amizade e por viver tentando me colocar na linha.

A todo LBCM, Aline, Ana Cláudia, Carin, Fernanda, Flávia, Gustavo, Isnar, Juan, Lu Cruz, Lu Gomes, Marcos, Maria Fernanda, Marina, Mayara, Newton, Nicole, Tatiane, Thelma e Theri.

Aos ex-integrantes do laboratório, Mário, Katlin, Sheila, Rita, Colin, Wagner, Léo, FeFesta, FeOrtis, Fujita e Ant, amigos distantes mas não esquecidos.

A todo corpo técnico, Zizi, Débora, Sandra, Ricardo, Guilherme, D. Helena e Alessandro por tornar nossa vida mais fácil.

As amigas de fé, irmãs camaradas, companheiras de trabalho do HIAE, Lu, Daí, Tati e Carola, pelas várias discussões, e sempre estarem tentando achar a luz no fim do túnel.

Aos “Xuxus”, Ana Helena, Dani e Ju, por estarem sempre do meu lado, apoiando, incentivando e dando bronca quando necessário.

Aos amigos do MB, Roberto, Pol, Guilherme, João, Zuleta, Portuga, Velho e Japonegro, já 11 anos de convivência, praticamente meus irmãos.

Aos amigos do Biosal, Gaúcho (Filho!), Pedrinho, Jeca, Vaquero, Vander, Gustavinho, Zé e Glauco, por toda a convivência, bons e maus momentos vividos, mas sempre unidos.

A Ju Mariotti, pela eterna dedicação, companheirismo e principalmente, paciência comigo.

A minha mãe por todo o apoio e nunca me deixar desistir.

Aos meus dois irmãos, Marcelo e Gustavo, por toda ajuda e compreensão, me apoiando em quaisquer que fossem minhas decisões.

A toda a minha família por estar sempre do meu lado mesmo nos meus vários momentos de ausência minha.

A todas as mães e filhos que doaram o cordão e fizeram possível a realização deste trabalho.

Às agências de Fomento por acreditarem na ciência brasileira

**“I would like to thank You from the bottom of my Pâncreas... it is the same of the bottom of my Heart, only deeper!!!”**

# Índice

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumo .....                                                                                     | 8  |
| Abstract.....                                                                                    | 9  |
| Lista de Abreviaturas .....                                                                      | 10 |
| 1. Introdução .....                                                                              | 15 |
| 1.1. Diabetes mellitus.....                                                                      | 15 |
| 1.1.1. Tipos de Diabetes mellitus .....                                                          | 17 |
| 1.1.1.1. Diabetes mellitus tipo I (DM1) .....                                                    | 17 |
| 1.1.1.1.1. Fisiopatologia do DM1 .....                                                           | 18 |
| 1.1.1.1.2. Herança “Monogênica” do DM .....                                                      | 23 |
| 1.1.1.1.3. Herança Oligo/Poligênica do DM1 .....                                                 | 24 |
| 1.1.1.1.4. Influência de Fatores Ambientais no Aparecimento do DM1.....                          | 25 |
| 1.1.1.1.5. Predição do Aparecimento do DM1 .....                                                 | 25 |
| 1.1.1.1.6. Imunossupressão e Imunoregulação do DM1.....                                          | 25 |
| 1.1.1.2. Diabetes mellitus tipo II (DM2) .....                                                   | 26 |
| 1.1.1.2.1. Fisiopatologia do DM2 .....                                                           | 28 |
| 1.1.2. Terapias do Diabetes mellitus .....                                                       | 30 |
| 1.1.2.1. Aumento do Controle Metabólico .....                                                    | 30 |
| 1.1.2.2. Monitores de Glicose .....                                                              | 30 |
| 1.1.2.3. Insulinoterapia .....                                                                   | 31 |
| 1.1.2.4. Transplante de Pâncreas versus Transplante de Ilhotas .....                             | 31 |
| 1.2. Células-Tronco.....                                                                         | 35 |
| 1.2.1. Células-Tronco Embrionárias .....                                                         | 35 |
| 1.2.2. Células-Tronco Adultas .....                                                              | 38 |
| 1.2.2.1. O uso terapêutico de células-tronco adultas .....                                       | 40 |
| 1.2.2.2. Biologia das células-tronco hematopoiéticas e a reconstituição hematopoiética .....     | 43 |
| 1.2.2.3. O uso de Células de Cordão Umbilical em Terapia Gênica e Reconstituição de Tecidos..... | 47 |
| 1.3. Células-tronco como fonte de ilhotas pancreáticas .....                                     | 49 |
| 1.3.1. Células-tronco embrionárias (ESC).....                                                    | 49 |
| 1.3.2. Células-tronco de medula óssea .....                                                      | 52 |
| 1.3.3. Células-tronco pancreáticas endógenas .....                                               | 53 |
| 1.3.4. Células-tronco de origem não-pancreática .....                                            | 56 |
| 2. Objetivos .....                                                                               | 58 |
| 2.1. Objetivo Geral .....                                                                        | 58 |
| 2.2. Objetivos Específicos .....                                                                 | 58 |
| 3. Material e Métodos.....                                                                       | 59 |
| 3.1. Materiais.....                                                                              | 59 |

|                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1. Soluções e Meios de Cultura para Células de Mamíferos.....                                                                                                                                                            | 59 |
| 3.1.2. Soluções .....                                                                                                                                                                                                        | 60 |
| 3.2. Culturas celulares .....                                                                                                                                                                                                | 60 |
| 3.3. Cultivo de células-tronco embrionárias (ES) de Camundogos.....                                                                                                                                                          | 60 |
| 3.3.1. Manutenção das (ES) em estado indiferenciado .....                                                                                                                                                                    | 60 |
| 3.3.2. Diferenciação das células ES murinas em células secretoras de insulina.....                                                                                                                                           | 61 |
| 3.4. Imunofluorescência Indireta .....                                                                                                                                                                                       | 64 |
| 3.4.1. Anticorpos e Antisoros .....                                                                                                                                                                                          | 65 |
| 3.5. Dosagem de Insulina.....                                                                                                                                                                                                | 65 |
| 3.6. Ensaio de Teratogênese.....                                                                                                                                                                                             | 66 |
| 3.7. Implante de Células Diferenciadas em Animais Diabéticos .....                                                                                                                                                           | 66 |
| 3.8. Extração e Purificação de RNA .....                                                                                                                                                                                     | 66 |
| 3.9. Síntese de cDNA .....                                                                                                                                                                                                   | 67 |
| 3.10. Controle de qualidade do cDNA .....                                                                                                                                                                                    | 67 |
| 3.11. Análise de Expressão Gênica Diferencial através de CodeLink Bioarrays .....                                                                                                                                            | 68 |
| 3.11.1. Preparação dos alvos.....                                                                                                                                                                                            | 68 |
| 3.11.1.1. Síntese do cDNA .....                                                                                                                                                                                              | 68 |
| 3.11.1.2. Purificação do cDNA dupla fita.....                                                                                                                                                                                | 69 |
| 3.11.1.3. Síntese do cRNA .....                                                                                                                                                                                              | 69 |
| 3.11.1.4. Purificação do cRNA marcado .....                                                                                                                                                                                  | 69 |
| 3.11.2. Hibridização e Lavagem .....                                                                                                                                                                                         | 70 |
| 3.11.2.1. Fragmentação do cRNA.....                                                                                                                                                                                          | 70 |
| 3.11.2.2. Hibridização dos <i>bioarrays</i> .....                                                                                                                                                                            | 70 |
| 3.11.2.3. Lavagem e marcação .....                                                                                                                                                                                           | 71 |
| 3.11.2.4. Aquisição e análise dos dados.....                                                                                                                                                                                 | 71 |
| 3.12. Confirmação da expressão diferencial por PCR em Tempo Real (Real-Time PCR/Q-PCR) .....                                                                                                                                 | 72 |
| 3.12.1. Padronização da eficiência dos <i>primers</i> .....                                                                                                                                                                  | 73 |
| 3.12.2. Confirmação da expressão diferencial.....                                                                                                                                                                            | 73 |
| 3.13. Obtenção de Células-tronco a partir da Medula Óssea de Ratos... 74                                                                                                                                                     |    |
| 3.14. Descongelamento de Bolsa de Sangue de Cordão Umbilical .....                                                                                                                                                           | 75 |
| 3.15. Ensaio de Atividade Mitogênica .....                                                                                                                                                                                   | 75 |
| 3.16. Obtenção de Células-tronco a partir da Parede da Veia Umbilical 76                                                                                                                                                     |    |
| 3.17. Obtenção de Células-tronco a partir do Sangue de Cordão Umbilical .....                                                                                                                                                | 77 |
| 3.18. Curvas de Crescimento .....                                                                                                                                                                                            | 77 |
| 3.19. Caracterização Imunológica (Imunofenotipagem) das culturas de células-tronco mesenquimais da parede da veia umbilical (MSC), de sangue de cordão umbilical (UCB) e endotélio vascular de cordão umbilical (HUVEC)..... | 78 |

|                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.20. Ensaio de diferenciação das células progenitoras mesenquimais obtidas a partir das culturas do sangue de cordão umbilical e da parede da veia de cordão na linhagem óssea. .... | 79  |
| 3.21. Análise Estatística.....                                                                                                                                                        | 79  |
| 4. Resultados.....                                                                                                                                                                    | 80  |
| 4.1. Células-Tronco Embrionárias.....                                                                                                                                                 | 80  |
| 4.1.1. Cultura e caracterização de células-tronco embrionárias (ESC) murinas.....                                                                                                     | 80  |
| 4.1.2. Diferenciação e caracterização de ESC murinas em células produtoras de insulina.....                                                                                           | 83  |
| 4.1.3. Análise da expressão gênica diferencial após a diferenciação de ESCs murinas em células produtoras de insulina através de <i>CodeLink Bioarrays</i> .....                      | 94  |
| 4.2. Células-tronco da medula óssea de rato.....                                                                                                                                      | 103 |
| 4.3. Células-tronco de Cordões Umbilicais.....                                                                                                                                        | 109 |
| 4.3.1. Cordão Umbilical Congelado.....                                                                                                                                                | 109 |
| 4.3.1. Cordão Umbilical Fresco.....                                                                                                                                                   | 112 |
| 5. Discussão.....                                                                                                                                                                     | 127 |
| 5.1. Embriogênese e Organogênese do pâncreas endócrino.....                                                                                                                           | 128 |
| 5.2. Células-tronco Embrionárias.....                                                                                                                                                 | 131 |
| 5.3. Células-tronco Adultas.....                                                                                                                                                      | 136 |
| 5.3.1. Células-tronco da Medula Óssea de Rato.....                                                                                                                                    | 138 |
| 5.3.2. Células-tronco da Parede de Cordão Umbilical e do Sangue de Cordão Umbilical.....                                                                                              | 139 |
| 6. Conclusões.....                                                                                                                                                                    | 145 |
| 7. Referências Bibliográficas.....                                                                                                                                                    | 147 |
| 8. Apêndices.....                                                                                                                                                                     | 166 |
| 8.1. Primers Utilizados.....                                                                                                                                                          | 166 |
| 8.1.1. Primers de Camundongo.....                                                                                                                                                     | 166 |
| 8.1.2. Primers de Rato.....                                                                                                                                                           | 167 |
| 8.1.3. Primers de Humano.....                                                                                                                                                         | 167 |
| SÚMULA CURRICULAR.....                                                                                                                                                                | 168 |

## Resumo

Lojudice, F.H. **Identificação de Genes Diferencialmente Expressos durante diferenciação de Células-Tronco e Caracterização de Células Progenitoras Mesenquimais**. 2008. 201p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Diabetes mellitus (DM) designa um conjunto de patologias devidas à falta ou ação deficiente da insulina. O DM1 é causado por ataque auto-imune às células  $\beta$ -pancreáticas secretoras de insulina, enquanto DM2 é relacionado com idade e obesidade. Alotransplante de pâncreas ou de ilhotas são alternativas terapêuticas, mas escassez de órgãos e necessidade de imunossupressão são obstáculos importantes. Células-tronco, isoladas da massa interna de blastocistos e de tecidos adultos, são capazes de auto-renovação e diferenciação, podendo ser utilizadas para o tratamento de doenças. Os objetivos deste trabalho foram: a) buscar novos genes envolvidos no processo de diferenciação de células tronco em células secretoras de insulina e b) isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais humanas. Células-tronco embrionárias murinas foram induzidas a se diferenciar em *clusters* similares a ilhotas. O RNA foi utilizado para sondar *microarrays* de DNA (*CodeLink*) e os genes diferencialmente expressos foram confirmados por Q-PCR, sendo possível identificar 16 novos genes associados à diferenciação. Dois tipos diferentes de células-tronco mesenquimais foram isoladas da veia (MSC) e do sangue (UCB) de cordão umbilical humano. Imunofenotipagem e caracterização molecular por Q-PCR, apontaram para a existência de dois tipos diferentes de progenitoras mesenquimais adultas no cordão umbilical humano.

**Palavras-chave:** Células-tronco, CodeLink, Cordão Umbilical, Diabetes, Diferenciação, Insulina.

## Abstract

Lojudice, F.H. **Identification of Differentialy Express Genes during the differentiation of Stem Cells and Characterization of Mesenchymal Progenitor Cells**. 2008. 201p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry ou Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Diabetes mellitus (DM) defines a number of pathologies caused by the lack or deficient action of the insulin hormone. DM1 is caused by an auto-immune attack to insulin secreting  $\beta$ -pancreatic cells, while DM2 is related to ageing and obesity. Pancreas and islet allo-transplantation constitute therapeutic alternatives, but severe organ shortage and the absolute requirement for immunosuppression still constitute important obstacles. Stem cells isolated from the blastocist inner cell mass and from adult tissues are capable of self-renewal and differentiation, and may be utilized for treatment of several diseases. The objectives of this work were: a) to search for new genes involved in the process of differentiation of stem cells into insulin-secreting cells and b) to isolate and characterize mesenchymal stem cells. Murine embryonic stem cells were induced to differentiate in islet-like *clusters*. Total RNA was utilized to probe DNA *microarrays* (*CodeLink*) and the differentially expressed genes were confirmed by Q-PCR, with 16 new genes being identified as associated with differentiation. Two different types of mesenchymal stem cells were isolated from human umbilical cord vein (MSC) and blood (UCB). Immunophenotyping and molecular characterization by Q-PCR, pointed to the existence of two different types of progenitor mesenchymal stem cells in human umbilical cord.

**Keywords:** Stem Cells, CodeLink, Diabetes, Differentiation, Insulin, Umbilical Cord.

## Lista de Abreviaturas

|                    |                                                 |
|--------------------|-------------------------------------------------|
| $\alpha$ -MEM      | - Minimum essential medium, alpha modification  |
| AIRE               | - Autoimmune Regulator                          |
| ALDH1A2            | - Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2    |
| APS-1              | - Autoimmune Polyendocrine Syndrome type 1      |
| ASC                | - Adult stem cell                               |
| ASCL1              | - Achaete-scute-complex 1                       |
| ATP                | - Adenosine Trisphosphate                       |
| BETA2NEUROD1       | - Neurogenic differentiation 1                  |
| bFGF (FGF2)        | - basic Fibroblast Growth Factor                |
| bHLH               | - Basic helix-loop-helix domain                 |
| BLAST              | - Basic Local Alignment Search Tool             |
| BMSC               | - Bone Marrow stem cell                         |
| BSA                | - Bovine serum albumine                         |
| CD14 (LPS-r)       | - Monocyte differentiation antigen              |
| CD29 (ITGB1)       | - Integrin beta 1                               |
| CD31 (PECAM)       | - Platelet-endothelial cell adhesion molecule   |
| CD34               | - Hematopoietic progenitor cell antigen         |
| CD44 (PGP1/H-CAM)  | - Chondroitin sulfate proteoglycan 8            |
| CD45 (PTPRC/GP180) | - Protein tyrosine phosphatase, receptor type C |
| CD73               | - 5'-nucleotidase, ecto                         |
| CD90 (THY-1)       | - Thy-1 cell surface antigen                    |
| CD105 (ENG)        | - Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)       |
| CD106 (V-CAM1)     | - Vascular cell adhesion molecule 1             |
| CD133 (PROM1)      | - Prominin 1                                    |
| cDNA               | - complementary DNA                             |
| CK19 (KRT19)       | - Keratin 19                                    |
| COBEA              | - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal   |
| CONEP              | - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa        |
| CPHs               | - Células progenitoras hematopoiéticas          |

|               |                                              |
|---------------|----------------------------------------------|
| CPD           | - Células de polpa dentária                  |
| cRNA          | - complementary RNA                          |
| CTLA4 (CD152) | - Cytotoxic T Lymphocyte Associated 4        |
| CXCL12        | - Chemokine, CXC motif, ligand 12            |
| CXCR4         | - Chemokine, CXC motif, receptor 4           |
| DCCT          | - Diabetes Control and Complications Trial   |
| DLX           | - Distal-Less Homeobox                       |
| DM            | - Diabetes mellitus                          |
| DM1           | - Diabetes mellitus tipo 1                   |
| DM2           | - Diabetes mellitus tipo 2                   |
| DMEM          | - Dulbecco's modified eagle medium           |
| DMSO          | - Dimethyl sulfoxide                         |
| DNA           | - Deoxyribonucleic acid                      |
| DNER          | - Delta- and Notch-like EGF related receptor |
| DAPI          | - 4',6-diamidino-2-phenylindole              |
| dNTP          | - Deoxynucleotide triphosphate               |
| DTT           | - Dithiothreitol                             |
| EB            | - Embryo Bodies                              |
| EDTA          | - Ethylenediaminetetra-acetic acid           |
| EGF           | - Epidermal Growth Factor                    |
| EN1           | - Engrailed 1                                |
| ENSA          | - Alpha-endosulphine                         |
| ERK           | - Extra cellular-signal regulator kinase     |
| ESC           | - Embryonic Stem Cell                        |
| EXD-4         | - Exendin 4                                  |
| FACS          | - Fluorescent-activated cell sorting         |
| FADD          | - Fas-associated death protein               |
| FITC          | - Fluorescein isothiocyanate                 |
| FOXP3         | - Forkhead box P3                            |
| GAD65         | - Glutamic Acid Descarboxilase               |
| GAPDH         | - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase   |

|                |                                                         |
|----------------|---------------------------------------------------------|
| GEDI           | - Gene Expression Data Interpreter                      |
| GLP1           | - Glucagon-like peptide 1                               |
| GLUT2          | - Glucose Transporter 2                                 |
| GLUT4          | - Glucose Transporter 4                                 |
| Gp130          | - Interleukin 6 signal transducer                       |
| GVHD           | - Graft <i>versus</i> Host Disease                      |
| HbA1c          | - Glycosylated Hemoglobin                               |
| HDLc           | - High Density Lipoprotein - cholesterol                |
| HGF            | - Hepatocyte Growth Factor                              |
| HGFr/c-Met     | - Hepatocyte Growth Factor Receptor                     |
| HIAE           | - Hospital Israelita Albert Einstein                    |
| HLA            | - Human Leukocyte Antigen                               |
| HLA-DR (DRB1)  | - Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 |
| HPRT           | - Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase       |
| HSC            | - Hematopoietic stem cell                               |
| HUES           | - Human embryonic stem cell                             |
| HUVEC          | - Human umbilical vein endothelial cell                 |
| IFIH1          | - Interferon induced with helicase C domain 1           |
| IGRP           | - Islet-specific glucose-6-phosphate related protein    |
| IL-2           | - Interleukin 2                                         |
| IL-2R          | - Interleukin 2 Receptor                                |
| IL-2R $\alpha$ | - Interleukin 2 Receptor alpha                          |
| IL-3           | - Interleukin 3                                         |
| IL-6           | - Interleukin 6                                         |
| IL-10          | - Interleukin 10                                        |
| IL-12          | - Interleukin 12                                        |
| INF- $\gamma$  | - Interferon Gamma                                      |
| INS1           | - Insulin 1                                             |
| INS2           | - Insulin 2                                             |

|         |                                                                |
|---------|----------------------------------------------------------------|
| IPEX    | - Immune Dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked |
| ISL1    | - Islet transcription factor 1                                 |
| ITPR3   | - Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3                       |
| ITS     | - Insulin – Transferrin – Selenium                             |
| ITSFn   | - Insulin-transferrin-selenium-fibronectin                     |
| JAK     | - Janus Kinase                                                 |
| KITL    | - KIT ligand                                                   |
| LADA    | - Latent Autoimmune Diabetes of the Young                      |
| LDLc    | - Low Density Lipoprotein – cholesterol                        |
| LIF     | - Leukemia Inhibitory Factor                                   |
| LOWESS  | - Locally-Weighted Scatter plot Smoother                       |
| MAF     | - V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog       |
| M-CSF   | - Macrophage colony-stimulating factor                         |
| mdx     | - Dystrophic mice                                              |
| MEF     | - Mouse Embryonic Fibroblast                                   |
| mESC    | - Murine embryonic stem cell                                   |
| MHC     | - Major Histocompatibility Complex                             |
| MO      | - Medula Óssea                                                 |
| MODY    | - Maturity onset diabetes of young                             |
| mRNA    | - messenger RNA                                                |
| MSC     | - Mesenchymal stem cell                                        |
| NANOG   | - Homeobox transcription factor NANOG                          |
| NIH     | - National Institute of Health                                 |
| NIP     | - Nestin-positive islet-derived cells                          |
| NKX2.2  | - NK2 homeobox 2                                               |
| NKX6.1  | - NK Homeobox , Family 6                                       |
| NOD     | - Non-Obese Diabetic Mouse                                     |
| NRP     | - Neural regeneration protein                                  |
| NTRK3   | - Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3               |
| OCT-3/4 | - Octamer binding transcription factor 3/4                     |

|                  |                                                     |
|------------------|-----------------------------------------------------|
| PAX4             | - Paired box gene 4                                 |
| PAX6             | - Paired box gene 6                                 |
| PBMSC            | - Peripheral blood mononuclear stem cell            |
| PBSA             | - Phosphate Buffered Saline                         |
| PBX1             | - Pre B-cell leukemia transcription factor 1        |
| PCMOs            | - Programmable Cells of Monocytic Origin            |
| PCR              | - Polimerase chain reaction                         |
| PDX1 (IPF1)      | - Insulin promoter factor 1                         |
| PTPN22           | - Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 |
| RA               | - Retinoic Acid                                     |
| RNA              | - Ribonucleic acid                                  |
| RPMI             | - Roswell Park Memorial Institute medium            |
| SCF              | - Stem cell factor                                  |
| SCFr/CD117/c-Kit | - Stem cell factor receptor                         |
| SCID             | - Severe Combined Immunodeficiency                  |
| SD               | - Spontaneous differentiation                       |
| SDS              | - Sodium Dodecyl Sulphate                           |
| SFB              | - Soro fetal bovino                                 |
| SFB-ES           | - Soro Fetal Bovino-ES qualified                    |
| SLC2A2           | - Solute carrier family 2, member 2                 |
| SNC              | - Sistema Nervoso Central                           |
| SOD              | - Superoxide Dismutase                              |
| SSEA             | - Stage specific embryonic antigen                  |
| STAT3            | - Signal Transducer and Activator of Transduction 3 |
| TBE              | - Tris-borate EDTA buffer                           |
| TCF7L2           | - Transcription factor 7 like 2                     |
| TNF- $\alpha$    | - Transforming Growth Factor Alpha                  |
| UCB              | - Umbilical Cord Blood                              |
| UPKDS            | - United Kingdom Prospective Diabetes Study         |
| ZIC1             | - Zinc finger protein of the cerebellum 1           |

# 1. Introdução

## *1.1. Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus (DM) designa um conjunto de patologias nas quais ocorrem alterações do metabolismo intermediário provocadas por falta de ou ação deficiente da insulina. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano 2000, o número de pacientes diabéticos no Mundo foi estimado em 171 milhões de habitantes, com projeções de um aumento de aproximadamente duas vezes até 2025. No Brasil, foram diagnosticados, no ano 2000, cinco milhões de pacientes diabéticos, mas este número poderá triplicar até o ano de 2030 (<http://www.who.int>).

O DM é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. As células beta adultas são localizadas nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, sendo especializadas na produção de insulina e monitoramento de nutrientes, acompanhado da secreção hormonal. Deste modo, insulina é secretada pelas células beta em resposta à glicose (o principal secretagogo), ácidos graxos e aminoácidos, sendo, esta resposta modulada por certos sinais nervosos, hormônios e agentes farmacológicos. (Liang et al., 1994; Ahren, 2000; Nesher et al., 2002; Newgard et al., 2002). A insulina participa da absorção de nutrientes (principalmente glicose) do sangue nos músculos, fígado e tecido adiposo, permitindo a normalização da glicemia. Pacientes diabéticos não produzem insulina ou a produzem em quantidade insuficiente para controlar a glicemia corporal.

O DM caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. As conseqüências do DM a longo prazo incluem danos, disfunção e falência de vários órgãos,

especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos. O DM é um importante problema de saúde pública uma vez que é frequente, está associado a complicações que comprometem a produtividade, qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos, além de envolver altos custos no tratamento da própria doença e das suas complicações. Medidas de prevenção do DM, assim como das complicações, são eficazes em reduzir o impacto desfavorável sobre morbimortalidade destes pacientes. Tal impacto pode ser avaliado através de dados obtidos de fontes do Ministério da Saúde (Silvestre, 1997), levantamentos regionais (Spichler et al., 1998; Bruno, 1999) e de outras associações (ADA, 1999):

- DM como o diagnóstico primário de internação hospitalar aparece como a sexta causa mais frequente e contribui de forma significativa (30% a 50%) para outras causas como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, colecistopatias, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial (Silvestre, 1997);
- Pacientes diabéticos representam cerca de 30% dos pacientes que são internados em Unidades Coronarianas Intensivas com dor precordial;
- DM é a principal causa de amputações de membros inferiores (Spichler et al., 1998);
- É, também, a principal causa de cegueira adquirida;
- Cerca de 26% dos pacientes que ingressam em programas de diálise são diabéticos (Bruno, 1999).

Nos últimos anos houve avanços importantes no estabelecimento de critérios diagnósticos do DM e no conhecimento de novas estratégias de tratamento. A doença cardiovascular é a principal responsável pela redução da sobrevida de pacientes diabéticos, sendo a causa mais frequente de mortalidade (Panzram, 1987).

### ***1.1.1. Tipos de Diabetes mellitus***

#### **1.1.1.1. Diabetes mellitus tipo I (DM1)**

O Diabetes mellitus tipo I é uma doença na qual a destruição das células beta pancreáticas leva a uma hiperglicemia persistente. A Associação Americana de Diabetes propôs uma classificação etiológica, como diabetes tipo 1A representando o diabetes imuno-mediado e o 1B representando a forma não-autoimune idiopática do diabetes tipo 1 ([REDCDM, 1997](#)). Doenças adicionais com severa deficiência em células  $\beta$ , com etiologias genéticas ou ambientais conhecidas são caracterizadas individualmente.

O melhor e mais comum marcador para distinguir o DM1 das outras formas de diabetes é a presença de anticorpos anti-ilhotas. Tipicamente, auto-anticorpos reagem contra ácido glutâmico descarboxilase (GAD65), insulina e insulinoma antigen-2 ([Eisenbarth, 2007](#)). Mesmo na presença de reações falso-positivas (aproximadamente 1%), juntos, um ou mais desses auto-anticorpos estão presentes em cerca de 90% dos diabéticos tipo 1 recém-diagnosticados ([Wang et al., 2007](#)). Sem dúvida, há outros auto-antígenos a serem definidos e uma população de pacientes sem esses três principais auto-anticorpos.

Injeções diárias de insulina são necessárias para a sobrevivência do paciente diabético, principalmente no caso do DM1. No entanto, é comum os pacientes desenvolverem complicações a longo prazo, como neuropatias, nefropatia, retinopatias e doenças do coração, etc, devido ao precário controle da glicemia, o que abre as portas para outros métodos de tratamento. O Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) demonstrou que a terapia intensiva do DM1 retarda o início e a progressão das complicações microvasculares em adolescentes e adultos ([DCCT, 1993](#); [DCCT, 1994](#)), mas também aumenta a incidência de episódios

severos de hipoglicemia. Estes episódios podem levar a um desarranjo e morbidez nas capacidades cognitivas e psicossociais em crianças com menos de 5 anos de idade diagnosticadas com DM1 ([Wagner et al., 2005](#)). Além disso, estes episódios hipoglicêmicos também podem ser o fator limitante para se alcançar um bom controle metabólico ([DCCT, 1994](#)).

#### 1.1.1.1.1. Fisiopatologia do DM1

Embora as conseqüências do ataque auto-imune no DM1 sejam óbvias, as causas iniciais que ativam a resposta imune ainda não estão bem claras. Esta informação pode ser relevante em alguns tipos de doenças auto-imunes suscetíveis para receber implantes celulares, pois deve determinar o regime imunossupressor no pós-operatório do paciente. Existem duas fases distintas na progressão do DM1. A primeira fase, chamada de insulite é caracterizada pela invasão do tecido da ilhota por uma população de leucócitos (Linfócitos T). A insulite ocorre somente quando as células beta estão presentes, indicando que este é um processo direcionado a elas. A segunda fase corresponde à destruição das células beta e a subsequente ausência de insulina ([Mathis et al., 2001](#); [Roep, 2003](#)).

Células T diabetogênicas são classificadas em duas classes: CD4+ helper e CD8+ citotóxicos. Ambas respondem, através de diferentes vias, para auto-antígenos gerados, principalmente, mas não exclusivamente, nas células beta pancreáticas. Para as células CD4+, estes antígenos são apresentados pelo *major histocompatibility complex* (MHC) classe II, encontrado em células especializadas em apresentar antígenos, como as células dendríticas. Para as células CD8+, os antígenos são apresentados pelo MHC classe I, que são encontrados na maioria das células somáticas ([Mathis et al., 2001](#)).

As causas primárias do processo auto-imune ainda são pobremente caracterizados, mas acredita-se que os Linfócitos T encontram os auto-

antígenos no tecido da ilhota ou nos linfonodos que drenam as ilhotas. Para este fim, a onda de morte das células beta acontece em estágios juvenis, permitindo a retirada de debris celulares pelas células dendríticas presentes nas ilhotas. Estas células migram e “apresentam” os antígenos para os Linfócitos T circulantes, que se tornam ativos e migram através do tecido para atingir as ilhotas (Notkins, 2002).

Neste contexto, as moléculas de MHC (HLA em humanos) têm um importante papel. A região do HLA é um *cluster* de 200 genes localizados no cromossomo 6, que codificam para glicoproteínas de superfície e permitem ao sistema imune discriminar entre suas próprias células e células/organismos/materiais “estranhos” (incluindo vírus, bactérias e implantes). A função destas glicoproteínas é apresentar peptídeos, que são o resultado da proteólise intracelular de proteínas, para antígenos receptores localizados na superfície dos linfócitos T CD4+ e CD8+. As regiões que codificam as moléculas de HLA classe I e classe II são altamente polimórficas, originando inúmeros variantes diferentes.

A insulina, por si só, representa o maior auto-antígeno no DM1 e anticorpos anti-insulina são marcadores de pré-diabetes, especialmente em jovens e crianças. Os anticorpos gerados por diabéticos são principalmente direcionados à cadeia B da molécula (Palmer et al., 1983). Estima-se que ao redor de 90% dos caucasianos com DM1 possuem anticorpos contra GAD, IA-2 e insulina (Mathis et al., 2001; Notkins, 2002). Outros genes com potencial para geração de anticorpos são: FADD (*Fas-associated death protein*), SOD (*Superóxido Dismutase mitocondrial*), IGRP (*islet-specific glucose-6-phosphate-related protein*), ENSA (*alpha-endosulphine, um regulador endógeno do canal de  $K_{ATP}$* ), CTLA4 (*co-stimulatory receptors for T-cell activation*, que inclui o CD28) e IL-12 (*Interleucina 12*) (Nistico et al., 1996; Heron et al., 1999; Adorini, 2001; Pociot et al., 2002; Hutton et al., 2003).

Os mecanismos de destruição seletiva das células  $\beta$  podem ser diretos ou indiretos. Na destruição direta, os linfócitos citotóxicos CD8+ reconhecem as proteínas de superfície apresentadas pelos peptídeos de HLA classe I das células  $\beta$ . Isto induz a ativação de vias de transdução de sinal nas quais os efetores (por exemplo, Fas/Fas-ligante, perforin/granzyme) ativam a apoptose nas células  $\beta$  (Fisher et al., 1995; Tivol et al., 1995; Mathis et al., 2001).

Na destruição indireta das células  $\beta$ , os linfócitos T CD4+ helper reconhecem os auto-antígenos das células  $\beta$ , apresentados pelas moléculas de HLA classe II das células dendríticas (células  $\beta$  não expressam proteínas de HLA classe II). Células dendríticas têm um papel importante na regulação da resposta imune. Os dendritos maduros estimulam a resposta à Th1, e se o balanço de linfócitos Th1/Th2 pesar em favor de Th1 a consequência fatal é a destruição das células  $\beta$  pancreáticas (Mathis et al., 2001; Notkins, 2002; Roep, 2003).

Após o ataque dos linfócitos, durante a insulite, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias e o aparecimento de anticorpos que resultam numa demora na reação inflamatória mediada por células. Entre as citocinas responsáveis pela resposta inflamatória, as mais importantes são: IL-1, IL-6, IL-10 TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (Lee et al., 2004; Mysliwska et al., 2005; Vella et al., 2005). Foi provado que a expressão de IL-2 em camundongos transgênicos produz uma destruição em massa de ilhotas pancreáticas. Foi também demonstrado que IL-6 participa do processo de insulite, IL-10 pode ser um fator que acelera o aparecimento do diabetes e INF- $\gamma$  ativa os linfócitos T que atacam especificamente as células  $\beta$ .

As doenças auto-imunes podem progredir se não houver algum sinal inibitório mediado por CTLA-4 (CD152). Este homodímero de 33-34 kDa é um receptor de alta afinidade por IL-2, sendo essencial para a

manutenção do balanço entre proliferação dos linfócitos T ativados e sua inibição (Dariavach et al., 1988). Linfócitos T não estimulados expressam CD28, que se liga à moléculas de co-estimulação, como B7, presentes nas membranas das células que expressam o antígeno, resultando na ativação dos linfócitos. Uma vez ativado, o linfócito passa a expressar CD152 e desliga o CD28, completando a resposta imune contra o antígeno. Na ausência de CD152, a resposta ocorreria continuamente. É interessante notar que alguns dos genes susceptíveis para o DM1, como IDDM7, são codificados muito próximos ao gene do CD152 (Rudd, 1996).

A destruição das células  $\beta$  pancreáticas por linfócitos T CD8+ citotóxicos requer uma importante atividade de co-estimulação, para induzir os linfócitos T CD8+ a produzir IL-2, que ativa a proliferação e diferenciação celular. Em alguns casos, a presença de linfócitos T CD4+ é também necessária para compensar o possível déficit de co-estimulação que podem ter os linfócitos T CD8+ (Liu et al., 1992). Além do mais, os linfócitos T CD4+ podem agir através de: a) ativação das células apresentadoras de antígenos, que podem então expressar mais moléculas de co-estimulação, ou b) secreção de IL-2, que pode se ligar aos receptores presentes nos linfócitos T CD8+ adjacentes, induzindo sua ativação, sem a necessidade de moléculas de co-estimulação.

O DM1 desenvolve-se lentamente e as anormalidades nas funções das células  $\beta$  progressivamente anunciam o que aparenta ser um inesperado desenvolvimento de hiperglicemia. O aumento de HbA1c em relação aos níveis normais (Stene et al., 2006), diminuição do apetite ou da tolerância à glicose, assim como a perda da secreção de insulina de primeira fase, usualmente precedem o diabetes evidente. A exata massa de células  $\beta$  remanescente no momento do diagnóstico é pobremente definido e quase não existem estudos de insulite antes do aparecimento do diabetes (Gianani et al., 2006). Para pacientes com DM1 permanente, existem evidências de

que algumas funções das células  $\beta$  permanecem (por exemplo a secreção de peptídeo C), embora a massa de células  $\beta$  comumente esteja diminuída para menos de 1% do normal (Meier et al., 2005). Atualmente, estudos para quantificar a massa de células  $\beta$  e insulite estão somente começando a ser desenvolvidos. Em particular, estudos de tomografia computadorizada com emissão de pósitrons, usando uma amina marcada (dihydrotetrabenazine) pode prover o primeiro método de análise de células  $\beta$  (Souza et al., 2006), sendo que esta técnica está começando a ser aplicada em humanos. Outra série de métodos está sendo usada para analisar insulite (Turvey et al., 2005).

Existem fortes evidências indicando que o desenvolvimento do DM1 é determinado pelo balanço entre os linfócitos T patogênicos e reguladores (Mordes et al., 2004; Chatenoud et al., 2005). Uma questão fundamental é se existem auto-antígenos primários para auto-reatividade inicial de células T, com subsequente reconhecimento de múltiplos antígenos de ilhotas. Um grande número de pesquisadores tem analisado em camundongos NOD, que espontaneamente desenvolvem o DM1, a importância da imunoreatividade à insulina, com a dramática descoberta de que eliminando-se a resposta imune à insulina, bloqueia-se o desenvolvimento do diabetes e a insulite, e ainda mais, impressionante, a resposta auto-imune a outros auto-antígenos como IGRP (*Islet-specific Glucose-6-phosphatase-Related Protein*) (Krishnamurthy et al., 2006). Silenciando os genes da insulina (camundongos possuem dois genes para insulina, ao contrário dos humanos que possuem apenas 1) com a introdução de uma insulina mutada, com a troca por alanina na posição 16 no lugar de uma tirosina na cadeia B da insulina, previne-se o desenvolvimento do diabetes (Nakayama et al., 2005). O reconhecimento dessa cadeia B do peptídeo de insulina por linfócitos T depende de um receptor de célula T “não-estringente”, com

conservação apenas da seqüência da cadeia  $\alpha$  e não da região N da cadeia  $\alpha$  ou da cadeia  $\beta$  (Homann et al., 2006).

Um estudo recente do linfonodo pancreático de dois pacientes com DM1 encontrou um receptor conservado de células T, com células T reagindo com peptídeos da cadeia  $\alpha$  de insulina (aminoácidos 1-15) (Kent et al., 2005).

#### 1.1.1.1.2. Herança “Monogênica” do DM

Uma simples mutação do gene foxP3 (*forkhead box P3*), um fator de transcrição que controla o desenvolvimento de células T regulatórias, é a causa do diabetes neonatal (Wildin et al., 2005). Esta síndrome é conhecida como IPEX (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*). Como já explicitado, crianças que sofrem desta desordem, sofrem de uma auto-imunidade avassaladora e comumente não ultrapassam a infância. Transplantes de medula óssea podem reverter a doença. Como diferencial no diagnóstico de diabetes neonatal, deve ser reconhecido que metade das crianças que desenvolvem o diabetes neonatal permanente tem uma mutação na molécula do receptor de sulfoniluréia, Kir6.2. Estas crianças com suas formas auto-ímmunes de diabetes, podem ser tratadas com terapia oral de sulfoniluréia.

Embora mais comum que a síndrome de IPEX, a síndrome de APS-1 (*Autoimmune Polyendocrine Syndrome type 1*) também é rara. Ela resulta da mutação do gene AIRE (*Autoimmune Regulator*), outro fator de transcrição (Su et al., 2004). Aproximadamente 15% dos pacientes com esta síndrome desenvolvem diabetes auto-ímmune. A principal hipótese é que AIRE controla a expressão de auto-antígenos e seleciona negativamente a auto-reatividade de linfócitos T no timo. Uma descoberta dramática muito recente é a demonstração de que essencialmente 100% dos pacientes com APS-1 tem anticorpos reagindo com interferon  $\alpha$  e outros

interferons (Eisenbarth, 2007). Estes anticorpos são extremamente raros e essencialmente não são encontrados em pacientes com DM1.

Pacientes com DM1 e seus parentes possuem risco de desenvolver auto-imunidade da tireóide, doença de Addison, anemia perniciosa e uma série de outras doenças auto-imunes (Barker et al., 2005). Aproximadamente 1 em 20 pacientes com DM1 tem doença “celiac”, detectada por biópsia, embora a maioria não possua sintomas (Hoffenberg et al., 2004). Estes pacientes assintomáticos são usualmente identificados pelos anticorpos anti-transglutaminases.

#### 1.1.1.1.3. Herança Oligo/Poligênica do DM1

O DM1 tornou-se uma das doenças poligênicas mais intensamente estudadas. As mais fortes associações com suscetibilidade e proteção do DM1 são com as moléculas de HLA DR e DQ. Os alelos DQB1\*0602 são associados com proteção dominante, e DR3-DQ2 (DQB1\*0201) e DR4-DQ8 (DQB1\*0302) são associados com suscetibilidade. O risco absoluto de uma criança, de uma população qualquer, desenvolver o DM 1 é similar à primeira geração de pais de um paciente com DM1 (cerca de 1 em 20).

Muitos outros genes podem ser implicados na contribuição da suscetibilidade ao DM1, especialmente porque a análise completa do genoma está começando a ser aplicada à análise do risco de aparecimento do DM1 (CTLA4 [*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*], IFIH1 [*Interferon Induced with Helicase C domain 1*], ITPR3 [*Inositol 1,4,5-Triphosphate Receptor 3*], IL-2R, PTPN22 [*Protein Tyrosine Phosphatase, Nonreceptor type 22*]).

#### 1.1.1.1.4. Influência de Fatores Ambientais no Aparecimento do DM1

O aumento da incidência do DM1 sugere fortemente que fatores ambientais são importantes. A principal hipótese é que este aumento pode ser atribuído à ausência de infecções infantis (Bach, 2002). Os maiores fatores ambientais perseguidos incluem a dieta (leite bovino, cereais, insulina no leite, deficiência de vitamina D ou de ácidos graxos ômega 3) e alguns vírus.

#### 1.1.1.1.5. Predição do Aparecimento do DM1

Já é possível prever com um razoável grau de exatidão o desenvolvimento do DM1. Embora os linfócitos T sejam previsivelmente causativos, anticorpos anti-ilhotas predizem a progressão da doença. Ensaio para reatividade de linfócitos T estão melhorando, especialmente ensaios para linfócitos T CD8 (Ouyang et al., 2006), mas somente ensaios para linfócitos T não são suficientes para validar a predição da doença.

Uma regra simples é que a expressão de pelo menos 2 de 3 auto-anticorpos de ilhotas seja altamente preditiva na progressão do DM1 (Achenbach et al., 2006). Isto é verdade para parentes de pacientes com DM1 e da população em geral. A identificação de alto risco de progressão do DM1 em estudos já iniciados, leva ao diagnóstico precoce e ausência de hospitalização e geralmente uma ceto-acidose tratável (Barker et al., 2004).

#### 1.1.1.1.6. Imunossupressão e Imunoregulação do DM1

As diversas terapias que estão sendo testadas para prevenir a destruição auto-imune das células  $\beta$  podem ser divididas em imunossupressivas e imunoregulatórias, com algumas terapias combinando características de ambas (Voltarelli et al., 2007).

Estudos com anticorpos monoclonais anti-CD3 na progressão do DM1, encontraram uma preservação significativa da secreção de peptídeo C por pelo menos 1 ano (Herold et al., 2005; Keymeulen et al., 2005). Os anticorpos monoclonais anti-CD3 foram modificados para reduzir a liberação aguda de citocinas, mas haviam evidências de uma ativação transitória de uma infecção por Epstein-Barr. Há evidências consideráveis de que a terapia com anti-CD3 não é simplesmente imunossupressiva, mas induz mudanças tardias nas razões entre linfócitos CD4/CD8 e células regulatórias (Bisikirska et al., 2005). As principais questões que permanecem são quanto a duração do efeito terapêutico, se alguns indivíduos terão uma remissão prolongada na destruição das células  $\beta$ , e a segurança, quando um grande número de indivíduos são tratados. Rituximab, um anticorpo anti-célula B que é efetivo em um grande número de desordens auto-imunes, está sendo usado também.

Extensos estudos com administração de Nicotinamida, injeções de insulina e insulina via oral, não demonstraram eficácia na imunoregulação. A maioria das terapias imunoreguladoras que aparecem em modelos animais, agem induzindo linfócitos T reguladores (Lan et al., 2005). Terapias celulares diretas também podem prevenir a doença (Mukherjee et al., 2003; Bresson et al., 2006; Du et al., 2006; Fife et al., 2006).

#### **1.1.1.2. Diabetes mellitus tipo II (DM2)**

No DM2, que é a patologia mais comum, respondendo por 80 a 90% dos casos, os pacientes apresentam graus variáveis de resistência à insulina, associados a uma deficiência relativa ou absoluta na produção deste hormônio. Em relação ao tratamento do DM tipo 2, o estudo mais importante nesta linha é o United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) que analisou se o controle rigoroso da hiperglicemia (UKPDS, 1998; UKPDS, 1998a) e da hipertensão arterial (UKPDS, 1998b) era capaz

de reduzir as complicações do DM2 e a mortalidade. A hipertensão arterial é cerca de duas vezes mais freqüente entre os indivíduos diabéticos quando comparados à população geral (HDS, 1993). Estudo recente demonstrou que a adoção de diversas medidas de tratamento, dirigidas a vários fatores de risco cardiovascular, reduziu significativamente a evolução de complicações microangiopáticas (Gaede et al., 1999). A dislipidemia é um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular em pacientes diabéticos, cuja influência é maior que os demais (Lehto et al., 1997). As alterações lipídicas mais freqüentes na população diabética são a hipertrigliceridemia, HDL-colesterol (HDL-c) baixo e alterações qualitativas nas lipoproteínas, tais como a formação de partículas de LDL-colesterol (LDL-c) pequenas e densas. O LDL-c denso é mais freqüente na circulação quanto mais elevados forem os níveis de triglicérides, sendo mais aterogênico do que as demais partículas lipídicas que são maiores e menos densas.

O DM2 representa a patologia mais complexa, sendo a doença metabólica degenerativa mais prevalente no mundo, afetando 95% dos pacientes diabéticos, em comparação com 5% de pacientes do tipo 1. A doença ocorre principalmente em adultos e está fortemente relacionada com predisposição, componentes inflamatórios e determinações ambientais, como obesidade, hábitos alimentares inadequados e pouca prática de exercícios (Zimmet et al., 2001; Kolb et al., 2005). Atualmente admite-se que adultos desenvolvem o DM1 tanto quanto crianças, havendo um debate de como classificar os adultos com manifestações clínicas do DM2 que expressam anticorpos anti-ilhotas (mais comumente auto-anticorpos GAD65). Vários nomes foram dados à este subgrupo, como diabetes LADA (*Latent Autoimmune Diabetes of the Adult*) mas, este grupo tem alelos de antígenos de leucocitários humanos (HLA) associados com DM1, e estes pacientes tem uma perda acelerada da secreção de peptídeo C

(Gale, 2005). Existem evidências que alguns pacientes possuem resistência à insulina assim como auto-imunidade à ilhotas, e não existem razões para se acreditar que o diabetes tipo 1 e o tipo 2 possam co-existir. Os genes que controlam o desenvolvimento do DM1 não aumentam o risco do DM2, e o maior polimorfismo do DM2 (*TCF7L2-transcription factor 7-like 2*) não está associado ao risco do DM1. Ao contrário do DM1, a progressão da doença pode ser demorada e até mesmo evitada, corrigindo-se os hábitos alimentares e aumentando a atividade física diária.

#### 1.1.1.2.1. Fisiopatologia do DM2

O DM2 consiste de dois componentes principais, ou seja: resistência dos tecidos periféricos à insulina e disfunção das células  $\beta$  pancreáticas, ambos resultando no desequilíbrio da necessidade de insulina (Bell et al., 2001; Saltiel, 2001).

Insulina favorece a remoção de glicose da circulação pelos tecidos periféricos que têm receptores de insulina, como músculo e tecido adiposo. Embora a insulina não aumente a captação de glicose no fígado, este hormônio regula muitas funções metabólicas neste órgão, como estimular a síntese de glicogênio e inibir a gliconeogênese, controlando a glicemia (Saltiel et al., 2001). O músculo esquelético é responsável pela mobilização de 75% da glicose disponível, através da translocação do transportador de glicose dependente de insulina, GLUT 4, de vesículas intracelulares à membrana. O tecido adiposo também participa desta retirada de glicose da circulação, induzida por insulina, embora este hormônio também esteja regulando outras funções como a indução da lipogênese e inibição da lipólise. Tanto a obesidade quanto a lipoatrofia podem predispor ao DM2, sugerindo que o tecido adiposo, através de sua habilidade de estocar

gordura, tem um papel chave no controle do metabolismo (Flier, 2004; Havel, 2004).

A hiperinsulinemia ocorre como consequência da resistência à insulina, que provoca uma resposta compensatória, por parte das células  $\beta$  para restaurar a normoglicemia. No entanto, vários estudos sugerem a hiperinsulinemia como a causa da resistência à insulina. Até o momento, nenhum estudo estabeleceu qual fenômeno ocorre primeiro no desenvolvimento do DM2. Esta contradição pode ser explicada porque tanto a resistência à insulina quanto a hiperinsulinemia ocorrem rapidamente e podem ser descritas como respostas adaptativas no lugar de uma disfunção para manter a correta homeostase da glicose e preservar a função cerebral. Além do mais, se a demanda energética está em excesso, ou se o gasto calórico por parte do corpo é deficiente, o organismo ativa diferentes mecanismos compensatórios, que incluem a resistência à insulina e a hiperinsulinemia. Neste contexto, a obesidade e a hiperlipidemia também podem ser consideradas mecanismos de compensação metabólica. Associando-se, ainda, a hiperglicemia pós-prandial, esta situação favorece a resistência muscular e adiposa à insulina e a subsequente gliconeogênese hepática (Prentki et al., 2002).

Por outro lado, a exposição prolongada ao excesso de nutrientes também pode afetar a função das células  $\beta$  pancreáticas, afetando tanto vias de transdução de sinal quanto a expressão de alguns genes. Isto pode levar aos efeitos de longo prazo, caracterizados pela secreção desregulada de insulina, disfunção das células  $\beta$  e perda de massa de tecido endócrino pancreático, mediado por processos apoptóticos. O ponto em que a célula  $\beta$  falha em adaptar-se à nova situação representada pela obesidade, revela o início do DM2. A concentração elevada de nutrientes, principalmente glicose e ácidos graxos, possui um papel instrumental na progressão da disfunção das células  $\beta$ , ativando a apoptose e levando à morte celular e

ausência de insulina (Piro et al., 2002; Maestre et al., 2003; Biden et al., 2004). Isto é conhecido como a hipótese da glicolipototoxicidade, indicando que ao final, o DM2, assim como o DM1, têm uma redução significativa de massa de células beta.

### ***1.1.2. Terapias do Diabetes mellitus***

A cura do DM ainda é um sonho. Apesar dos enormes esforços destinados para tal, os maiores sucessos ainda estão no tratamento e não na cura desta doença, que aflige mais de 18 milhões de pacientes só nos EUA. As terapias atuais para o tratamento do DM podem ser classificadas em cinco classes: (1) Aumento do Controle Metabólico, (2) Monitores de Glicose, (3) Insulinoterapia (4) Transplante de Pâncreas (órgão total) ou Ilhotas Pancreáticas, e (5) Neogênese *in vitro* de Ilhotas.

#### **1.1.2.1. Aumento do Controle Metabólico**

Uma série de insulinas humanas modificadas que alteram a dinâmica de absorção após a injeção, são modelos padrões nos cuidados clínicos, em particular, regimes combinando insulinas de ação longa com insulinas de ação rápida. Recentemente, a insulina inalável tornou-se clinicamente disponível (absorção rápida) com recomendações para adultos apenas (Gale, 2005).

#### **1.1.2.2. Monitores de Glicose**

Uma série de dispositivos estão disponíveis para a medida contínua da glicose sanguínea, incluindo dispositivos que combinam uma bomba de insulina com um monitor de glicose (Bui et al., 2005; Yates et al., 2006). Um estudo recente indicou que a melhora na manutenção da glicemia pode ser alcançada por pacientes com HbA1c muito elevada, quando estes

pacientes possuem conhecimento dos seus níveis de glicose (Garg et al., 2006).

### **1.1.2.3. Insulinoterapia**

A injeção de insulina exógena não é uma cura para o DM, pois não mimetiza exatamente a função das células  $\beta$ . Do ponto de vista fisiológico, a restauração das funções da célula  $\beta$  tanto por transplante quanto por regeneração do tecido pancreático, pode ser a melhor opção terapêutica. A terapêutica convencional com reposição de insulina exógena impõe ao paciente a dependência crônica do tratamento. Além disso, a manutenção de níveis glicêmicos próximos ao da normalidade requer uma terapia intensiva com múltiplas aplicações diárias, ou bomba de insulina de uso externo, aumentando significativamente o risco de episódios de hipoglicemia severa. Por este motivo, requer monitorização freqüente da glicemia, tornando ainda mais difícil a aderência do paciente ao tratamento (DCCT, 1994).

### **1.1.2.4. Transplante de Pâncreas versus Transplante de Ilhotas**

A ocorrência de morte das células  $\beta$  no DM1 e DM2, sugere que estas patologias indubitavelmente se beneficiarão de protocolos de transplante, objetivando restaurar a função endócrina do organismo. Transplantes de pâncreas alogênicos vêm sendo realizados, na maioria das vezes associado ao transplante renal, com bons resultados (sucesso superior a 85% no primeiro ano) (Sutherland et al., 2001). O clássico transplante conjunto de pâncreas e rim apresenta muitos problemas relacionados com a sobrevivência do órgão e a rejeição imune.

No transplante duplo de pâncreas e rim, há a necessidade de procedimento cirúrgico de grande porte, sob anestesia geral e longo período

de hospitalização do paciente. O transplante de ilhotas é menos invasivo, requerendo anestesia local e um curto período de hospitalização, minimizando custos com procedimentos hospitalares. Apesar de também requerer terapia imunossupressora para evitar a rejeição do enxerto, o transplante de ilhotas pode ser uma alternativa ao transplante de pâncreas, e apresenta a vantagem de não precisar de procedimento cirúrgico de grande porte, podendo ser feito através de uma cânula introduzida na veia porta do paciente, em procedimento guiado por ultra-sonografia.

O transplante de ilhotas pancreáticas humanas teve um grande impulso a partir de 1988, com o desenvolvimento de uma técnica automatizada para o isolamento das ilhotas (Ricordi et al., 1988). As ilhotas pancreáticas formam o chamado pâncreas endócrino, sendo compostas pelas células  $\beta$  produtoras de insulina e pelas células  $\alpha$  (produtoras de glucagon),  $\delta$  (somatostatina) e PP (polipeptídeo pancreático), além de células endoteliais e fibroblastos. As células  $\beta$  constituem entre 60-80% do total de células de uma ilhota.

Mais recentemente, o protocolo de Edmonton estabeleceu os fatores mais importantes para a reposição de massa endócrina para tratamento do DM (Shapiro et al., 2000). A melhor escolha do regime de imunossupressores (sirolimus, baixas doses de tacrolimus e daclizumab) foi o protocolo experimental utilizado pelo grupo do Canadá, evitando a rejeição do enxerto e melhorando a sobrevivência do implante. Estudos anteriores já mostravam que a combinação de sirolimus e tacrolimus apresentava baixas taxas de rejeição em transplantes de fígado, rim, e pâncreas órgão total (McAlister et al., 2000). Ambos compostos bloqueiam a ativação de linfócitos T. Daclizumab é um anticorpo monoclonal contra o receptor de IL-2, permitindo a supressão da administração de glicocorticóides em pacientes, os quais são muito tóxicos para as ilhotas. O

resultado da combinação destes imunossupressores é a prevenção da ativação da resposta imune e da expansão clonal de linfócitos T.

Outro fator chave no protocolo de Edmonton ([Shapiro et al., 2000](#)) implica no transplante de um número adequado de ilhotas. As ilhotas representam somente 1% do pâncreas total e um pâncreas adulto possui cerca de um milhão de ilhotas. A experiência do grupo de Edmonton mostrou que são necessárias cerca de 12 mil IEQs (Islets Equivalents) por quilo de paciente, de ilhotas recém isoladas, para a independência de insulina, um número muito próximo da situação fisiológica normal. Considerando-se que o isolamento de ilhotas de doadores cadavéricos rende apenas 50% (ou menos) do número total de ilhotas, são necessários pelo menos dois doadores para cada receptor.

Apesar de alguns grupos relatarem casos de insulino-independência após isolamento e transplante de ilhotas obtidas a partir de um único doador, na maioria dos casos, geralmente ainda são necessários de 2 a 4 isolamentos/transplantes por paciente, uma vez que o rendimento do isolamento é da ordem de 20-40%. Além disto, mesmo que as técnicas de isolamento das ilhotas sejam aperfeiçoadas e se torne possível atingir níveis glicêmicos adequados após um único transplante, dificilmente a oferta de pâncreas de doadores será suficiente caso o transplante de ilhotas venha a se tornar uma terapia indicada para um número maior de pacientes diabéticos. Como a incidência de DM do tipo I é em torno de 30.000 novos casos por ano e a oferta de pâncreas de doadores, de apenas 3.000 (dados referentes aos EUA), a defasagem fica evidente ([Bonner-Weir et al., 2000](#)).

O grupo do Canadá mostrou que após um ano do implante, os sete pacientes que foram submetidos a este protocolo experimental, não precisavam mais de insulina e apresentavam níveis normais de glicose ([Shapiro et al., 2000](#)). Recentemente, descreveram atualização dos dados dos pacientes transplantados após cinco anos do procedimento, e apesar do

índice de sucesso cair para cerca de 50% após 3 anos e 7,5% após 5 anos (Ryan et al., 2005), este protocolo vem sendo testado por outros 10 centros mundiais para avaliar sua aplicabilidade mais ampla. Até 2004, foram estudados 86 pacientes, que receberam 156 infusões (Collaborative Islet Transplant Registry, Annual Report – Julho, 2004 - <http://spitfire.emmes.com/study/isl/reports>). São muitas as causas desta falha, mas estão relacionadas, principalmente, com os efeitos colaterais da terapia imunossupressora, tratamento contra hipertensão, trombose na veia porta e sangramento (Ryan et al., 2005). Entretanto, permitiu que o transplante de ilhotas durante estes cinco anos os pacientes tivessem uma qualidade de vida aceitável sem progressão das complicações secundárias relacionadas com o DM.

O principal problema do protocolo de Edmonton, assim como em qualquer protocolo de transplante, é a qualidade dos pâncreas de doadores, limitando o uso destes protocolos a um reduzido número de pacientes. A proposta de transplantar ilhotas xenogênicas de porcos transgênicos permanece controversa, devido ao alto risco de infecção por patógenos retrovirais aos pacientes. Deste modo, são necessárias novas fontes de células para futuras estratégias de reposição (terapia) celular. Nos últimos tempos, muitos tipos de terapias, baseadas na utilização de células-tronco, vêm sendo propostos para o tratamento do DM. Uma delas é a aplicação de células-tronco para a reposição de ilhotas não-funcionais no órgão nativo, a outra é o uso de células-tronco como uma fonte inesgotável de células beta para transplante. Células-tronco embrionárias e adultas surgiram como potencialmente interessantes, merecendo maior atenção.

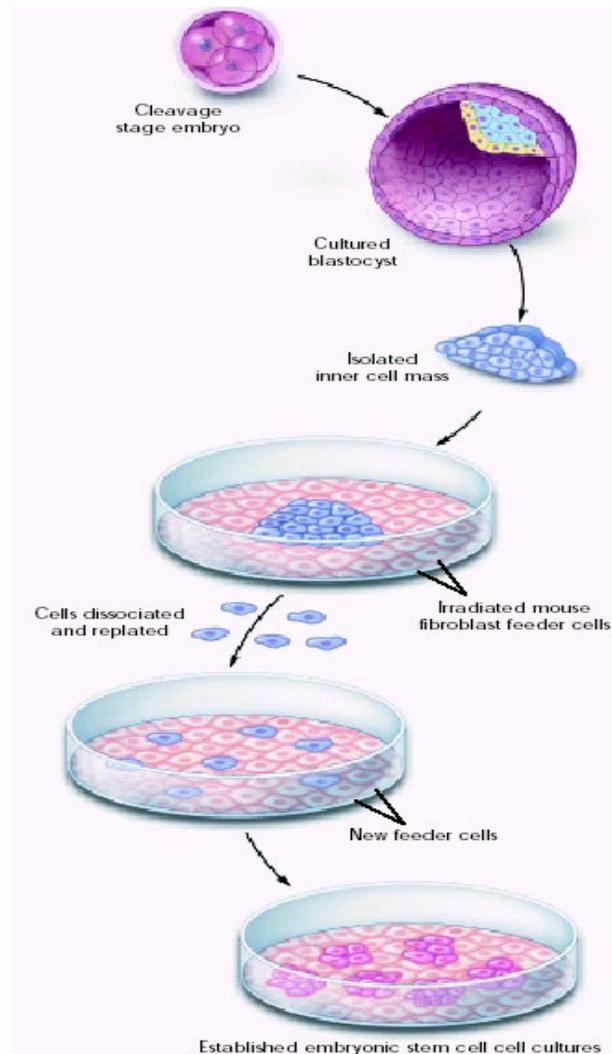
## ***1.2. Células-Tronco***

### **1.2.1. Células-Tronco Embrionárias**

O estabelecimento de culturas de linhagens celulares pluripotentes a partir de blastocistos de camundongos foi primeiramente descrito no início da década de 80. Estas linhagens demonstravam capacidade de diferenciação *in vitro* e *in vivo* (Evans et al., 1981). Desde então, melhorias substanciais vêm sendo alcançadas na manutenção destas células no estágio indiferenciado e no controle de sua diferenciação em direção a vários tipos celulares. A descoberta de métodos para isolar e cultivar células-tronco embrionárias humanas, em 1998, por James Thomson (Thomson et al., 1998), renovou as esperanças de médicos, pesquisadores e pacientes e suas famílias de cura para doenças degenerativas de origem genética ou não. Em teoria, células-tronco embrionárias podem ser cultivadas e tratadas para se diferenciarem em qualquer tecido/célula do corpo, até mesmo em células beta-pancreáticas produtoras de insulina. Em resposta a estímulos extracelulares apropriados, células-tronco possuem o potencial de auto-renovação através de divisões simétricas e diferenciação em linhagens celulares específicas através de divisões assimétricas.

As linhagens de células-tronco embrionárias (Embryonic Stem Cells - ESCs) são derivadas da massa interna do blastocisto, uma estrutura que aparece durante o desenvolvimento embrionário humano, ao redor do sexto dia após a fecundação. Todos os tecidos do organismo adulto, incluindo a linhagem germinativa, derivam deste grupo de células e, por esta razão, são chamadas de células-tronco totipotentes. ESCs de camundongos podem ser mantidas indiferenciadas em cultura sob a ação de LIF (Leukemia inhibitory factor), ou semeadas sobre camadas alimentadoras (*Feeders*) de fibroblastos murinos embrionários inativados (Smith, 2001) (figura 1). O

uso de meio condicionado de fibroblastos embrionários murinos para cultivar ESCs humanas não diminui o risco de uma potencial infecção por patógenos animais. Para contornar este problema, foi verificado que o uso de culturas *Feeders* de fibroblastos humanos embrionários ou adultos podia prover uma condição ótima de crescimento para ESCs humanas (Richards et al., 2002).



**Figura 1:** Origem das células-tronco embrionárias.

A auto-renovação de células-tronco embrionárias requer a ligação de LIF (Leukemia Inhibitory Factor) a um receptor duplo, consistindo de um

receptor de LIF e um receptor de gp130. A ativação deste receptor dispara a via de proliferação de JAK/STAT3. A ativação de ERK pela gp130 e outros receptores, contrabalança os efeitos de LIF-STAT3 na proliferação de células-tronco embrionárias (Burdon et al., 1999). Aparentemente, para as células-tronco embrionárias proliferarem, os efeitos de várias vias de sinalização devem ser balanceados. Neste contexto, é relevante considerar que a expressão de fatores de transcrição como OCT-3/4 (um fator de transcrição da família POU, inicialmente identificado em células de carcinoma embrionário) e NANOG (um fator de transcrição *homeobox* que tem um papel crucial na especificação celular logo após a formação do blastocisto), são necessários para manter a pluripotência de células embrionárias tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e podem ser considerados como reguladores mestres na pluripotência destas células.

Sob condições apropriadas *in vitro*, ESCs podem dar origem a linhagens celulares diferenciadas da ectoderme, mesoderme e endoderme. Para tanto, ESCs são crescidas em suspensão, na ausência de LIF, formando agregados celulares típicos, conhecidos como corpos embrioides (*Embryo bodies-EBs*).

Nos Estados Unidos, é proibido o uso de embriões humanos em pesquisas financiadas pelo governo, mesmo aqueles descartados em clínicas de reprodução assistida. Essa posição é repudiada pela comunidade científica, que em 1999 se manifestou formalmente através de uma carta publicada na revista *Science* assinada por 67 cientistas premiados com o Nobel. Por outro lado, são permitidas pesquisas com células ES estabelecidas antes da proibição ou através de financiamento privado ou, ainda, estabelecidas em outros países. O National Institute of Health (NIH) criou várias linhas de financiamento das pesquisas com células ES, o que reflete a importância dos estudos com esse tipo de células.

No Brasil, o projeto da nova Lei de Biossegurança, aprovado pela Câmara dos Deputados na madrugada do dia 5 junho de 2004, proíbe “a produção de embriões humanos destinados a servir como material biológico disponível”. Por outro lado, permite a “clonagem terapêutica com células pluripotentes”, o que é uma grande contradição, já que a clonagem terapêutica, necessariamente, envolve “a produção de embriões humanos destinados a servir como material biológico disponível”.

Devido a estes e outros entraves legais ou éticos, as células-tronco adultas, vêm sendo consideradas as mais promissoras, por serem as mais facilmente obtidas e por guardarem um potencial de diferenciação ainda desconhecido.

### **1.2.2. Células-Tronco Adultas**

Paralelamente ao estudo das células-tronco pluripotentes de embriões, o estudo de células-tronco adultas foi emergindo, visando seu uso clínico e terapêutico. A célula-tronco adulta é uma célula indiferenciada que é encontrada em um tecido diferenciado (especializado), podendo originar as células do tecido de origem e garantir sua auto-renovação. Recentemente, foi descrito que células-tronco adultas de um tecido também são capazes de se desenvolver em tipos celulares característicos de outros tecidos (transdiferenciação). No entanto, ainda não se sabe se estas células-tronco adultas possuem potencial equivalente ao de uma célula-tronco embrionária de gerar células e tecidos. A única coisa que se pode afirmar é que ambas as células são potencialmente úteis no desenvolvimento de terapias para o tratamento de doenças degenerativas.

Células-tronco adultas também já foram identificadas em tecido cerebral (Cicolini, 2001), sangue periférico (Herbein et al., 1994), vasos sanguíneos (Pelosi et al., 2002), músculo esquelético (Qu-Petersen et al., 2002), pele (Toma et al., 2001), sistema digestivo (Brittan et al., 2004),

tecido adiposo (Zuk et al., 2001), retina (Fine et al., 2003), polpa dentária (Miura et al., 2003), fígado (Strain et al., 2000), pâncreas (Zulewski et al., 2001) e líquido amniótico (Prusa et al., 2003). Apesar desta distribuição variada, células-tronco adultas são raras e comumente difíceis de identificar, isolar e purificar. Os atuais métodos para caracterizar células-tronco adultas dependem da determinação de marcadores de superfície celular e de observações sobre seu padrão de diferenciação em placas de cultura.

Durante as últimas quatro décadas, vários estudos têm identificado que o pâncreas contém um “pool” de células progenitoras, que possuem o potencial de diferenciação restrito a algumas linhagens, sendo capazes de se desenvolver no fenótipo pancreático. Existem dados sugerindo que o ducto pancreático de humanos e roedores, o tecido exócrino acinar e as próprias ilhotas, possuem células precursoras que podem ser diferenciadas em células  $\beta$ . Deste modo, parece que há regeneração do tecido pancreático, mas ainda não está claro se é através de replicação das células já existentes ou através de neogênese. Além disso, até o momento ainda não está clara a identidade da possível célula progenitora das células  $\beta$ , ou mesmo se de fato ela existe. Se por um lado, estudos genéticos recentes indicam que em camundongos adultos a replicação de células  $\beta$  pré-existentes é a via dominante para a formação de novas células  $\beta$  (Dor et al., 2004), por outro, estudos ainda mais recentes (Bonner-Weir et al., 2005) mostram o isolamento clonal de uma população de células precursoras multipotentes do pâncreas de camundongos adultos, as quais se originariam do ducto e das ilhotas.

O grande exemplo de células-tronco adultas são as células-tronco da medula óssea, que durante muito tempo foram utilizadas apenas no tratamento de diversos tipos de leucemias. Hoje, no entanto, já são utilizadas até mesmo no tratamento de cardiomiopatias resultantes de

lesões isquêmicas crônicas (Perin et al., 2003) e lesões na coluna espinhal, protocolos estes, que ainda em estão caráter experimental.

De fato, na medula óssea, residem mais de um tipo de células-tronco. As chamadas Células Progenitoras Hematopoiéticas (CPHs), responsáveis pela geração de todos os tipos celulares de tecidos hematopoiéticos e um tipo de progenitora recém descoberto (Conget et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Colter et al., 2000; Minguell et al., 2000; Minguell et al., 2001), chamado de célula-tronco progenitora mesenquimal, que é capaz de se diferenciar em tecidos osteogênicos, condrogênicos e adipogênicos *in vitro*. Este tipo celular, com características de crescimento fibroblastóide, já foi encontrado em outros tecidos adultos como a parede de cordões umbilicais, sangue de cordão e até mesmo sangue periférico, tendo sido descrito como um tipo celular extremamente raro, mas com potencial de diferenciação em células de todos os folhetos embrionários (Jiang et al., 2002; Covas et al., 2003; Romanov et al., 2003; Wexler et al., 2003). Estas células normalmente são recrutadas para repovoamento tissular após injúria e/ou angiogênese de vários órgãos (Weimann et al., 2003), inclusive pâncreas (Mathews et al., 2004).

#### 1.2.2.1. O uso terapêutico de células-tronco adultas

O Transplante Alogênico de células-tronco de origem hematopoiética tornou-se o tratamento padrão de um sem número de desordens. No entanto, nem todos os potenciais pacientes que se beneficiariam podem submeter-se a este tipo de transplante, pois somente 50-60% dos pacientes possuem compatibilidade de HLA com doadores não aparentados. Embora existam mais de 7 milhões de doadores voluntários adultos cadastrados mundialmente, um terço dos pacientes ainda não encontraram um doador compatível. Se o paciente pertencer a uma minoria étnica, a probabilidade de não se encontrar um doador compatível, aumenta

ainda mais. Mesmo para aqueles que conseguem encontrar um doador, o transplante pode ser complicado ainda devido pela doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD - *Graft Versus Host Disease*) e por infecções oportunistas, que aumentam a mortalidade e morbidade do transplante.

Durante a última década, o sangue do cordão umbilical (UCB - Umbilical Cord Blood) foi estabelecido como uma fonte alternativa de células-tronco hematopoiéticas (HSC - Hematopoietic Stem Cells) para transplante tanto adulto quanto pediátrico, e os riscos e benefícios do sangue de cordão umbilical tornaram-se claros. Comparado com sangue periférico adulto (PBMSC - Peripheral Blood Mononuclear Stem Cells) e medula óssea, o sangue de cordão umbilical está enriquecido com células progenitoras hematopoiéticas. A coleta do sangue de cordão umbilical após o nascimento, não acarreta riscos ao doador e o sangue coletado pode ser criopreservado e armazenado em bancos de cordão por longos períodos. As amostras de sangue de cordão umbilical são analisadas para HLA, testadas para agentes infecciosos, e estocadas. Estas amostras podem ser imediatamente disponibilizadas e podem ser enviadas para qualquer centro transplantador no Mundo, com relativa facilidade. O transplante de sangue de cordão umbilical está associado com uma baixa incidência de GVHD, sendo que uma compatibilidade parcial de HLA entre o doador e o receptor é tolerada.

No Brasil, são realizados cerca de 2,5 transplantes alogênicos por milhão de habitantes/ano, contra médias internacionais de 6,5 a 10 transplantes por milhão de habitantes/ano. A disponibilidade de doadores adequados aparece como uma das principais limitações para transplante de medula óssea no país: nas condições brasileiras, os familiares dos pacientes constituem na quase totalidade dos casos, a única fonte para encontrar doadores geneticamente compatíveis.

As alternativas existentes para a obtenção de células alogênicas compatíveis para transplante são os bancos de medula e os de sangue de corda umbilical. Os registros internacionais de doadores de medula óssea, com grande representação de caucasianos, não refletem a composição genética da população brasileira. Além disso, o custo da busca e obtenção de células nesses registros é muito alto (US\$ 40.000/transplante). O emprego de células progenitoras hematopoiéticas obtidas a partir de sangue de cordão umbilical apresenta diversas vantagens em relação ao uso de medula óssea, entre elas: disponibilidade quase ilimitada de doadores, aproveitamento de material biológico usualmente descartado, criopreservação de todas as amostras coletadas que sejam adequadas para transplante, boa capacidade proliferativa das células e, muito importante, menor grau de reatividade imunológica, permitindo maior grau de incompatibilidade genética entre doador e receptor.

Pesquisas recentes têm aberto perspectivas para novas e importantes aplicações terapêuticas das células-tronco hematopoiéticas, além da reconstituição hematopoiética (Weissman, 2000). Através da transdução com certos vetores retrovirais, as células-tronco hematopoiéticas, têm sido empregadas em terapia gênica experimental. Resultados significativos foram obtidos, por exemplo, na correção de deficiências genéticas e adquiridas do sistema imunológico, como a doença granulomatosa crônica (Grez et al., 2000) e a AIDS pediátrica (Bauer et al., 2000). Por outro lado, células progenitoras mesenquimais foram isoladas de sangue de cordão umbilical e parede de cordão umbilical (Romanov et al., 2003) e seu potencial na reconstituição de tecidos tais como os tecidos muscular, nervoso e ósseo, esta sendo investigados (Erices et al., 2000; Huss, 2000; Secco et al., 2008). O possível emprego das células progenitoras derivadas de sangue de cordão umbilical para reconstituição de tecidos seria uma alternativa à manipulação de células humanas embrionárias, fetais e

germinativas para esta finalidade, o que presentemente é alvo de intensa controvérsia devido a implicações éticas e legais (Lenoir, 2000).

#### 1.2.2.2. Biologia das células-tronco hematopoiéticas e a reconstituição hematopoiética

As células-tronco hematopoiéticas possuem duas características básicas: capacidade de diferenciação em todas as linhagens hematopoiéticas e capacidade de manutenção da hematopoiese ao longo da vida, através de um processo de auto-renovação (Domen et al., 1999). Estas características permitem sua utilização na reconstituição hematopoiética, após terapia mieloablativa, de pacientes com diferentes condições patológicas. Desta forma, o transplante de medula óssea foi a primeira utilização terapêutica das células-tronco hematopoiéticas.

Além da medula óssea, onde constituem 0,05 a 0,5% de todas as células, as células-tronco hematopoiéticas são encontradas também na circulação periférica ( $4,3 \times 10^3/\text{ml}$ ) e no sangue de cordão umbilical ( $38 \times 10^3/\text{ml}$ ). As células-tronco hematopoiéticas encontradas na medula óssea podem ser mobilizadas para o sangue periférico através do uso de citocinas, segundo diferentes protocolos. Nessas condições, a concentração de células-tronco hematopoiéticas no sangue periférico aumenta cerca de 30 vezes, atingindo valores médios de  $115 \times 10^3/\text{ml}$  (DiPersio et al., 2000). Tanto as CPHs mobilizadas quanto as provenientes do sangue de cordão umbilical reconstituem a hematopoiese de pacientes submetidos à terapia mieloablativa e são, portanto, fontes alternativas para o transplante alogênico.

Ainda não se conhece uma característica fenotípica capaz de identificar e diferenciar inequivocadamente todas as células-tronco hematopoiéticas, as células progenitoras hematopoiéticas e as células progenitoras mesenquimais (Bianco et al., 2000). No entanto, existem

antígenos de superfície que, em conjunto, definem um padrão fenotípico para essas células: a expressão de CD34 e a ausência de CD38 e outros marcadores de linhagens Hematopoiéticas para as células progenitoras hematopoiéticas e a expressão de CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105 e ausência de marcadores de linhagem hematopoiética e de CD34 para as progenitoras mesenquimais.

A quantificação de células CD34+ na medula óssea, no sangue de cordão umbilical ou nas células mobilizadas para o sangue periférico é um importante marcador clínico relacionado à pega do enxerto. Anticorpos monoclonais contra o antígeno CD34 são comumente utilizados para a purificação e/ou enriquecimento de células progenitoras hematopoiéticas (Arseniev et al., 1999). Populações de células progenitoras hematopoiéticas enriquecidas em células CD34+ são capazes de reconstituir a hematopoiese de indivíduos submetidos à terapia mieloablativa.

Recentemente, descobriu-se que a reconstituição hematopoiética também pode ser obtida a partir de células progenitoras CD34<sup>-</sup>, as quais integram um conjunto quiescente de células progenitoras hematopoiéticas e mesenquimais (Dao et al., 2000; Jiang et al., 2002). As células CD34<sup>-</sup> podem ser expandidas *in vitro* e ter sua diferenciação dirigida tanto para hematopoiese como para a formação de outros tecidos (Huss, 2000).

Como mencionado anteriormente, as células-tronco hematopoiéticas estão presentes no sangue de cordão umbilical. A relativa facilidade de obtenção de sangue de cordão umbilical levou ao desenvolvimento de técnicas para sua utilização como fonte de células progenitoras hematopoiéticas para a reconstituição hematopoiética em pacientes que necessitam do transplante de medula.

O primeiro transplante de sangue de cordão umbilical foi realizado em outubro de 1988 (Gluckman, 2000). Esta primeira experiência bem sucedida estimulou a realização de outros transplantes. Uma revisão de 567

casos em 29 países, conduzida pelo registro europeu Eurocord, mostrou que o transplante de sangue de cordão umbilical tem resultados similares aos do transplante alogênico de medula quanto à sobrevivência dos pacientes. Mas a incidência de GVHD, crônica ou aguda foi significativamente menor, mesmo quando havia ou alguma incompatibilidade HLA ou em pacientes adultos. Portanto, como fonte de células hematopoiéticas para transplante alogênico entre indivíduos não aparentados, o sangue de cordão umbilical apresenta uma vantagem em relação à medula óssea por possuir uma menor reatividade imunológica, devido à presença de linfócitos imaturos. Esta característica facilita a utilização do sangue de cordão umbilical em transplantes, permitindo um maior grau de incompatibilidade genética (HLA) entre doador e receptor (Gluckman, 2000).

Usualmente, as amostras depositadas nos bancos de sangue de cordão umbilical são submetidas à uma tipagem inicial (pré-demanda) do HLA restrita aos *loci* A, B e DR, em baixa resolução antigênica. O teste por DNA já é obrigatório para HLA-DR, devendo, progressivamente, substituir os métodos sorológicos também para tipagem de HL-A e HLA-B (Hurley et al., 1999). Um estudo apresentado na AABB (Confer, 1998) mostrou que, para doadores e receptores caucasianos, um banco de sangue de cordão umbilical com apenas 2.000 amostras depositadas já atenderia 60% da demanda de transplantes numa condição de compatibilidade de 5 entre 6 alelos (HLA-A-B-DR).

O transplante de sangue de cordão umbilical, no entanto, tem suas limitações. Primeiro, vários registros de centros transplantadores diferentes tem mostrado que o número de células progenitoras é importante na pega e na sobrevivência do enxerto. Quanto menor a dose celular, mais pobres são os resultados. Um segundo obstáculo é a impossibilidade de se coletar do doador linfócitos ou células-tronco hematopoiéticas adicionais, no caso da

doença progredir ou a pega do enxerto falhar. Por último, há substancialmente pouca experiência com o transplante de sangue de cordão umbilical, comparado com o de medula óssea.

A experiência clínica mostrou que o transplante de sangue de cordão umbilical pode resultar num enxerto consistente e funcional. O sangue de cordão umbilical está muito bem estabelecido para o transplante pediátrico, tornando-se rapidamente como a fonte de células-tronco hematopoiéticas preferida em muitas instituições ao redor do mundo. Em contraste, poucos centros transplantadores de células-tronco hematopoiéticas adultas já estão adaptados ao transplante de sangue de cordão umbilical como rotina. Obstáculos importantes, especialmente para pacientes adultos, é a impossibilidade de se prover com uma única unidade de sangue de cordão umbilical capaz de fornecer uma dose celular adequada, e suas conseqüências para a “pega” e sobrevivência do enxerto. O uso com sucesso de duas ou mais unidades de sangue de cordão umbilical ainda necessita de mais estudos ([Barker et al., 2005](#)).

Outras alternativas são também:

- **Infusão de células T regulatórias (Treg):** uma subpopulação de células T CD4+ que co-expressam CD25 (IL-2R $\alpha$ ) foi descrita como sendo importante na tolerância e prevenção de auto-imunidade ([Taylor et al., 2001](#); [Cohen et al., 2002](#); [Hoffmann et al., 2002](#); [Taylor et al., 2002](#)).
- **Expansão *Ex Vivo*:** nas últimas décadas, houve um grande interesse no desenvolvimento de expansão *ex vivo* para melhora do enxerto de sangue de cordão umbilical. Resultados de vários estudos em fases I-II estão agora sendo publicados ([Kogler et al., 1999](#); [Pecora et al., 2000](#); [McNiece et al., 2002](#); [Shpall et al., 2002](#); [Jaroscak et al., 2003](#)).

- **Injeção intra medular:** Os modelos animais mostraram que <20% das células-tronco hematopoiéticas infundidas intravenosamente alcançam o espaço intra medular (Cui et al., 1999). Injeções diretamente dentro do microambiente da medula óssea aparecem como uma estratégia em potencial para aumentar o povoamento celular após o transplante (Kushida et al., 2001; Zhong et al., 2002; Mazurier et al., 2003; Wang et al., 2003; Yahata et al., 2003).
- **Células-tronco progenitoras mesenquimais (MSC):** Células-tronco progenitoras mesenquimais participam ativamente da hematopoiese normal, produzindo fatores de crescimento e citocinas e favorecendo as interações célula-célula (Deans et al., 2000; Noort et al., 2002). Em modelos animais, as células-tronco progenitoras mesenquimais facilitam o enxerto de camundongos NOD/SCID (in 't Anker et al., 2003; Kim et al., 2004).

#### 1.2.2.3. O uso de Células de Cordão Umbilical em Terapia Gênica e Reconstituição de Tecidos

As características de diferenciação e proliferação das células-tronco de cordão umbilical (células-tronco progenitoras hematopoiéticas e mesenquimais) as tornam um excelente alvo para terapia gênica. Vetores virais têm sido utilizados para transdução de células CD34<sup>+</sup>, purificadas a partir de MO ou UCB (Miyoshi et al., 1999; Shields et al., 2000). Abordagens experimentais, usando células humanas *in vitro* e modelos animais, têm mostrado que essa manipulação genética pode corrigir defeitos hereditários, tais como a doença de Niemann-Pick (Schuchman, 1999), a mucopolisacaridose tipo I (Pan et al., 2000) e a doença granulomatosa crônica (Grez et al., 2000), entre outras. Células CD34<sup>+</sup> transformadas por vetores retrovirais portadores de genes anti-HIV estão

sendo estudadas como recurso terapêutico na AIDS pediátrica (Bauer et al., 2000).

Nos últimos anos tem sido demonstrado que células adultas de camundongos, obtidas de diferentes tecidos, podem ser “reprogramadas” para diferenciarem-se em células de outros tecidos. Assim, células progenitoras neuronais isoladas do cérebro de camundongos adultos podem reconstituir o tecido hematopoiético de animais letalmente irradiados (Bjornson et al., 1999). Por outro lado, verificou-se que células primordiais hematopoiéticas da medula óssea murina podem transformar-se em neurônios (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). Mas ainda, o transplante de células de medula óssea de camundongos normais em camundongos mdx (um modelo animal da distrofia muscular de Duchenne apresentando ausência da proteína distrofina no músculo) letalmente irradiados levou não só à reconstituição hematopoiética, como também restaurou parcialmente a expressão de distrofina nos animais transplantados, com núcleos das células do doador detectados no músculo dos animais transplantados (Gussoni et al., 1999). Em seu conjunto, esses resultados indicam o potencial das células-tronco hematopoiéticas como futura alternativa terapêutica na reparação de tecidos danificados ou degenerados.

Em seres humanos, a identidade de células precursoras “reprogramáveis” ainda não está comprovada. Recentemente, no entanto, obtiveram-se evidências de que células progenitoras mesenquimais provenientes da medula óssea de crianças e de adultos são capazes de diferenciar-se em células precursoras do cérebro, fígado e músculo (cardíaco, esquelético e liso). Estima-se que a frequência destas células na medula óssea seja de 1 em 10 bilhões (Vogel, 2000).

### ***1.3. Células-tronco como fonte de ilhotas pancreáticas***

#### **1.3.1. Células-tronco embrionárias (ESC)**

Diferentes fontes de células-tronco estão sendo propostas para a produção de células  $\beta$ . A aplicação de células-tronco embrionárias (ESC) na Medicina Regenerativa está sob intensa investigação (Czyz et al., 2003). Células ES são derivadas de blastocistos e diferenciam *in vitro* em células originadas da endoderme, ectoderme e mesoderme, portanto, em células específicas de vários tecidos do corpo. Células-tronco embrionárias humanas e murinas podem gerar “corpos embrióides”, que contém células com o fenótipo similar ao de células  $\beta$  *in vitro* (Assady et al., 2001; Lumelsky et al., 2001; Hussain et al., 2004; Segev et al., 2004). Células-tronco embrionárias diferenciadas também podem levar à diminuição dos níveis de glicose sanguínea, quando infundidas em roedores diabetizados (Hori et al., 2002; Blyszczuk et al., 2003). Os trabalhos de vários grupos indicam, que o número de células produtoras de insulina pode ser aumentado durante a diferenciação *in vitro* de células-tronco embrionárias, pela super-expressão de PAX4, PDX-1 ou NKX6.1 (Blyszczuk et al., 2003; Leon-Quinto et al., 2004; Miyazaki et al., 2004). Um aumento no número de células  $\beta$  diferenciadas também pode ser obtido, através do cultivo de células-tronco embrionárias na presença de fatores de diferenciação. “Corpos embrióides” murinos, derivados de células-tronco embrionárias, que crescem na presença de soro fetal bovino, quando submetidos à condições de cultivo livres de soro, geram uma população de células que expressam PDX-1 e insulina (Ku et al., 2004). Segev e colaboradores (Segev et al., 2004) descreveram a expressão de vários genes específicos de células  $\beta$  após a manipulação do meio de cultura de células-tronco embrionárias.

Como já mencionado, células positivas para insulina foram descritas durante a diferenciação espontânea em EBs cultivados por mais de 10 dias (Soria et al., 2001). No entanto, um protocolo detalhado para obter populações puras e funcionais de células secretoras de insulina a partir de ESCs ainda não foi propriamente estabelecido. As estratégias incluem o enriquecimento da população de células positivas para insulina, usando condições de cultura adequadas (Lumelsky et al., 2001; Hori et al., 2002; Moritoh et al., 2003; Segev et al., 2004), isolamento de células que expressam insulina do resto da cultura (Soria et al., 2000; Leon-Quinto et al., 2004) ou direcionamento da via de diferenciação através do uso de construtos genéticos, que codificam para fatores de transcrição (Blyszczuk et al., 2003). Em diferentes graus, todos os protocolos têm dado importantes contribuições, avançando na busca para se encontrar um protocolo definitivo. Assim:

- a) A formação de agregados celulares antes do transplante mimetiza a arquitetura de uma ilhota e as interações célula-célula. Além do mais, favorece manipulações cirúrgicas e o implante em tecidos específicos.
- b) A adição de nicotinamida na fase de maturação age como um fator-chave de diferenciação em todos os protocolos testados.
- c) A normalização da glicose extracelular no meio de cultura estabiliza o fluxo metabólico e o padrão da expressão gênica. Neste sentido, a glicose pode ter um papel duplo. Na fase de proliferação pode sustentar o gasto extra de energia necessário para a divisão celular. No estágio de diferenciação, a glicose pode modular padrões de expressão gênica específicos, ligados à maquinaria de detecção de glicose e a rede de secreção (Horie et al., 2004).

Apesar de todas estas vantagens, ainda há problemas a serem resolvidos, principalmente aqueles relacionados com a retomada de insulina do meio de cultura e a presença de células positivas para insulina que não são derivadas da endoderme (Rajagopal et al., 2003; Sipione et al., 2004). Assim:

- a) Foi descrito que a insulina pode ser recaptada do meio de cultura em células apoptóticas (Rajagopal et al., 2003). Isto indica que parte da insulina, detectada por imunomarcação, que supostamente seria produzida pelas células (corroborado pela presença do mRNA correspondente), pode ser devida a insulina adicionada ao meio de cultura em certos protocolos ou a insulina presente no soro. Deste modo, o critério de caracterização deve considerar, além do mRNA da insulina, a presença do peptídeo C.
- b) Células  $\beta$  maduras derivam da endoderme do intestino anterior, durante o desenvolvimento embrionário. No entanto, o padrão de expressão gênica não é exclusivo desta região. A neuroectoderme, assim como a endoderme primitiva, também são positivas para insulina (Melloul et al., 2002; Hernandez-Sanchez et al., 2003). Os mecanismos pelos quais o gene da insulina é modulado em tecidos extra pancreáticos, assim como o papel deste hormônio nestes tecidos, precisam ser elucidados. De fato, muitos fatores de transcrição e funções celulares são compartilhados por células  $\beta$  pancreáticas e células neuroectodérmicas (Chakrabarti et al., 2003). No entanto, existem diferenças-chave entre estes tecidos, quanto aos sinais que modulam o gene da insulina, a via de processamento da proteína e a quantidade de hormônio produzida (Hernandez-Sanchez et al., 2003). Normalmente, a insulina neuroectodérmica não é completamente processada, devido à

ausência da proteína convertase-2, rendendo, deste modo, apenas proinsulina e, a quantidade de proteína produzida é milhares de vezes menor que nas células  $\beta$ .

### **1.3.2. Células-tronco de medula óssea**

As células-tronco derivadas de medula óssea foram objetos de estudo da hematopoiese durante muitos anos, sendo a fonte de células-tronco melhor caracterizada até o momento. As células-tronco de medula óssea são multipotentes, capazes de auto-renovação e bem conhecidas como uma ótima fonte de células-tronco para a linhagem hematopoiética.

No entanto, as células-tronco de medula óssea também podem se diferenciar em outros tipos celulares, porque podem migrar em direção ao local da lesão e se diferenciar sob a influência dos fatores do micro-ambiente (contatos célula-célula, interações com a matrix extracelular e fatores de crescimento) (Zhang et al., 2004; Lombaert et al., 2006). 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). Além da transdiferenciação as células-tronco de medula óssea podem se fundir com as células vizinhas especializadas para substituir as células danificadas (Ying et al., 2002). Isto, no entanto, provavelmente é um evento raro no pâncreas (Ianus et al., 2003).

A infusão de células-tronco de medula óssea pode restaurar quimicamente o diabetes induzido em camundongos (Hess et al., 2003; Pessina et al., 2004; Tang et al., 2004). Notavelmente, no entanto, ainda não foi indubitavelmente provado que as BMSCs são capazes de se diferenciar em células  $\beta$ . Um estudo recente descreveu o enxerto de células de medula óssea endógena em ilhotas danificadas. No entanto, o enxerto

não gerou células que expressavam insulina ou qualquer outro fator de transcrição específico de células  $\beta$  como, por exemplo, PDX-1 ou NKX6.1 (Taneera et al., 2006). Estes resultados sugerem um papel de suporte das células-tronco de medula óssea na regeneração ao invés da substituição direta das células danificadas. Outros estudos não corroboram estes resultados, pois não foram capazes de localizar nenhuma célula-tronco de medula óssea endógena no pâncreas danificado (Lechner et al., 2004). Excetuando-se estes resultados conflitantes, o papel das células-tronco de medula óssea nos processos de regeneração *in vivo*, permanecem um objeto de estudo porque os resultados *in vitro* são promissores. As células-tronco de medula óssea que são cultivadas *in vitro* podem produzir insulina *de novo* e expressar insulina e SLC2A2 (um transportador de glicose) quando a concentração de glicose no meio é elevada (Oh et al., 2004; Tang et al., 2004).

Ainda não foi possível comprovar a participação da célula-tronco da medula na diferenciação de células beta pancreáticas e conseqüente povoamento pancreático (Choi et al., 2003; Hess et al., 2003) processo já descrito em células ES murinas (Soria et al., 2000; Lumelsky et al., 2001) e humanas (Assady et al., 2001), progenitoras hepáticas adultas (Yang et al., 2002) e fetais (Zalzman et al., 2003) e, obviamente, em progenitoras pancreáticas (Zulewski et al., 2001; Banerjee et al., 2003). Resumindo, o atual “estado da arte” em pesquisas com BMSCs, sugere que apesar de evidências mostrarem que estas células podem ser uma potencial fonte de células-tronco para diferenciação *in vitro*, ainda não foi possível fazê-las diferenciar em células  $\beta$  *in vivo*.

### **1.3.3. Células-tronco pancreáticas endógenas**

Geralmente, é aceito que o pâncreas adulto possui uma pequena população de células que são capazes de uma contínua auto-renovação,

podendo se diferenciar em células pancreáticas. Estas células-tronco pancreáticas receberam muita atenção da comunidade científica durante os últimos cinco anos porque elas apresentavam diversas vantagens em relação às outras fontes celulares, combinando uma elevada capacidade de proliferação, com o fato de já estarem parcialmente diferenciadas na direção do fenótipo endócrino. Isso pode favorecer uma estratégia de diferenciação mais rápida e menos complicada em direção às células  $\beta$  do que aquela de outras fontes de células-tronco. Estas células também podem ser alvos de terapias clínicas específicas para estimular as células-tronco endógenas na indução de um crescimento compensatório (Guz et al., 2001). Pelo menos duas populações de células-tronco pancreáticas foram descritas no pâncreas. O primeiro grupo consiste das células ductais e acinares. Sugere-se que estas células estão presentes no epitélio pancreático ductal que expressa o marcador ductal CK-19 e PDX-1 (Lee et al., 2004). Estas células podem expandir e se diferenciar em células endócrinas (Ramiya et al., 2000). O segundo grupo de consiste de uma população derivada de células insulares. A evidência para a existência de uma população de células-tronco derivada das ilhotas provem de estudos que mostram a população de células insulina-positivas reaparecendo nas ilhotas após a total destruição das células  $\beta$  com estreptozotocina (Guz et al., 2001). Poucos estudos têm endereçado a identificação de células-tronco residentes nas ilhotas (Zulewski et al., 2001; Lechner et al., 2004; Maria-Engler et al., 2004).

Por muitos anos, propôs-se que as células nestina-positivas representavam uma população de células-tronco derivadas de ilhotas (Zulewski et al., 2001). As células progenitoras nestina-positivas derivadas de ilhotas (células NIP) expressam o cassete de ligação de ATP (um marcador de células-tronco) (Lechner et al., 2004) e têm uma alta capacidade de proliferação *in vivo*. Células NIP que são derivadas de

ilhas podem se diferenciar *in vitro* em células com fenótipo hepático, pancreático exócrino e/ou ductal e endócrino. Após a diferenciação, as células produzem insulina, glucagon, GLP-1 e PDX-1 (Zulewski et al., 2001). A nestina, no entanto, não está presente somente no pâncreas endócrino, mas também nos ductos (Nagasao et al., 2004). Estas células-tronco nestina-positivas também têm características de precursores de células  $\beta$ , com altos níveis de PDX-1 (Kim et al., 2004; Nagasao et al., 2004). Infelizmente, os estudos com células nestina-positivas foram descontinuados porque foi mostrado, em alguns estudos, que a nestina no pâncreas é expressa somente em células que não estão destinadas a tornarem-se células  $\beta$  (Treutelaar et al., 2003; Delacour et al., 2004; Street et al., 2004). No entanto, evidências recentes sugerem que existem diferentes populações de células nestina-positivas no pâncreas. Em resumo, a nestina parece ser uma proteína funcional que sob condições específicas, é expressa em precursores de células  $\beta$ , podendo estar presente em outros tipos celulares (Wang et al., 2005). Deste modo, é imprescindível o estudo do papel da nestina nas células precursoras de células  $\beta$  porque seu padrão de expressão sugere uma função essencial na maturação desses precursores.

No pâncreas também está presente uma população de células que possui o receptor para o fator de crescimento de hepatócitos (HGF/c-Met) (Suzuki et al., 2004). Foi sugerido que o HGF é um potente regulador da função, proliferação e diferenciação de células  $\beta$  no pâncreas (Wang et al., 2004). Inicialmente, supôs-se que estas células positivas para c-Met, presentes no pâncreas, fossem células hepáticas ovais. No entanto, estudos recentes sugerem que c-Met não é específico para o fígado, estando presente também em outros tecidos (Suzuki et al., 2004). No pâncreas de camundongos neo-natos, as células c-Met-positivas estão presentes no tecido acinar e não nas ilhotas (Suzuki et al., 2004). Existem também algumas destas células presentes nos ductos, mas estas não possuem um

fenótipo acinar ou endócrino. Em pâncreas adultos, c-Met é principalmente expresso dentro e ao redor do ducto, endotélio vascular e células na periferia do tecido acinar (Suzuki et al., 2004). Além disso, colônias derivadas de células c-Met-positivas, contém células que expressam vários marcadores de células endócrinas e estas células podem se diferenciar em células endócrinas *in vivo*.

Uma terceira população de células que podem ser qualificadas como células-tronco pancreáticas são as células c-Kit-positivas. c-Kit é um marcador universal de células-tronco. A ligação do fator de crescimento de células-tronco (SCF) ao seu receptor, c-Kit, leva à proliferação celular, sobrevivência e quimiotaxia (Akin et al., 2004). O receptor c-Kit é expresso no pâncreas pré e pós-natal (62). Estudos de co-localização demonstraram que c-Kit é expresso na periferia das ilhotas, co-localizando com células positivas para glucagon (Yashpal et al., 2004). Estudos em monocamadas celulares de epitélios de pâncreas demonstraram a presença e o aumento do número de células que expressavam c-Kit durante a cultura. Estas monocamadas celulares expressaram c-Kit e alguns fatores de transcrição de desenvolvimento pancreático, como PDX-1 e Neurogenina3, durante oito semanas. Depois de diferenciadas, estas células marcavam fracamente para insulina e glucagon e a expressão de c-Kit desaparecia por completo (Wang et al., 2004). Embora o papel de c-Kit no desenvolvimento das células  $\beta$  permaneça não elucidado, estes estudos indicam que células-tronco positivas para c-Kit possuem características de células precursoras endócrinas e podem ser observadas em ilhotas.

#### **1.3.4. Células-tronco de origem não-pancreática**

Não somente células-tronco derivadas de pâncreas, mas também células-tronco originárias de tecidos extra-pancreáticos podem se diferenciar em ilhotas. Recentemente, esta habilidade foi descrita para

células hepáticas (Kojima et al., 2003; Cao et al., 2004; Li et al., 2005; Zalzman et al., 2005), células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (Timper et al., 2006), células-tronco intestinais (Fujita et al., 2004) e células do baço (Kodama et al., 2003). O racional para se estudar fontes de tecidos extra-pancreáticos é que células-tronco destes tecidos podem ser obtidas mais facilmente. Precusores extra-pancreáticos também podem estar disponíveis em maior quantidade do que as precursoras presentes no pâncreas. Estratégias para induzir esta transdiferenciação a partir destas fontes extra-pancreáticas são similares àquelas com células-tronco embrionárias. Células-tronco hepáticas podem se diferenciar em células com o fenótipo  $\beta$  em ambientes de alta concentração de glicose. Da mesma maneira que a super-expressão de PDX-1 (Zalzman et al., 2005), ou a combinação da super-expressão de BETA2-NEUROD1 com a adição de betacelulina (um membro da família do EGF) ao meio de cultura (Kojima et al., 2003; Li et al., 2005), é um método eficaz de promover a diferenciação de células para um fenótipo de células  $\beta$ .

Embora ainda seja necessário aperfeiçoar todos os protocolos baseados em ESC e ASC, estas evidências sugerem fortemente que as células-tronco são uma fonte potencial para terapias regenerativas no futuro. A diferenciação de células  $\beta$  a partir de células-tronco é direcionada por determinantes ainda desconhecidos, que incluem interações célula-célula, sinais da matriz extracelular e a presença da combinação de fatores de crescimento, hormônios, citocinas e nutrientes (Roche et al., 2003).

O principal desafio é obter um produto celular capaz de mimetizar, o mais próximo possível, as características básicas de uma célula  $\beta$  pancreática. As vias de detecção de nutrientes, processamento de insulina e sua exocitose regulada, somados ao padrão de expressão do gene da insulina, devem ser traços fenotípicos chave na obtenção de um produto celular final capaz de restaurar a perda de função no organismo.

## **2. Objetivos**

### ***2.1. Objetivo Geral***

Analisar as bases moleculares do processo de diferenciação de células-tronco em células  $\beta$  pancreáticas, através da busca e identificação de genes diferencialmente expressos durante o processo de diferenciação.

### ***2.2. Objetivos Específicos***

- a) Diferenciar células-tronco em células similares a células  $\beta$  pancreáticas.
- b) Identificar novos genes relacionados a este processo de diferenciação.
- c) Isolar e caracterizar células-tronco adultas do cordão umbilical.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Soluções e Meios de Cultura para Células de Mamíferos

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium), RPMI – Invitrogen .
- $\alpha$  MEM – Meio de cultura MEM com modificação alfa (Sigma)
- SFB – Soro Fetal Bovino (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Brasil)
- SFB-ES – Soro Fetal Bovino qualificado para o cultivo de células-tronco (Hyclone)
- LIF – Fator Inibitório de Leucemias (ESGRO)
- Nicotinamida, Gelatina, bFGF, Poliornitina, Ácido Ascórbico, Alizarin Red,  $\beta$ -Glicerol Fosfato, BSA, Estreptozotocina, Exendina-4, Fibronectina e Laminina – Sigma
- HamF12, Suplemento B27, Suplemento N2 e ITS (Insulina-Transferrina-Selênio),  $\beta$ -Mercaptoetanol, MEM aminoácidos não essenciais – Invitrogen
- Colagenase tipo IA – Sigma
- PBSA – Solução salina (phosphate buffered saline), sem cálcio ou magnésio, tamponada em pH 7,2 composta por NaCl 140mM, KCl 2,7mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  8mM e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4mM
- Tripsina – Solução 0,1% diluída em PBSA, contendo EDTA 1mM (Invitrogen)
- Dexametasona - Aché
- Ficoll Paque Plus – GE Healthcare

### **3.1.2. Soluções**

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se reagentes de grau de pureza para análise, seguindo especificações dos manuais de laboratório (Sambrook et al., 2001).

- Gel de Agarose – Ultrapure TM Agarose (Invitrogen)
- TBE (5X) – 446mM Tris-Base, 445m ácido bórico, 10mM EDTA, pH 8,0
- TE – Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0
- Tampão de amostra de DNA – formamida deionizada 98%, EDTA 10mM, xilenocianol 0,025%, azul de bromofenol 0,025%

### **3.2. Culturas celulares**

As células foram cultivadas em frascos plásticos adequados para o cultivo celular, exceto quando especificado. O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa a 37°C e atmosfera de 2% de CO<sub>2</sub>.

Estoques celulares foram congelados em meio contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e soro, e mantidos em reservatórios contendo nitrogênio líquido.

### **3.3. Cultivo de células-tronco embrionárias (ES) de Camundogos**

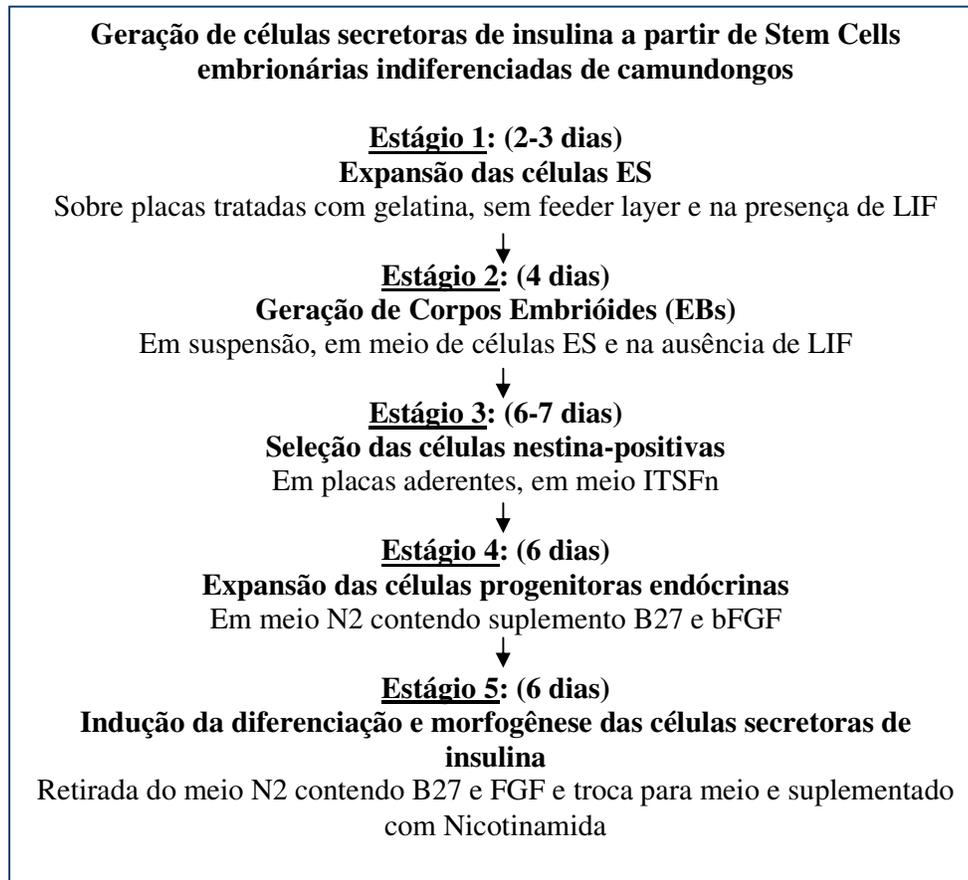
#### **3.3.1. Manutenção das (ES) em estado indiferenciado**

As linhagens de células-tronco embrionárias foram estabelecidas a partir da massa interna de blastocistos obtidos no dia 3,5 pós-coito de camundongos 129/Sv (Sukoyan et al., 2002), e gentilmente cedidas pela

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lygia da Veiga Pereira do Instituto de Biociências - USP. Os embriões foram separados da zona pelúcida usando solução ácida de Tiróide. Os agregados embrionários foram transferidos para placas contendo uma camada de fibroblastos embrionários de camundongos irradiados com raios  $\gamma$  (MEF – Mouse Embryonic Fibroblast – *feeder layer*), e cultivados em meio para células ES [DMEM high glucose, suplementado com 15% soro fetal bovino qualificado para o cultivo de Stem Cells (SFB-ES), 1mM de piruvato de sódio, 1% MEM aminoácidos não essenciais,  $1.10^3$  U/ml “murine leukemia inhibitory factor” (LIF), 0,1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 50 U/ml de penicilina e 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina]. A MEF foi sempre usada durante o cultivo de células-tronco embrionárias. As células ES eram incubadas a 37°C com 2% CO<sub>2</sub>. As células eram tripsinizadas sempre que a placa atingisse 70-80% de sua confluência e o meio era trocado a cada 2-3 dias.

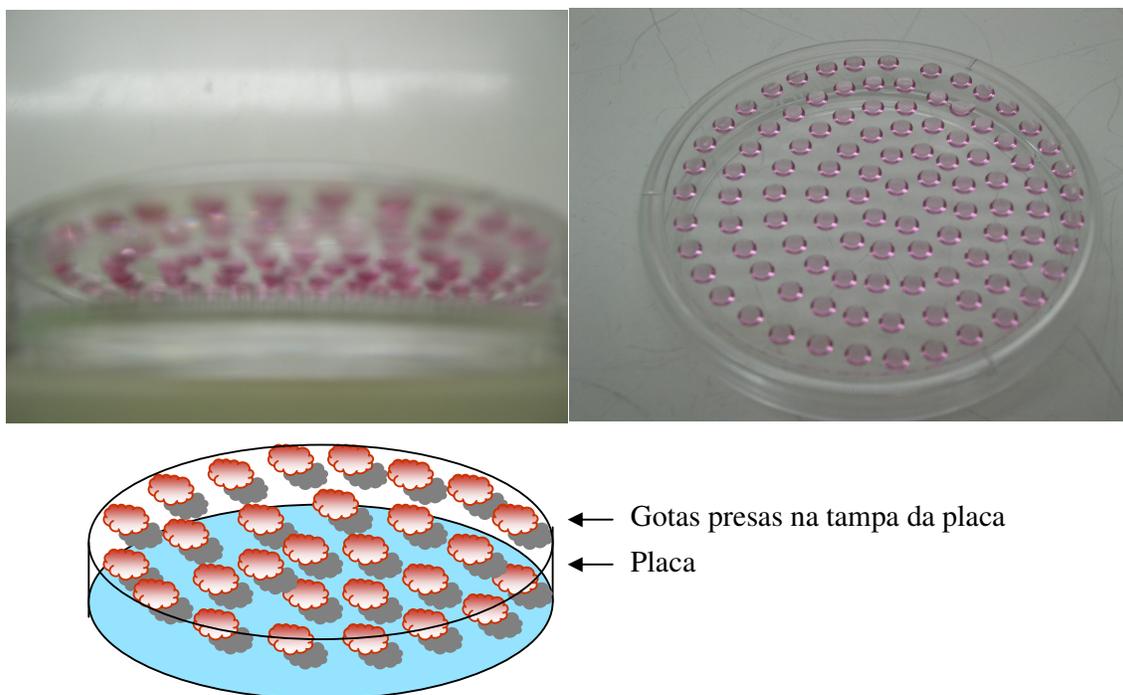
### **3.3.2. Diferenciação das células ES murinas em células secretoras de insulina**

O protocolo utilizado para a diferenciação das células-tronco embrionárias em células secretoras de insulina foi baseado em Lumelsky colaboradores ([Lumelsky et al., 2001](#)) e está esquematizado na figura 2:



**Figura 2:** Esquema geral do protocolo de diferenciação.

As células ES obtidas a partir dos blastocistos foram cultivadas durante 3 dias nas condições descritas acima, em placas tratadas com 0,2% de gelatina e sem “feeder layer” (estágio 1). Logo em seguida as células foram tripsinizadas e incubadas para formarem “corpos embrioides” (EBs) (estágio 2). Os corpos embrioides foram gerados de duas maneiras: 1) a partir de gotas pendentes em placas P100, como na figura 3, onde cada gota continha 500 células cada num volume de 25 µl. 2) por plaqueamento de  $1,2 \cdot 10^6$  células em placas P100 não-aderentes. O meio utilizado foi o meio de cultivo de células ES já descrito anteriormente (item 3.3.1), mas sem a adição de LIF.



**Figura 3:** Esquema ilustrando a geração de corpos embrióides em gotas suspensas. Cada gota gera um corpo embrióide.

Após 5 dias de cultivo, os EBs formados em gotas ou em placas foram semeados em placas aderentes tratadas com gelatina no meio de cultivo de células ES. Depois de 24h o meio foi trocado para o meio de seleção das células nestina-positivas [50% DMEM, 50% HamF12, 1X Insulin-Transferin-Selenium (ITS) e 8  $\mu\text{g/ml}$  de Fibronectina] (estágio 3). Após 6-7 dias de seleção, iniciou-se o processo de expansão das células progenitoras pancreáticas (estágio 4). As células foram tripsinizadas e plaqueadas na densidade de  $2,4 \cdot 10^5$  células/ $\text{cm}^2$  em placas P35 aderentes tratadas com laminina e poliornitina. O meio utilizado tanto para o plaqueamento quanto para o cultivo foi 50% DMEM, 50% HamF12, 1X Suplemento N2, 1X Suplemento B27, suplementado com 50  $\text{ng/ml}$  de bFGF. Depois de 6 dias de expansão, as células foram induzidas à diferenciação e morfogênese de *clusters* secretores de insulina (estágio 5) por mais 6 dias. O meio consistia do mesmo meio de expansão (estágio 4)

retirando-se o bFGF e a suplementação do meio era feita com 10mM de Nicotinamida.

Para a diferenciação espontânea, após a geração dos corpos embrióides, estes foram dissociados e plaqueados em meio DMEM suplementado com 1X B27, 1X N2 e 10 mM de Nicotinamida. Amostras de RNA foram extraídas nos dias 9, 17 e 28.

### **3.4. Imunofluorescência Indireta**

As células foram fixadas e permeabilizadas em 4% paraformaldeído/Triton X-100 durante 30 min a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C em solução de bloqueio (2% BSA em PBSA) para bloqueio dos sítios inespecíficos, quando, então, podiam ser armazenadas a 4°C em solução de bloqueio.

O anticorpo primário, diluído em solução de bloqueio, foi incubado por 2h, a 37°C em estufa. Após a incubação com o anticorpo primário as células foram lavadas com PBSA três vezes, 10 minutos cada, e incubadas por 1h, a 37°C, com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína ou Texas Red, ambos da Molecular Probes) e com DAPI para visualização dos núcleos. As lâminas foram lavadas mais três vezes em PBSA, 10 minutos cada, e montadas em glicerol 90% em PBS contendo 1mg/ml parafenilenediamina.

A marcação fluorescente foi observada utilizando um microscópio Nikon (Eclipse TE300) equipado com objetiva de 60x, com imersão em óleo. Para captura das imagens utilizou-se uma câmara CCD de alta resolução (Princeton Instruments).

### **3.4.1. Anticorpos e Antisoros**

- ◇ Anticorpo Monoclonal anti-insulina, diluição: 1:100 (Zymed, clone 006).
- ◇ Antisoro Policlonal anti N-terminal de Pdx-1, feito em coelhos, diluição: 1:2.500 (gentilmente cedido pelo Dr<sup>o</sup> Michael Ray, Vanderbilt University).
- ◇ Antisoro Policlonal anti-nestina, feito em coelhos, diluição: 1:200 (gentilmente cedido pelo Dr<sup>o</sup> Carl A Messan, NINDS).
- ◇ Anticorpo Secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Texas Red, diluição: 1:100 (Molecular Probes).
- ◇ Anticorpo Secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC, diluição: 1:1.000 (Molecular Probes).

Como controles foram utilizados o soro pré-imune de coelhos, também cedido pelo Dr<sup>o</sup> Messan, e células NIH-3T3 para controle negativo do anticorpo anti-insulina.

### **3.5. Dosagem de Insulina**

Para a dosagem de insulina, as células foram lavadas 2 vezes em uma solução de baixa concentração de glicose (2,8 mM) e incubadas para análise do índice de estímulo da secreção de insulina em meio RPMI, 0,5% BSA, 2mM L-Glutamina e diferentes concentrações de Glicose (2,8 ou 20 mM), sem adição de qualquer tipo de soro, durante 2h. O sobrenadante foi então coletado e a dosagem de insulina foi feita na CRIESp (Central de Rádio ImunoEnsaio de São Paulo) pela técnica de Eletroquimioluminescência.

### **3.6. Ensaios de Teratogênese**

Para analisarmos o potencial teratogênico das células-tronco embrionárias murinas,  $6 \times 10^6$  células-tronco embrionárias de camundongos indiferenciadas foram inoculadas na região sub-dérmica de camundongos *NUDE* imunodeficientes e, após 2 semanas, a formação de teratomas foi avaliada.

### **3.7. Implante de Células Diferenciadas em Animais Diabéticos**

Após todo o processo de diferenciação, esquematizado na figura 2, para analisar a funcionalidade das células diferenciadas *in vivo*,  $1 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^7$  células diferenciadas foram implantadas em camundongos *NUDE* imunodeficientes diabéticos. Os animais foram diabetizados 4 dias antes do procedimento com uma única injeção intraperitoneal de 200mg/kg de estreptozotocina (Sigma) em tampão citrato pH 4,5. Após a confirmação da diabetização, quando os animais atingiam níveis glicêmicos superiores a 300mg/dl, estes eram anestesiados e as células eram implantadas sob a cápsula renal. Nos animais *SHAM* foi injetado PBSA. Os animais foram mantidos por até 7 dias.

### **3.8. Extração e Purificação de RNA**

Para a extração e purificação do RNA, foi utilizado o kit *Illustra RNA Spin* da GE Healthcare.

As culturas de células diferenciadas ou seus respectivos controles não-diferenciados foram mantidos nas placas de culturas até o momento da extração, quando foram lavadas 2 vezes com PBSA. O PBSA foi removido e 600µl de solução de lise, contendo β-Mercaptoetanol foi adicionado à

placa. O lisado então pode ou ser congelado ou ser submetido ao restante do protocolo de purificação, seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado através da absorbância da amostra quando atingida por luz de comprimento de onda de 260nm. O grau de pureza foi determinado através da razão das medidas nos comprimentos de onda a 260 e 280nm, adotando-se os valores entre 1,8 e 2,0 como sendo de grau adequado de pureza.

### **3.9. Síntese de cDNA**

O RNA total, resultante do item 3.3, foi utilizado como template para a síntese de cDNA em uma reação de transcrição reversa. Assim, foram preparadas as reações contendo 2 µg de RNA total, extraído das culturas, 1µl de Oligo dT 500ng/ml (Ge Healthcare), 1µl de *Random Primer* 100ng/µl e H<sub>2</sub>O para um volume final de 12 µl. As amostras foram incubadas a 75°C por 10 min e, em seguida, adicionou-se 14 µl de uma solução contendo 2µl de DTT (Ditiotrietol) e 1µ de RNase OUT 40U/µl. Após uma nova incubação de 2 min a 42°C, foi adicionado 1 µl de enzima Superscript III 200U/µl (Invitrogen).

A reação se deu durante uma incubação de 2h a 42°C e 2h a 50°C. Em seguida, para inativação da enzima, a amostra foi incubada a 75°C por 10 min. Visando degradar o RNA, foi adicionado 1µl de RNase H 5U/µl em cada tubo e os tubos foram incubados por 37°C por 30 min, e em seguida, a 75°C por 10 min para inativação da RNA. Posteriormente, as amostras foram diluídas em TE ou H<sub>2</sub>O Milli-Q.

### **3.10. Controle de qualidade do cDNA**

Para confirmar a qualidade do cDNA sintetizado, foram realizadas reações de PCR controle. O primeiro controle consistia na amplificação de

GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), e o segundo na amplificação de  $\beta$ -Actina, dois genes *housekeeping* com expressão ubíqua. Estes eram os controles internos da reação de transcrição reversa.

Utilizando os dois diferentes conjuntos de *primers*, cada reação foi montada de forma a apresentar uma concentração final de 1X para o tampão de reação (Biolase), 2,0mM de  $MgCl_2$ , 0,2mM de dNTP, 0,2 $\mu$ M de cada um dos *primers* (*Forward* e *Reverse*), enzima Taq polimerase (Biolase) e 1 $\mu$ l de *template*.

Nas reações de PCR foi utilizado um programa de: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 sec, 55°C por 25 sec e 72°C por 1 min e, após os ciclos 72°C por 5 min.

Os produtos das reações de PCR foram posteriormente analisados em um gel de agarose 0,8% em TBE 1X, contendo brometo de Etídeo.

### **3.11. Análise de Expressão Gênica Diferencial através de *CodeLink Bioarrays***

#### **3.11.1. Preparação dos alvos**

##### 3.11.1.1. Síntese do cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA, adicionou-se à reação diferentes concentrações de mRNAs bacterianos (concentração final de 1:200.000) dos genes *araB* e *entF*, 1:600.000 dos genes *fixB* e *gnD* e 1:200.000 dos genes *hisB* e *leuB*) que consistem de controles para marcação das sondas, hibridização das lâminas e sensibilidade do experimento. Para cada alvo foi montada uma reação contendo 2 $\mu$ g de RNA total, 2 $\mu$ l do mRNA de controle (bacteriano), 1 $\mu$ l de T7oligo(dT) *primer* e  $H_2O$ -MilliQ para volume final de 12 $\mu$ l.

As amostras foram colocadas a 70°C por 10 min para desnaturar possíveis estruturas secundárias dos RNAs e, logo em seguida, colocadas no gelo. Adicionou-se 2µl do tampão da primeira fita, 4µl de dNTP 5mM, 1µl de inibidor de RNase e 1µl de transcriptase reversa. Para a síntese da primeira fita, as amostras foram incubadas a 42°C por 2h.

Terminada a reação de síntese da primeira fita do cDNA, montou-se a reação para a síntese da segunda fita. Foram adicionadas à reação: 63µl de H<sub>2</sub>O-MilliQ, 10 µl de tampão para a segunda fita (10X), 4µl de um mix de dNTP 5mM, 2µl do mix de DNA polimerase e 1µl de RNase H. O tubo foi gentilmente agitado e incubado por 2h a 16°C.

#### 3.11.1.2. Purificação do cDNA dupla fita

Foi utilizado o kit QIAquick Spin (Qiagen) para a purificação do cDNA dupla fita, seguindo-se as recomendações do fabricante.

#### 3.11.1.3. Síntese do cRNA

As amostras de cDNA dupla fita obtidas no item anterior foram ressuspendidas em 13,5µl de uma solução contendo 9,5µl de H<sub>2</sub>O-MilliQ e 4µl de tampão de reação T7. Logo em seguida, adicionou-se a cada amostra 4µl de T7 ATP, 4µl de T7 GTP, 4µl de T7 CTP, 4µl de T7 UTP, 7,5µl de biotina-11-UTP (10mM) e 4µl de mix da enzima T7 (10X), para a síntese através da enzima T7 e a amostra foi incubada por 14h a 37°C.

#### 3.11.1.4. Purificação do cRNA marcado

O volume da solução de cRNA foi ajustado para 100µl através da adição de H<sub>2</sub>O-MilliQ. Adicionou-se 350µl do tampão RLT (fornecido pelo fabricante) e, após homogeneização, foi adicionado 250µl de etanol 100%.

As amostras foram então purificadas em colunas RNeasy (Qiagen) utilizando as recomendações do fabricante.

A concentração do cRNA foi determinada posteriormente em um espectrofotômetro Nanodrop medindo-se a absorvância a  $\lambda=260\text{nm}$  e a sua pureza foi determinada pela razão das medidas da absorvância em  $\lambda=260\text{nm}$  e  $\lambda=280\text{nm}$ .

### **3.11.2. Hibridização e Lavagem**

#### 3.11.2.1. Fragmentação do cRNA

Para cada uma das amostras, 10 $\mu\text{g}$  de cRNA, preparados conforme descrito anteriormente, foram ajustados para um volume de 10 $\mu\text{l}$  através da adição de H<sub>2</sub>O-MilliQ. À amostra foram adicionados 5 $\mu\text{l}$  de tampão de fragmentação 5X (fornecido pelo fabricante), para que ocorresse a fragmentação do cRNA, e as amostras foram incubadas por 20 min a 94°C e, em seguida, 5 min a 0°C.

#### 3.11.2.2. Hibridização dos *bioarrays*

Para cada *bioarray* hibridizado, preparou-se uma mistura contendo 260 $\mu\text{l}$  de uma solução de hibridização contendo 78 $\mu\text{l}$  do componente do tampão A, 130 $\mu\text{l}$  do componente do tampão B (fornecidos pelo fabricante) e 27 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O-MilliQ, à qual adicionou-se 25 $\mu\text{l}$  do cRNA fragmentado. As soluções foram misturadas por 5 sec e então incubadas a 90°C por 5 min para desnaturação do cRNA. Até o momento de serem aplicadas nos *bioarrays*, as soluções foram mantidas no gelo.

Em cada *bioarray*, foram aplicados 250 $\mu\text{l}$  da solução de hibridização utilizando-se uma micropipeta de 1ml. As câmeras de hibridização foram então seladas com os adesivos fornecidos pelo fabricante. Os *bioarrays* foram colocados em um agitador por cerca de 20h, e mantidos a 37°C e 300 RPM.

### 3.11.2.3. Lavagem e marcação

Após a hibridização, o adesivo, que formava a câmara de hibridização, foi removido e o *bioarray* colocado em um reservatório contendo uma solução de TNT 0,75X a 46°C, onde foi mantido por exatamente 1h.

O *bioarray* foi removido da solução TNT 0,75X e colocado em um outro reservatório contendo uma solução de Cy5-Estreptavidina. Para evitar degradação do fluoróforo, o reservatório foi coberto e os *bioarrays* foram mantidos nessa solução por 30 min. Em seguida, o *bioarray* foi colocado em um novo reservatório contendo tampão TNT 1X, onde foi mantido por 5 min, também protegido da luz. Esse procedimento foi realizado mais 3 vezes, sempre utilizando uma nova solução de TNT 1X a cada lavagem.

Terminada a quarta lavagem, o *bioarray* foi colocado em um reservatório contendo uma solução de Tween20 0,05%, na qual o *bioarray* foi movido para cima e para baixo 5 vezes e o procedimento foi repetido novamente com uma solução nova de Tween20 0,05%. Por fim, os *bioarrays* foram secos através de centrifugação a 644g por 3min e então guardados em um recipiente apropriado para mantê-los protegidos da luz até que fossem escaneados.

### 3.11.2.4. Aquisição e análise dos dados

Os *bioarrays* foram escaneados pelo *GenePix 4000B Array Scanner* (Axon Instruments) e os dados relativos às intensidades de fluorescência emitida pelos *spots* coletadas pelo programa *CodeLink System Software* (GE Healthcare). Após a coleta dos dados, o programa invalidou automaticamente os dados referentes aos *spots* que haviam apresentado alguma irregularidade e forneceu os valores de intensidade de cada *spot* antes e após uma normalização baseada na mediana local da medida das intensidades.

Para a normalização dos dados de microrarray da plataforma *CodeLink*, foi usado o método Support Vector Machine (SVR), implementado no pacote GEDI (Gene Expression Data Interpreter) (Fujita et al., 2007). O SVR, proposto em Fujita e colaboradores, consiste basicamente numa regressão não linear como o Loewss, porém, sendo um método mais robusto a outliers (genes diferencialmente expressos). O pacote GEDI pode ser encontrado na página: <http://www.iq.usp.br/wwwdocentes/mcsoga/gedi/>, sendo composto de diversos métodos de análise de dados de expressão gênica.

Após a normalização dos dados, foram selecionados todos os genes que na amostra diferenciada, apresentavam um valor de expressão superior a 5 vezes quando comparados com a amostra não-diferenciada. Estes foram classificados ontogeneticamente e, então, selecionados aqueles com atividade descrita em diferenciação celular. Para estes foram desenhados *primers* de PCR em tempo real para confirmação da expressão.

### **3.12. Confirmação da expressão diferencial por PCR em Tempo Real (Real-Time PCR/Q-PCR)**

Nos experimentos de *Real-Time PCR* utilizou-se os mesmos cDNAs sintetizados para os experimentos de hibridização no *CodeLink Bioarray*. Todas as reações foram realizadas em triplicata, contendo 3µl do cDNA diluído 30 vezes da amostra analisada, 3µl de um mix dos *primers Forward* e *Reverse* (2,4µM cada) e 6µl de *Power SYBR Green Dye*. As reações de amplificação e quantificação dos produtos formados foram realizadas no termociclador *ABI 7300 Real Time PCR* (Applied Biosystems). Todas as reações foram montadas tomando-se precauções para que a placa não pegasse partículas de sujeira, talco, etc que pudessem interferir na leitura dos dados.

### 3.12.1. Padronização da eficiência dos *primers*

Para calcular a eficiência de um *primer* (E), foram realizadas várias reações de *Real-Time PCR* contendo diluições seriadas do *template*. Posteriormente, foi elaborado o gráfico dos Cts obtidos em função do logaritmo da respectiva diluição, sendo que a eficiência do *primer* foi dada de acordo com o coeficiente angular da reta obtida ( $E = \log(-1/\text{coeficiente angular})$ ).

Para cada reação foram adicionados 3 $\mu$ l do *pool* de cDNA nas diluições desejadas (1:20, 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320), 3 $\mu$ l de *primers* e 6 $\mu$ l de *Power SYBR Green Dye*. Todas as reações foram realizadas em triplicata e utilizando um programa de 1 ciclo de 10 min a 95°C e 40 ciclos de 30 sec a 95°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C. O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados durante a amplificação foram realizados pelo programa *7300 System SDS Software* (Applied Biosystems).

### 3.12.2. Confirmação da expressão diferencial

Terminada a reação de *Real-Time PCR*, através do programa *7300 System SDS Software* (Applied Biosystems), foi definido manualmente um *threshold* que estivesse na fase exponencial de amplificação do gene, sendo que a intersecção da curva de amplificação com o *threshold* forneceu o Ct (*Threshold cycle* – o ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do *background*) da amostra analisada.

Foi utilizado um método de quantificação relativa para analisar os dados. Assim, para cada cDNA analisado, eram realizadas duas reações, sendo uma utilizando *primers* para o gene analisado e outra utilizando *primers* para um controle interno, e a diferença entre os Cts dos dois genes foi definida como  $\Delta$ Ct.

Teoricamente, em uma reação de PCR a quantidade de produto formado é duplicada a cada ciclo, portanto, a diferença entre uma amostra analisada e uma amostra de referência é dada pelo ganho em cada ciclo (2

vezes) elevado à diferença de  $\Delta Ct$  das duas amostras (Pfaffl, 2001). Entretanto, na prática a eficiência dos *primers* não é sempre 100%, ou seja, ocorre um ganho menor que 2 vezes entre cada ciclo de PCR, sendo que o valor da eficiência do *primer* deve ser considerado, substituindo 2 pela eficiência do *primer* da amostra (E).

### **3.13. Obtenção de Células-tronco a partir da Medula Óssea de Ratos**

As medulas foram obtidas de ossos longos de ratos Sprague-Dawley com idade entre 8 e 12 semanas, no Biotério de Experimentação do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. A medula foi exposta cortando-se as extremidade dos ossos e seu conteúdo interno foi retirado por lavagem (*flushing*) com o auxílio de uma seringa. Este material foi recolhido em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino, e antibióticos (100 ug/ml de estreptomicina, 100 U/ml de Penicilina e Ciprofloxacina 0,02%). Logo após, todo material foi centrifugado a 600g durante 5 minutos à 25°C e ressuspendido em meio novo. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes e todo resquício de osso, cartilagem e músculo foi sendo retirado. Durante a última lavagem, as células foram pipetadas vigorosamente para separar qualquer grumo remanescente. As células foram mantidas em placas para culturas aderentes em estufas à 37°C com 2% CO<sub>2</sub> pelas próximas 24h de cultura, quando então foi separada a fração aderente daquelas células incapazes de aderir. As células foram induzidas à diferenciar *in vitro*, mantidas em alta confluência em meio DMEM-HG (alta glicose) suplementado com 10% soro fetal bovino, 10mM Nicotinamida e 10nM Exendina-4 por 2-4 meses. Para análise da diferenciação, o RNA dessas culturas foi isolado, transcrito e uma reação de PCR para amplificação do gene da insulina foi feita. Nas reações foi utilizado um programa de: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C

por 30 sec, 58°C por 30 sec e 72°C por 1 min e, após os ciclos 72°C por 5 min. Como controle positivo, foi utilizado RNA de células Rin-5mf, um insulinoma de rato.

### **3.14. Descongelamento de Bolsa de Sangue de Cordão Umbilical**

As amostras de sangue de cordão umbilical (UCB) foram coletadas e congeladas no Banco de Sangue do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), sob a supervisão da Dr<sup>a</sup>. Andreza Alice Feitosa Ribeiro. As amostras utilizadas permaneceram congeladas por não mais que 4 anos. As bolsas eram retiradas do tanque de nitrogênio ou do ultrafreezer à -80°C e rapidamente descongeladas à 37°C. O conteúdo da bolsa era transferido para tubos cônicos e diluído na proporção de 1:3 com meio de cultura. Esta suspensão era então carregada sobre o gradiente de Ficoll-Paque-Plus (GE Healthcare) para o isolamento das células mononucleares. O rendimento médio de células mononucleadas foi de  $1,3 \cdot 10^8$  células/cordão. Todas as amostras apresentavam 98% de viabilidade no momento do descongelamento, pela coloração com Trypan Blue.

### **3.15. Ensaio de Atividade Mitogênica**

As células foram plaqueadas na densidade de  $1 \cdot 10^4$  células/cm<sup>2</sup> e carencidas para soro durante 24h. Em seguida, as células foram expostas às diferentes condições de cultivo, juntamente com 0,25 µCi de <sup>3</sup>H-Timidina e  $10^{-7}$  M de Timidina “fria” por 24h. Após 24h de estimulação o meio foi removido e os poços foram lavados 2 vezes com 5% TCA gelado. 0,2ml de 0,5M NaOH foi adicionado aos poços e estes incubados por 1h à 37°C para lise completa das células. Foram introduzidos filtros de papel em cada poço e, logo em seguida, os filtros eram passados para um béquer e lavados com TCA 5% e depois sucessivamente com TCA 5%, Etanol e Acetona. Os

filtros foram então secos à 37°C e colocados em vials contendo 3ml de líquido de cintilação. A atividade mitogênica foi medida através da incorporação deste isótopo radioativo, precursor de nucleotídeos do DNA, medindo-se a síntese de DNA.

### **3.16. Obtenção de Células-tronco a partir da Parede da Veia Umbilical**

Os cordões umbilicais foram coletados no Centro Obstétrico do Hospital Universitário da USP, após consentimento livre e informado (de acordo com o processo número CEP-HU:383/03 e CONEP: 9851, e processados o mais rápido possível (dentro de 2-6 horas), após o parto, como descrito (Covas et al., 2003; Romanov et al., 2003). A veia do cordão foi canulada em suas duas extremidades e lavada com meio de cultura (MEM). O vaso foi preenchido com solução de 0,1% colagenase tipo IA, em MEM e incubado a 37°C por 15 minutos. A veia foi então lavada com salina e após “massagear” o cordão, a suspensão de células endoteliais e subendoteliais foi coletada. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 600g e ressuspensas em  $\alpha$ -MEM suplementado 2 mM L-Glutamina, 10% de Soro Fetal Bovino de lotes designados para o cultivo de células-tronco (Hyclone) e antibióticos. As células foram plaqueadas em placas de cultura aderentes e mantidas em estufas à 37°C com 2% CO<sub>2</sub>. Aproximadamente duas semanas após este processamento, começavam a aparecer colônias fibroblastóides, características de células-tronco mesenquimais. O subcultivo foi feito antes que as placas atingissem 80% de sua confluência máxima, para evitar a perda de pluripotência por parte das células.

### **3.17. Obtenção de Células-tronco a partir do Sangue de Cordão Umbilical**

Logo após a secção do cordão e quando o recém-nato já se encontrava aos cuidados do pediatra, o sangue foi colhido na extremidade do cordão umbilical que permanece ligado à placenta e armazenado em tubo heparinizado (250 U/ml) para posterior utilização. Todas as amostras foram processadas em menos de 1h após o parto. O sangue foi diluído na proporção de 1:3 com solução salina heparinizada e carregado sobre um colchão de 10 ml de Ficoll-PaquePlus (Histopaque, GE Healthcare,  $d=1.077$  g/ml) em tubos Falcon de 50 ml. Após a centrifugação à 800g por 30 minutos, as células mononucleadas eram recolhidas da interface e ressuspendidas em HBSS. As células foram então centrifugadas mais uma vez a 600g por 15 minutos, ressuspendidas em meio completo ( $\alpha$ -MEM suplementado com 10% soro fetal bovino para crescimento de células-tronco (Hyclone), 2mM de L-Glutamina e antibióticos) e plaqueadas em placas aderentes. Após 24h, o meio foi trocado e as células que não aderiram foram descartadas. Aproximadamente duas semanas após este processamento, apareceriam colônias fibroblastóides, características de células-tronco mesenquimais. O subcultivo foi feito antes que as placas atingissem 80% de sua confluência máxima, para evitar a perda de pluripotência por parte das células.

### **3.18. Curvas de Crescimento**

As células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços na concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço ou em placas de 48 poços nas concentrações de  $1 \times 10^3$  células/poço ou de  $1 \times 10^4$  células/poço, na presença de diferentes concentrações de soro fetal bovino ou BSA. As placas foram mantidas em condições adequadas de cultura, sendo o meio renovado a

cada dois dias. Cada ponto da curva foi coletado através de tripsinização e, em seguida, as células foram fixadas em solução 3,7% formaldeído-PBSA e mantidas a 4°C até o momento da contagem. A contagem das suspensões de células foi realizada em contador eletrônico modelo CC530 (CELM – Companhia de Equipadora de Laboratórios Modernos).

### **3.19. Caracterização Imunológica (Imunofenotipagem) das culturas de células-tronco mesenquimais da parede da veia umbilical (MSC), de sangue de cordão umbilical (UCB) e endotélio vascular de cordão umbilical (HUVEC).**

As culturas derivadas de células de sangue de cordão umbilical e da camada subendotelial da veia umbilical de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> passagens foram marcadas diretamente com CD14-FITC, CD29-PE, CD31-PE, CD44-PE, CD73-PE, CD90-FITC ou CD90-APC (todos da Pharmigen), e marcadas indiretamente com CD105 (Chemicon) - Secundário sheep anti-mouse PE (Chemicon), durante 30 minutos à 4°C, lavadas com PBS e fixadas em 1% paraformaldeído por mais 30 minutos. Logo em seguida, foram submetidas à citometria de fluxo em um aparelho FACSAria (BD Biosciences) e analisadas pelo software FACSDIVA do mesmo fabricante, em um projeto em colaboração com o Dr<sup>o</sup> Oswaldo Keith Okamoto do HIAE-UNIFESP. As diluições utilizadas foram:

- FITC (1:50)
- PE (1:25), exceto CD44 (1:50)
- PE Cy5 (1:10)
- APC (1:100)

### **3.20. Ensaios de diferenciação das células progenitoras mesenquimais obtidas a partir das culturas do sangue de cordão umbilical e da parede da veia de cordão na linhagem óssea.**

As culturas derivadas de células de sangue de cordão umbilical e da veia do cordão umbilical foram submetidas ao processo de diferenciação na linhagem óssea. Para induzir a diferenciação, as células foram cultivadas no meio de diferenciação por 3 semanas. O meio era composto por  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% Soro fetal bovino, 100 nM Dexametasona, 100  $\mu$ g/ml Ácido Ascórbico e 10 mM de  $\beta$ -Glicerol Fosfato. O meio era trocado 2 vezes por semana. O fenótipo de osteoblastos foi avaliado pela coloração da matriz mineralizada com Alizarin Red.

### **3.21. Análise Estatística**

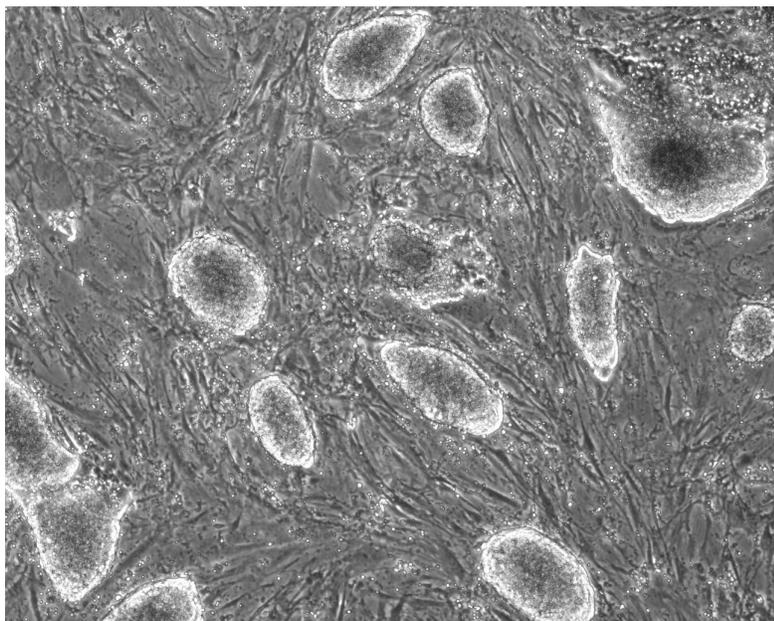
Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística com auxílio do programa *Prism v4.02* (GraphPad). Para análise da diferença de expressão de cada gene, entre as amostras analisadas, foi utilizada uma análise de variância unidirecional (*one-way ANOVA*) seguida de um teste de Tukey, que realiza uma comparação dois a dois das médias dos valores de níveis de expressão.

## 4. Resultados

### 4.1. Células-Tronco Embrionárias

#### 4.1.1. Cultura e caracterização de células-tronco embrionárias (ESC) murinas

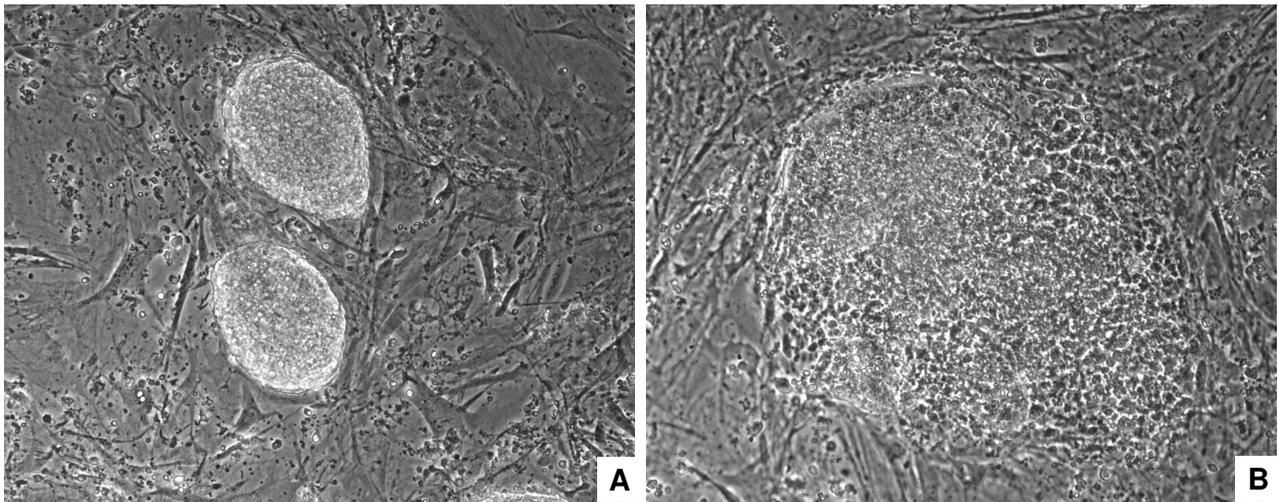
As células foram cultivadas seguindo protocolos já bem estabelecidos de cultivo de células ES para serem mantidas em estado indiferenciado, cultivadas sobre uma camada de MEF (*feeder layer*) e na presença de LIF, que não permitem que estas células se diferenciem. Estas células permanecem pequenas, com núcleos densos e pequenos, formando colônias muito facilmente, e mantendo sua morfologia quando mantidas nestas condições de cultura, como pode ser visto na figura 4.



**Figura 4:** Colônias de células-tronco indiferenciadas embrionárias de camundongo crescidas sobre *feeder layer* de fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) irradiados, mantendo sua pluripotência. Aumento 40x.

Como pode ser observado na figura 4, as colônias de células-tronco embrionárias crescidas sobre *feeder layer* de fibroblastos embrionários

murinos (MEF) irradiados são refringentes, com bordas bem definidas, caracterizando sua pluripotência. No entanto, também observamos que essa cultura não é homogênea, apresentando algumas colônias com um aspecto de pré-diferenciação, com irregularidade na região periférica da colônia e regiões escuras dentro da colônia. Supunha-se que estas células estejam todas em estado indiferenciado, com amplo potencial de diferenciação para todos os tipos celulares. No entanto, pudemos observar a formação de mais de um tipo de colônia em nossas culturas, demonstrando que haviam células em diferentes estágios. Como ilustrado na figura 5, foi possível observar que existiam colônias densas, com bordas bem definidas e refringentes ao microscópio (tipo I). Por outro lado, existiam colônias mais esparsas, sem definição em suas bordas e de pouca refringência (tipo II).



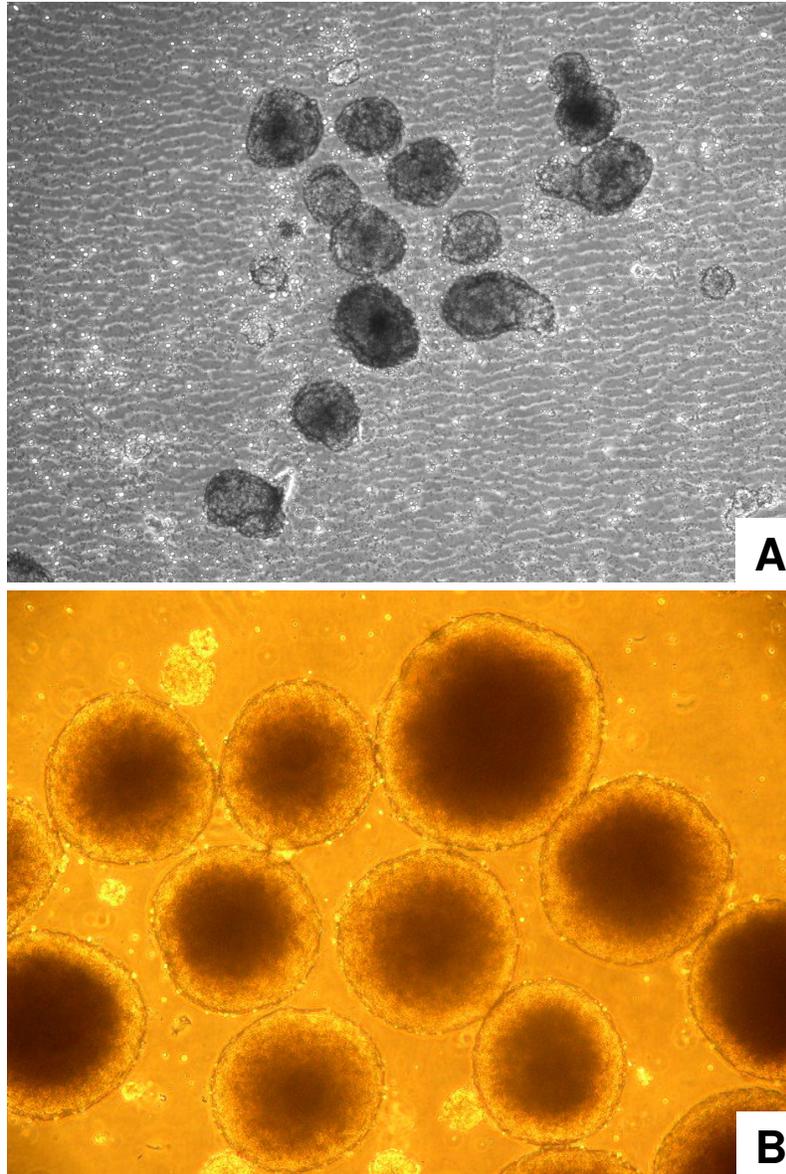
**Figura 5:** Colônias indiferenciadas de células-tronco embrionárias de camundongos. A - colônias do tipo I e B - Colônias do tipo II. Aumento- 100x

Após crescimento/expansão destas colônias, as células foram injetadas na região sub-cutânea de camundongos *NUDE* imunodeficientes para analisarmos sua capacidade na geração de tumores *in vivo*. Após 14 dias, os tumores já eram bem visíveis, como demonstrado na figura 6, e os animais foram sacrificados.



**Figura 6:** Teratomas formados 14 dias após a injeção de  $6 \times 10^6$  células-tronco embrionárias indiferenciadas de camundongos.

Foi possível, também, gerar, com sucesso, corpos embrióides, utilizando o protocolo descrito em Materiais e Métodos, conforme mostrado na figura 7.



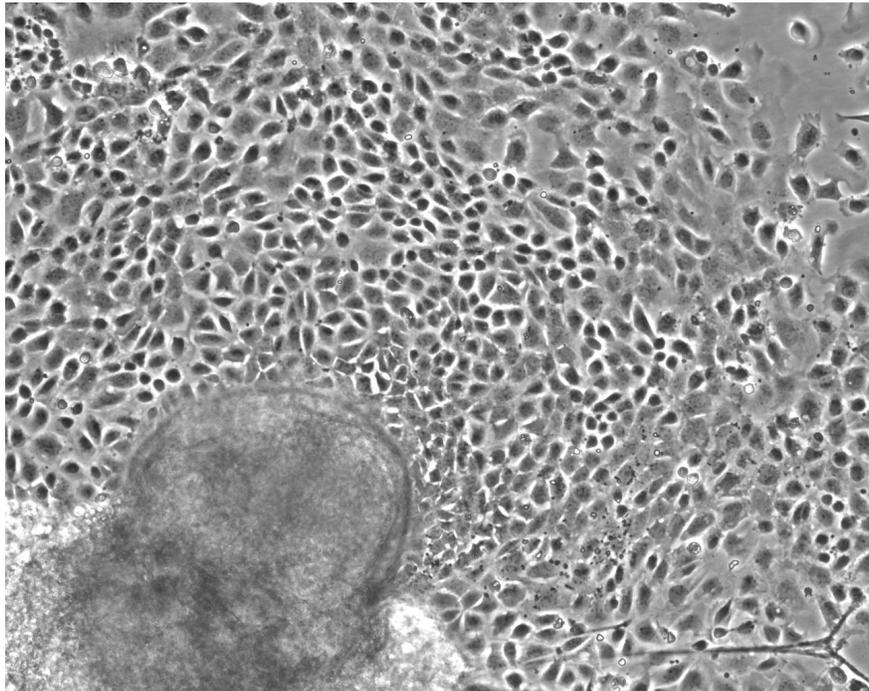
**Figura 7:** Corpos embrióides gerados a partir de células-tronco embrionárias de camundongos. A – Corpos gerados em placas de cultura não aderentes, aumento 40x. B – Corpos Gerados em gotas, aumento 100x.

#### **4.1.2. Diferenciação e caracterização de ESC murinas em células produtoras de insulina**

Para o processo de diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongos em células secretoras de insulina, utilizou-se o protocolo descrito em Lumelsky e colaboradores ([Lumelsky et al., 2001](#)) e detalhado no item 3.3.2 dos “Materiais e Métodos”. Os resultados obtidos durante o

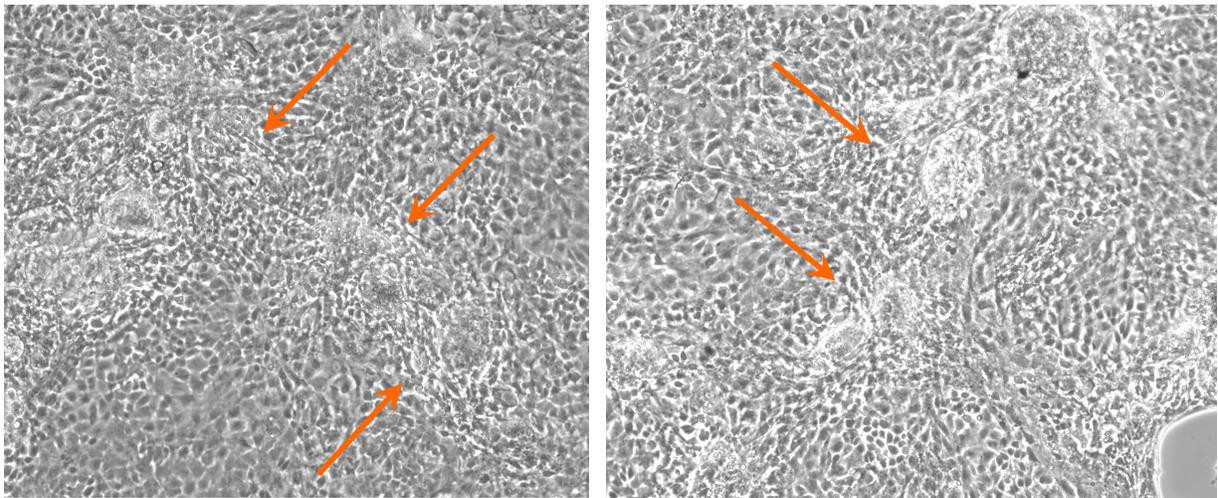
processo de diferenciação foram semelhantes àqueles descritos no trabalho, no entanto, algumas observações foram feitas, que não estão descritas no trabalho destes autores, conforme detalhado a seguir.

Após a geração dos corpos embrióides, as células eram colocadas para aderir à placa e cresceram, formando uma monocamada com células de forma epitelíóide como ilustrado na figura 8. Neste momento, durante a seleção das células nestina-positivas (estágio 3), as células eram cultivadas em meio contendo 50% DMEM, 50% HamF12, 1X ITS e 8µg/ml de Fibronectina. Neste estágio, está descrito (Lumelsky et al., 2001) que com este tipo de meio os vários tipos celulares morrem e apenas as células nestina-positivas sobrevivem, no entanto, nós observamos que há crescimento celular durante este estágio, mesmo na ausência de soro.



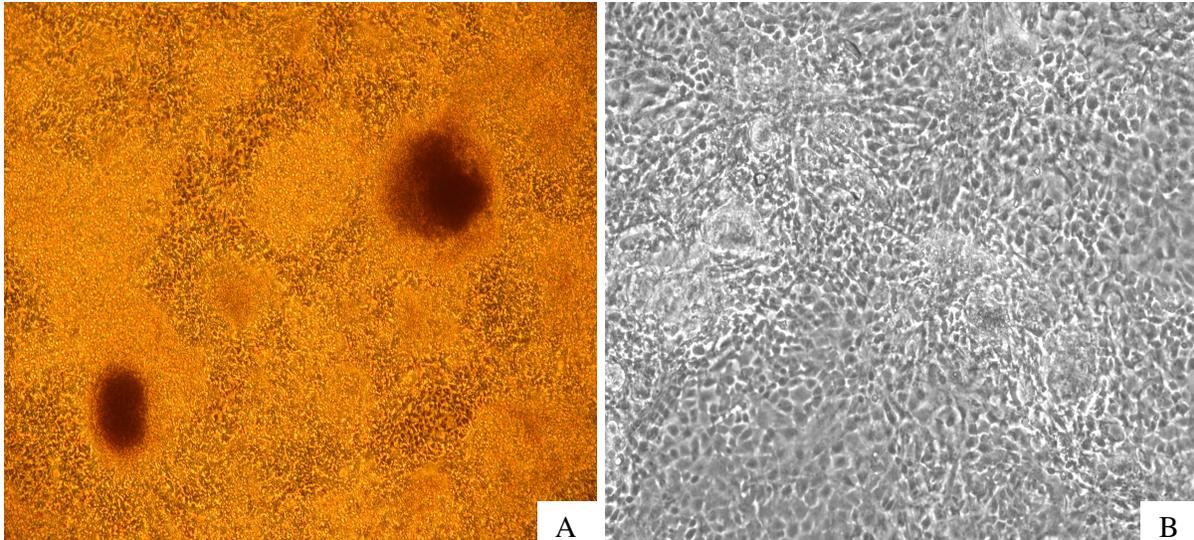
**Figura 8:** Corpos embrióides são formados cultivando-se as células-tronco embrionárias (ES) em suspensão. Após sete dias, estes corpos embrióides aderem à placa de cultura e crescem em monocamada, apresentando células de formato epitelíóide, em condições livres de soro. Aumento 100x.

Para dar seqüência ao protocolo de diferenciação, utilizamos os corpos embrióides gerados em gotas, pois estes apresentavam uma maior homogeneidade, quanto à sua forma, do que aqueles gerados em placas não aderentes. Outra observação feita durante este estágio é a presença de algumas regiões na placa, nas quais ocorre pulsação, que acreditamos serem células ES diferenciadas em cardiomiócitos, como demonstrado na figura 9. Interessantemente, havia um maior número de regiões pulsantes nas placas que receberam os corpos embrióides originados em placas não aderentes ao invés de gotas.



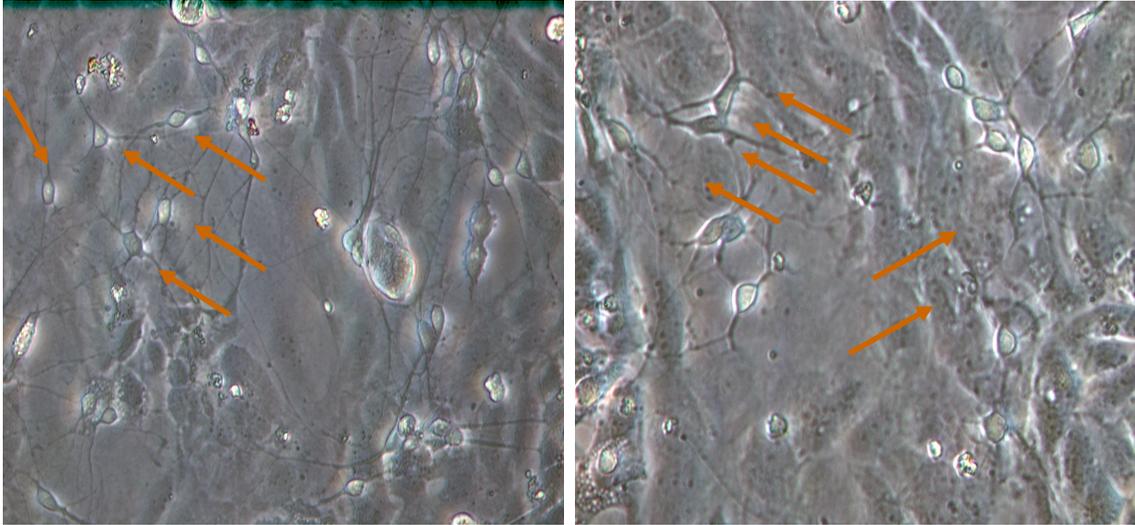
**Figura 9:** Monocamada com células em forma epitelioide durante o estágio de seleção das células nestina-positivas. As setas indicam regiões onde as células pulsavam, com células de morfologia diferente. Aumento de 100x.

Ao final do estágio 5, além de um crescimento em monocamada na placa, as células apresentavam, também, pequenos *clusters*, semelhantes a ilhotas pancreáticas, que foram formados apenas no último estágio do processo (item 3.3.2 dos “Materiais e Métodos”), quando se retirou o bFGF e adicionou-se Nicotinamida (um fator que reconhecidamente auxilia na indução de diferenciação de ilhotas pancreáticas) ao meio de cultura. Estes *clusters* estão representados na figura 10.



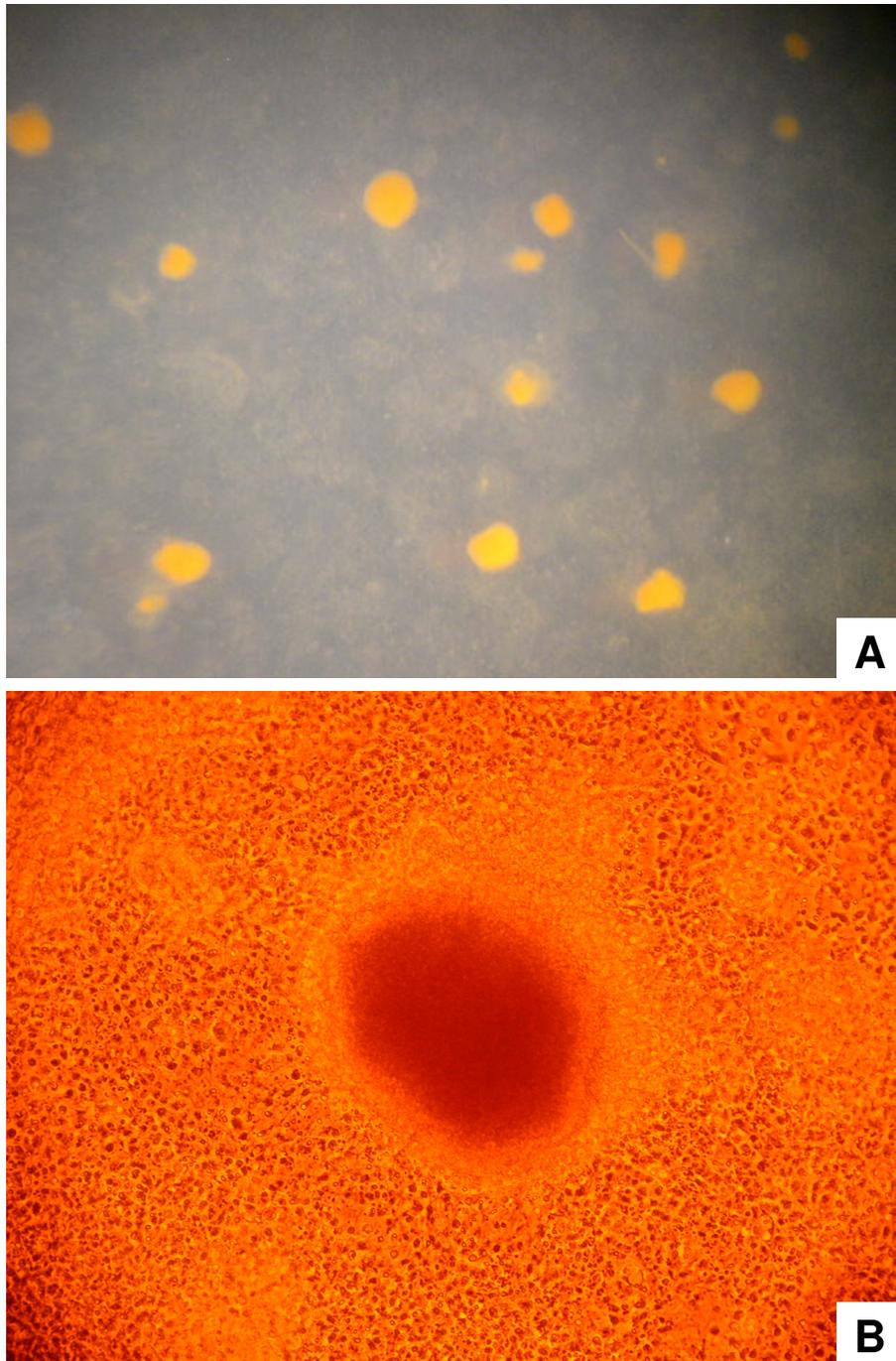
**Figura 10:** Crescimento em monocamada com a formação de *clusters* similares a ilhotas pancreáticas ao final do processo de diferenciação. A - culturas diferenciadas, evidenciando o aparecimento de *clusters* similares a ilhotas, após o tratamento com nicotinamida e, B - sem o tratamento. Aumento de 100x.

Durante este estágio eram observados também outros tipos celulares, além das células epitelióides que faziam parte da monocamada e dos *clusters*. Assim, eram encontradas na placa regiões que pulsavam mesmo ao final do processo de diferenciação, além de outros tipos celulares similares a neurônios, com corpos celulares bem grandes. Estes últimos formavam uma intensa “rede” ao redor dos *clusters*, como já descrito (Lumelsky et al., 2001). Alguns destes “neurônios” estão demonstrados na figura 11.



**Figura 11:** Células similares a neurônios encontradas na cultura ao final do processo de diferenciação. As setas indicam as regiões dos corpos celulares. Os axônios eram alongados e formavam uma rede ao redor dos *clusters*. Aumento de 200x.

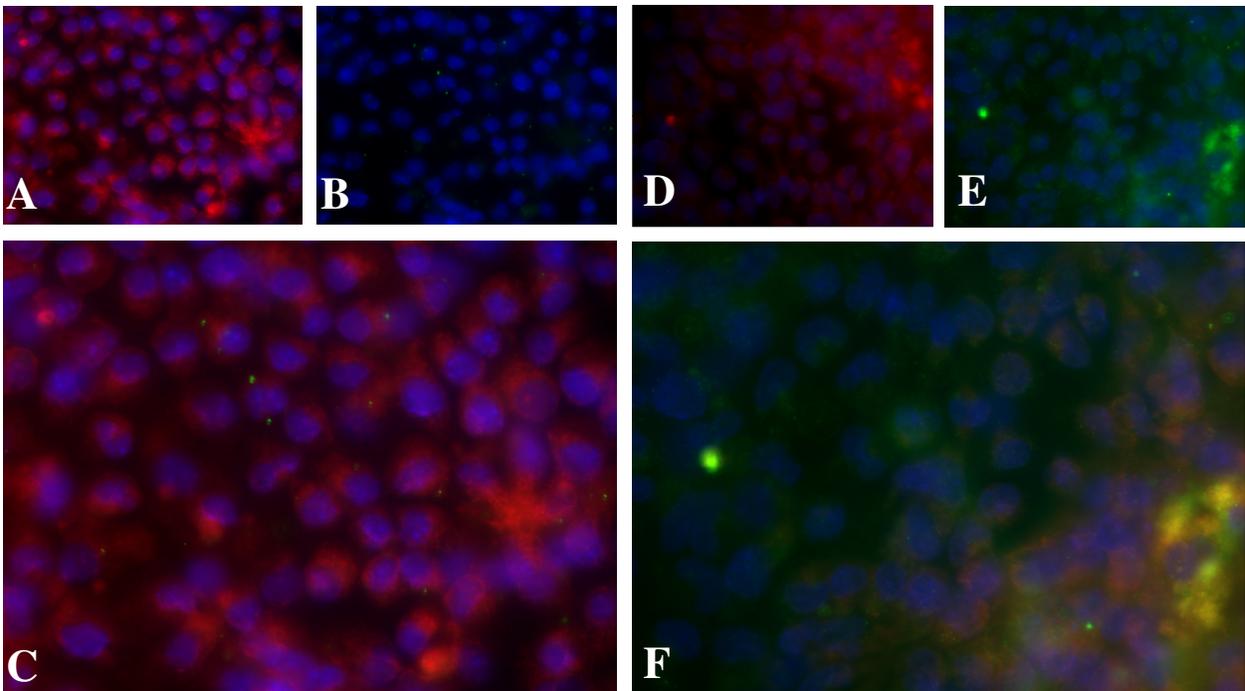
Ao final do estágio 5, submetemos as culturas à coloração com ditizona, um corante que se liga a íons  $Zn^{2+}$ , os quais estão presentes nos grânulos de insulina. Dessa forma, foi possível identificar células que estão acumulando insulina, hormônio secretado pelas células beta-pancreáticas diferenciadas, apenas nas culturas que foram tratadas com nicotinamida. O resultado desta coloração encontra-se na figura 12.



**Figura 12:** *Clusters* diferenciados de células-tronco embrionárias de camundongo coram positivamente com ditizona, demonstrando acúmulo de insulina. A – Foto sob estéreomicroscópio, demonstrando vários *clusters* corados na placa, aumento 40x e B – Foto sob microscópio invertido, demonstrando o núcleo do *cluster* corado em vermelho; aumento 200x.

Ao final do estágio 5, submetemos as células à uma reação de imunofluorescência para insulina, nestina e Pdx-1. Insulina é o hormônio

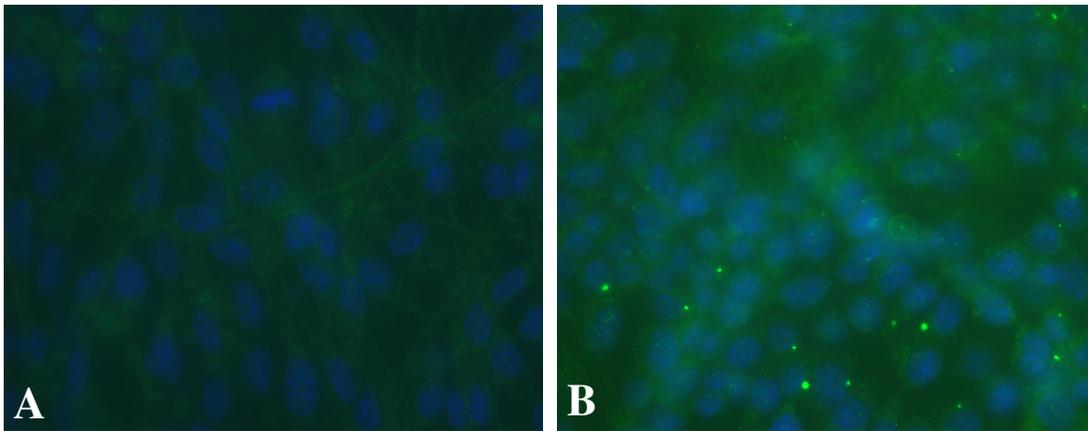
secretado por ilhotas pancreáticas diferenciadas. Nestina é uma proteína de microfilamento que foi descrita primeiramente como um marcador de “stem cells” presentes no tecido nervoso e, posteriormente, foi detectada sua presença também em tecido pancreático. PDX-1 é um gene “homeobox” de células pancreáticas que é expresso durante o processo de organogênese pancreática e durante a diferenciação de ilhotas pancreáticas (Fernandes et al., 1997; McKinnon et al., 2001). Os resultados obtidos ao final de todo o processo de diferenciação encontram-se na figura 13.



**Figura 13:** Imunofluorescência de células-tronco embrionárias de camundongos ao final do processo de diferenciação. A) Insulina – Texas Red, Núcleos – DAPI. B) Nestina – FITC, Núcleos – DAPI. C) Sobreposição das imagens de A e B. D) Insulina – Texas Red, Núcleos – DAPI. E) PDX-1 – FITC, Núcleos – DAPI. F) Sobreposição das imagens de D e E. Aumento de 600x.

Os resultados da figura 13 mostram que ao final do processo de diferenciação, praticamente todas as células apresentavam marcação para insulina (painéis A e D), poucas células ainda apresentavam marcação para PDX-1 (painel E), e quase nenhuma apresentava marcação para nestina (painel F). É possível observar que o sinal de nestina, praticamente

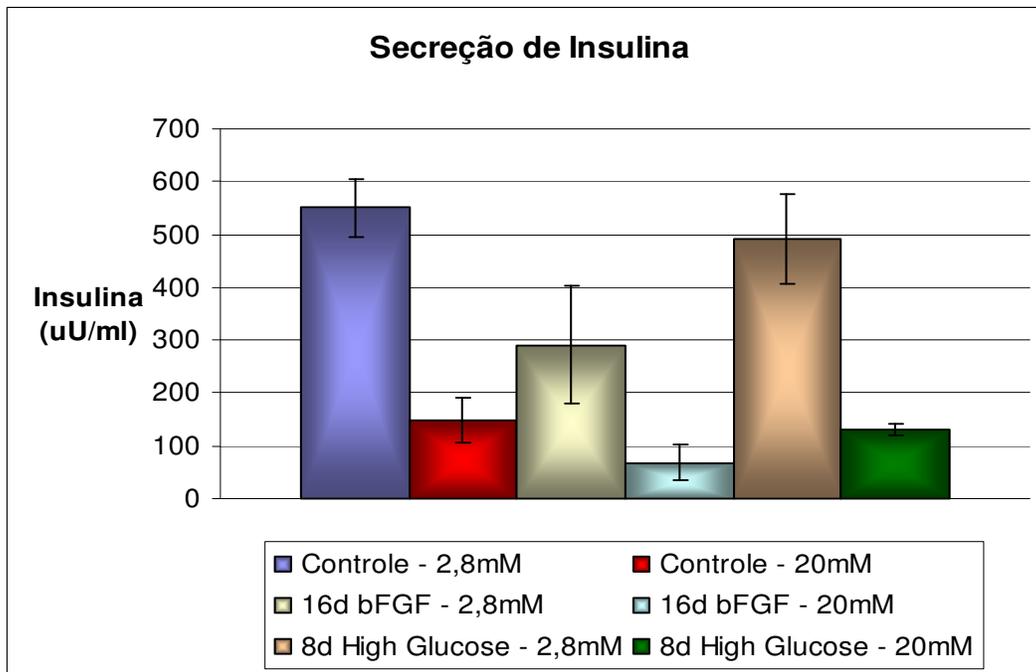
inexistente ao final do processo de diferenciação (painel B), teve um aumento durante a seleção (estágio 3) e expansão da progenitoras (estágio 4), como demonstrado na figura 14.



**Figura 14:** Intensidade do sinal de nestina durante o processo de diferenciação. A) 6º dia de Seleção. B) 6º dia de Expansão. Nestina – FITC, Núcleos – DAPI. Aumento de 600x.

Como havíamos conseguido reproduzir os resultados de Lumelsky e colaboradores (Lumelsky et al., 2001) tentamos melhorar os resultados obtidos por aquele grupo. O período de expansão das progenitoras (estágio 4) é crucial para a execução deste protocolo, uma vez que, em teoria, apenas as células progenitoras endócrinas responderam ao estímulo com o agente proliferativo (bFGF) após terem sido previamente selecionadas no meio sem a adição de soro. Nossa estratégia baseou-se em expandir por um período de tempo maior do que o protocolo original (14 dias no lugar de apenas 7 dias), aumentando o rendimento de células nestina-positivas, e assim levando a maior proporção de células secretoras de insulina. Uma outra modificação foi o cultivo das células ao final do processo normal de diferenciação, em uma solução contendo alta concentração de glicose (Soria et al., 2000) por 7 dias, o que, supostamente promoveria a maturação das células e induziria tanto proliferação quanto a expressão de genes-chave na resposta fisiológica à glicose destas células. Para melhor

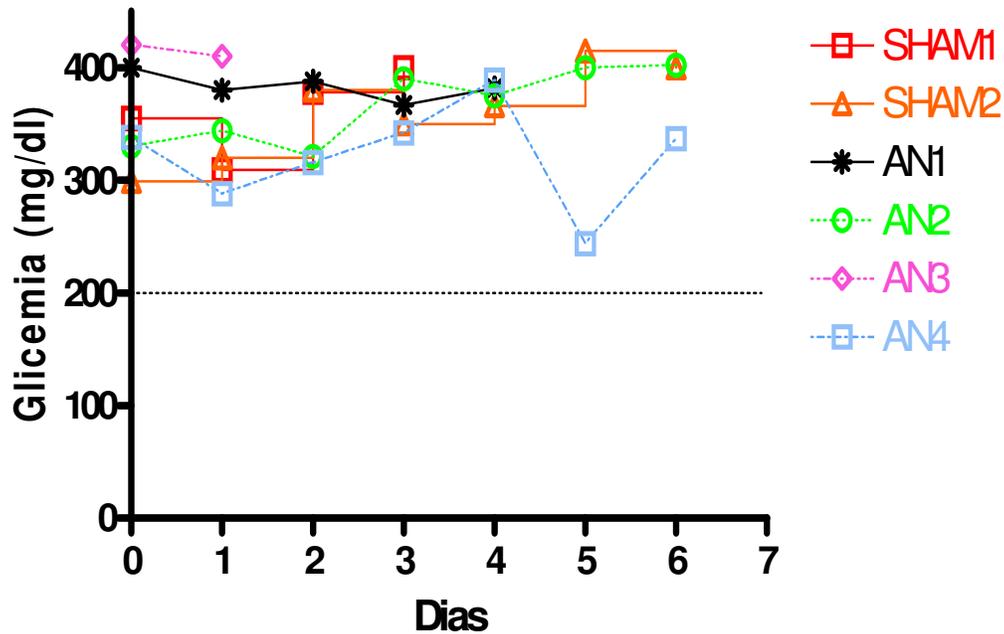
caracterizar qual dos protocolos levava ao melhor resultado, realizamos uma incubação estática com diferentes concentrações de glicose para analisar a capacidade destas células de responderem ao estímulo, dosando no meio de cultura a quantidade de insulina liberada por estas células. O gráfico representativo dos resultados encontra-se na figura 15.



**Figura 15:** Secreção de insulina em resposta ao estímulo com glicose das células ES ao final do processo de diferenciação e com diferentes protocolos. Resultados obtidos em triplicatas de três experimentos independentes.

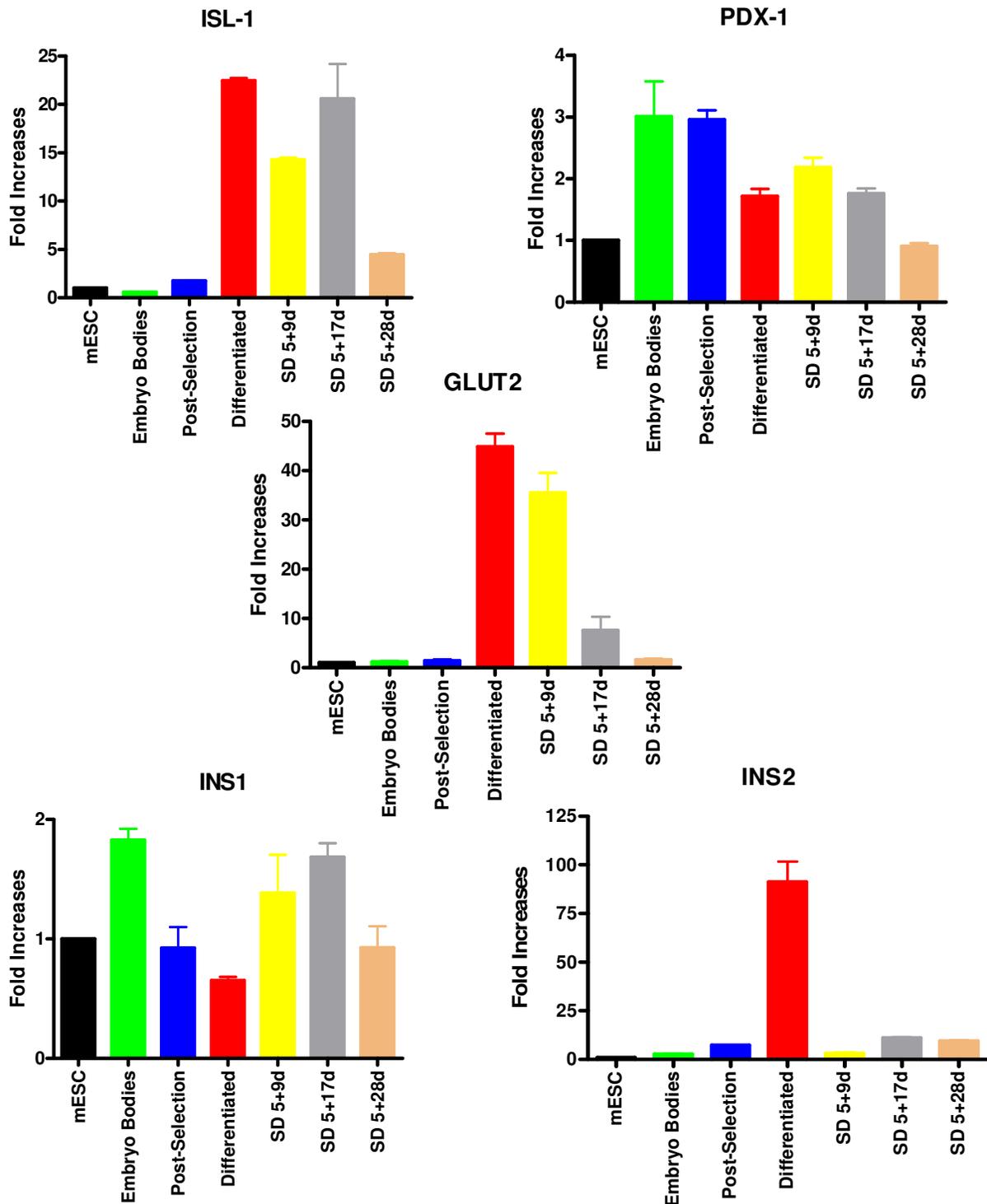
As células diferenciadas foram então implantadas em animais diabéticos visando avaliar sua capacidade de normalizar o diabetes *in vivo*. Os animais foram diabetizados com uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (200mg/kg de animal) e após 2-3 dias estes já se encontravam hiperglicêmicos (glicemia acima de 200mg/dl de sangue). Foram utilizados 6 animais: 2 *SHAM*, 2 que receberam  $1 \times 10^6$  e outros 2 que receberam  $1 \times 10^7$  células diferenciadas. Após o implante, a glicemia foi medida todos os dias entre 16:00h e 18:00h (período de jejum nos animais)

durante 7 dias. Nem todos os animais sobreviveram aos 7 dias. Os resultados das medidas da glicemia nos animais encontram-se na figura 16.



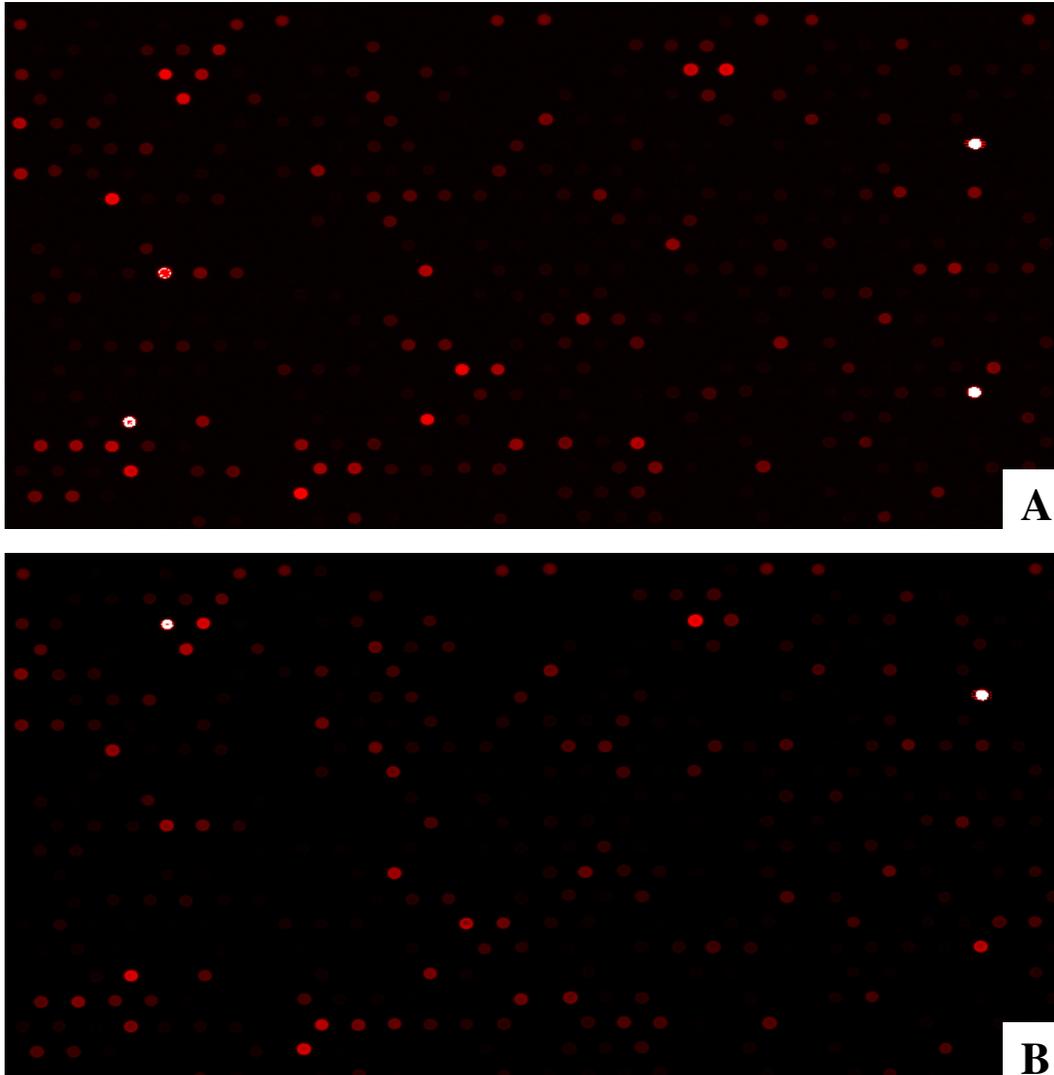
**Figura 16:** Implante de células-tronco embrionárias de camundongos diferenciadas em células secretoras de insulina em animais imunodeficientes diabéticos. AN1 e AN2 receberam  $1 \times 10^6$  células e AN3 e AN4 receberam  $1 \times 10^7$  células. SHAM simulados com PBSA. Dia 0 era o dia do implante.

Completado todo o processo de diferenciação, amostras de RNA extraído das culturas diferenciadas, assim como daquelas etapas intermediárias durante a diferenciação, foram extraídas e submetidas à experimentos de *Real-Time PCR* para análise molecular da diferenciação, com genes de camundongo relacionados à linhagem pancreática (ISL-1, PDX-1, GLUT2, INS1 e INS2) e assim, avaliar em qual protocolo se obteria uma maior indução na expressão desses genes. Foram analisados RNAs das amostras indiferenciadas (mESC), Corpos Embrionários (Embryo Bodies), final do estágio 3 (seleção – Post-Selection) e durante etapas da Diferenciação Espontânea (SD5+9d, SD5+17d e SD5+28d). Os resultados desses experimentos encontram-se na figura 17.



**Figura 17:** Expressão gênica diferencial medida por *Real-Time PCR*, dos genes de camundongo relacionados à diferenciação na linhagem pancreática. Amostras de RNA foram extraídas das células indiferenciadas (mESC), Corpos Embrionários (EBs), final do estágio 3 (Post-selection), Diferenciadas (Differentiated) e em Diferenciação Espontânea (SD5+9d, SD5+17d e SD5+28d). Resultados obtidos em triplicatas de três experimentos independentes.

#### 4.1.3. Análise da expressão gênica diferencial após a diferenciação de ESCs murinas em células produtoras de insulina através de *CodeLink Bioarrays*



**Figura 18:** Amostra da região das lâminas do *CodeLink Bioarrays* hibridizadas em: (A) cRNA obtido a partir das amostras diferenciadas e, (B) com cRNA obtido a partir das amostras não-diferenciadas. Os *spots* em branco são aqueles que estouraram o limite de detecção.

A amostra diferenciada segundo o protocolo descrito nos “Materiais e Métodos” (Lumelsky et al., 2001) foi selecionada e deu-se início aos experimentos com as lâminas de *CodeLink Bioarray*. O sistema CodeLink é baseado em *arrays* pré-fabricados contendo oligonucleotídeos dispostos em lâminas de vidro. As lâminas utilizadas neste sistema são tratadas

previamente com um polímero hidrofóbico, formando uma matriz tridimensional onde são immobilizados os oligonucleotídeos. Além de possibilitar o aumento do número de oligos immobilizados por lâmina, esta matriz permite que o acesso da sonda aos oligos seja facilitado, aumentando a sensibilidade da técnica. Outras vantagens decorrem da característica hidrofóbica do polímero, inibindo ligações inespecíficas da sonda aos oligonucleotídeos e à lâmina de vidro, diminuindo o “background”, além de diversos recursos que permitem uma precisão muito grande na aplicação dos oligonucleotídeos à lâmina e uma análise posterior de qualidade de cada *spot*, permitindo uma grande reprodutibilidade dos resultados.

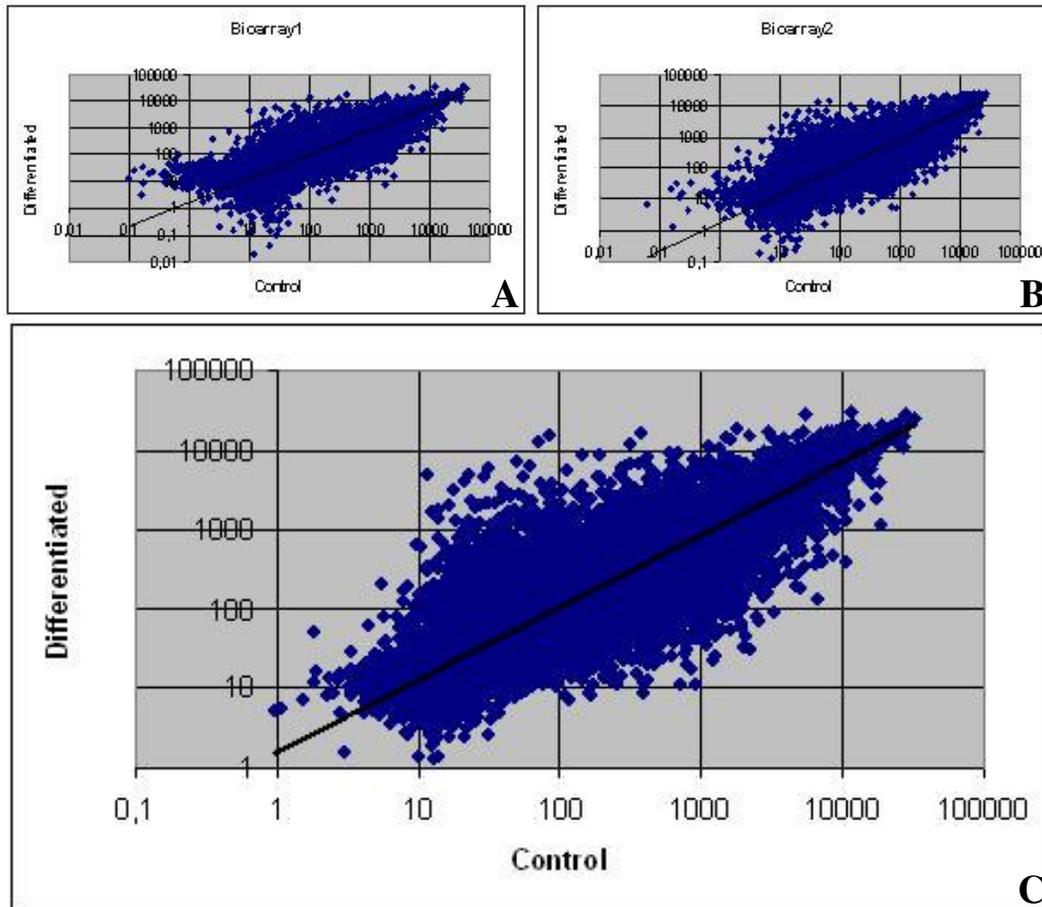
Os RNAs foram submetidos à transcrição reversa, gerando cDNAs, e logo após foram gerados os cRNAs biotinilados, os quais foram usados durante a hibridização das lâminas.

Neste projeto foi utilizado o *CodeLink Mouse Whole Genome Bioarray*, que é constituído por 34.967 oligonucleotídeos derivados de genes depositados no GenBank, RefSeq e Unigene até o mês de Abril do ano de 2004. Cada oligo possui 20 nucleotídeos, tendo sido desenhado de forma a ser específico para o gene analisado. Foram usadas quatro lâminas, sendo duas hibridizadas com cRNA das amostras indiferenciadas e duas com cRNA das amostras diferenciadas, uma vez que os *spots* na lâmina não se encontram em duplicata. As sondas foram preparadas seguindo fielmente as especificações do fabricante.

As imagens foram adquiridas utilizando-se o escâner *GenePix 4000B* e a análise inicial foi realizada pelos programas *GenePix* e *CodeLink System Software*. Após a obtenção das imagens dos *bioarrays*, a intensidade de cada *spot* foi quantificada pelo programa *GenePix Pro*. Como descrito nos “Materiais e Métodos”, os *bioarrays* são pré-analisados

para identificação de *spots* que apresentam alguma irregularidade. Assim, os sinais referentes a esses *spots* foram previamente anulados através do programa *GenePix Pro*.

Posteriormente, o programa *CodeLink System Software* normaliza os dados em relação à mediana local, confere os controles positivos e negativos e permite a análise dos dados para réplicas da mesma sonda. Para a seleção dos genes diferencialmente expressos, inicialmente foi utilizada a normalização realizada através do mesmo programa. Assim, era calculada a razão do sinal entre as condições estudadas e esta comparada com um *cut-off* selecionado arbitrariamente. Posteriormente foi utilizado o método Support Vector Machine (SVR), implementado no pacote GEDI (Gene Expression Data Interpreter) (Fujita et al., 2007), desenvolvido em nosso próprio laboratório. Os resultados da normalização dos *bioarrays* encontram-se na figura 19.

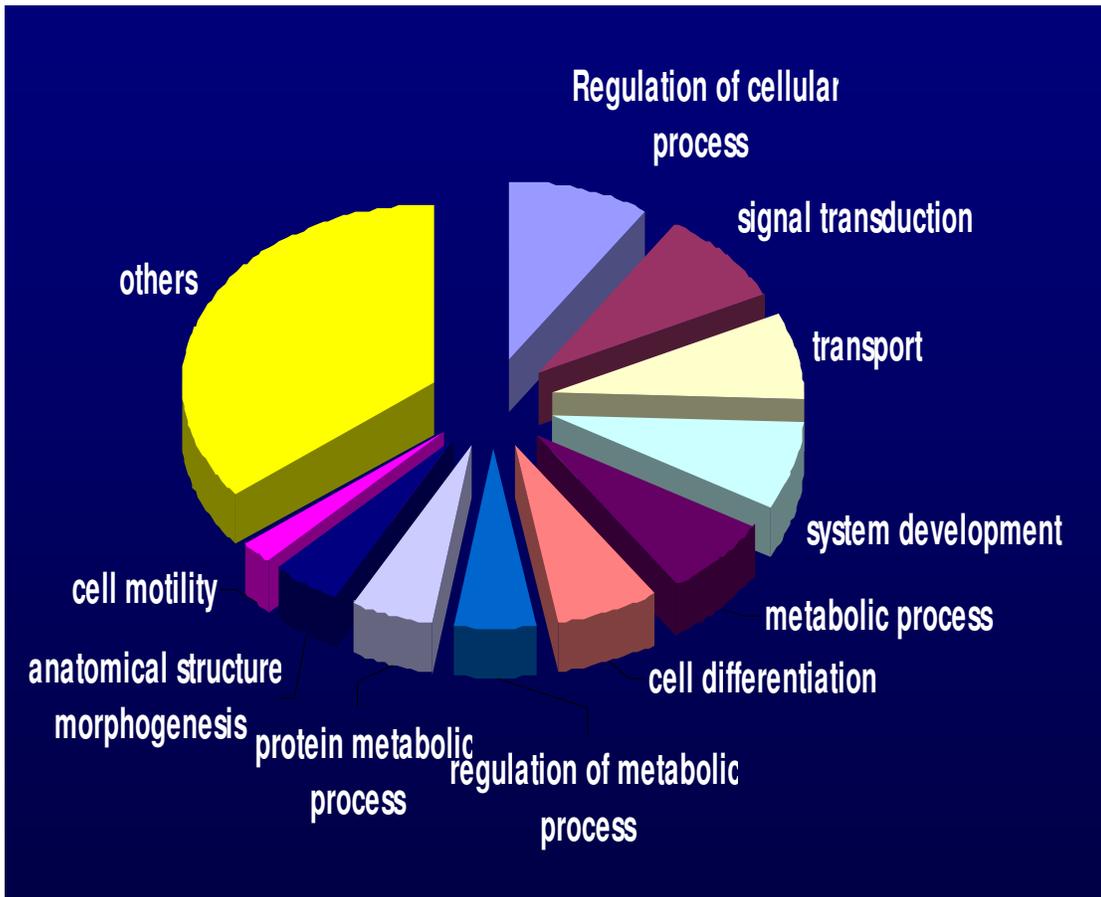


**Figura 19:** Resultados obtidos da hibridização dos *Bioarrays*. A- replicata 1, B- replicata 2 e, C- média dos resultados de A e B, normalizados pelo *GEDI* (Fujita et al., 2007).

O fabricante das lâminas sugere um *cut-off* de 1,2 como suficiente para a seleção dos genes diferencialmente expressos. Para nossa análise, estabelecemos um *cut-off* superior a 5, para evitarmos problemas de falsos positivos. Foram então selecionados 609 genes diferencialmente expressos, com índice de expressão pelo menos 5 vezes maior na amostra diferenciada, quando comparada com a amostra indiferenciada.

Para analisar a lista dos genes selecionados, foi utilizado o programa *FatiGO* (Al-Shahrour et al., 2004) que, entre outras funções, classifica os genes de acordo com os critérios do *Gene Ontology Consortium*, ou seja, componente celular, processo biológico e função molecular.

A partir da classificação do *FatiGO*, aproximadamente 5% dos genes foram relacionados como pertencentes à processos de diferenciação celular, quando classificados por processos biológicos. A distribuição dos genes por função encontra-se na figura 20.



**Figura 20:** Classificação do *FatiGO* por processos biológicos dos 609 genes selecionados como super-expressos nas amostras diferenciadas.

A partir da lista obtida do *FatiGO*, foram selecionados 16 genes como sendo relacionados a processos de diferenciação celular e que não tinham função descrita na diferenciação de células beta pancreáticas, tanto de camundongos como de humanos. Foram excluídos da listagem os que já tinha participação conhecida em tal processo (Neurogenin3, PDX-1, etc). Os genes foram selecionados a partir das lâminas de *CodeLink* com o auxílio dos programas *FatiGO*, *Blast* e *Blat*. A seqüência do mRNA desses

genes foi localizada nos bancos de dados acima citados e foram desenhados *primers* para *Real-Time PCR* para confirmação da indução da expressão desses genes. A tabela 1 relaciona os genes selecionados com o aumento de expressão destes genes, pelo *CodeLink*.

**Tabela 1:** Genes selecionados durante o processo de diferenciação.

| <b>Gene</b> | <b>Função</b>                                                            | <b>Indução</b> |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Aldh1a2     | Formação do Eixo Neural<br>Síntese Embrionária de RA                     | 7,4 ± 0,45     |
| Ascl1       | Desenvolvimento do SNC                                                   | 6,6 ± 0,69     |
| CXCL12      | Desenvolvimento vascular cerebral,<br>hematopoiese e cardiogênese        | 21,5 ± 1,23    |
| CXCR4       | Desenvolvimento vascular cerebral,<br>hematopoiese e cardiogênese        | 13,4 ± 7,62    |
| Decorin     | Interações epitélio-mesenquima durante a<br>organogênese                 | 432 ± 46,36    |
| DLX         | Produção de neurônios GABAérgicos durante<br>desenvolvimento embrionário | 6,7 ± 1,64     |
| DNER        | Diferenciação do SNC                                                     | 11,1 ± 0,05    |
| EN1         | Neurogênese tardia                                                       | 7,5 ± 1,21     |
| Kitl        | Desenvolvimento embrionário e hematopoiese                               | 10,7 ± 1,99    |
| MGLAP       | Envolvido no desenvolvimento ósseo                                       | 52,8 ± 9,2     |
| Noggin      | Envolvido na embriogênese precoce                                        | 8,7 ± 0,30     |
| Nrp1        | Desenvolvimento embrionário de vasos                                     | 17,8 ± 4,27    |
| Ntrk        | Desenvolvimento de SNC e periférico                                      | 6,8 ± 0,85     |
| Pbx1        | Diferenciação Endócrina e Exócrina                                       | 5,6 ± 0,01     |
| Tenascin C  | Cardiogênese                                                             | 67,2 ± 3,94    |
| Zic1        | Neurogênese                                                              | 63,1 ± 24,93   |

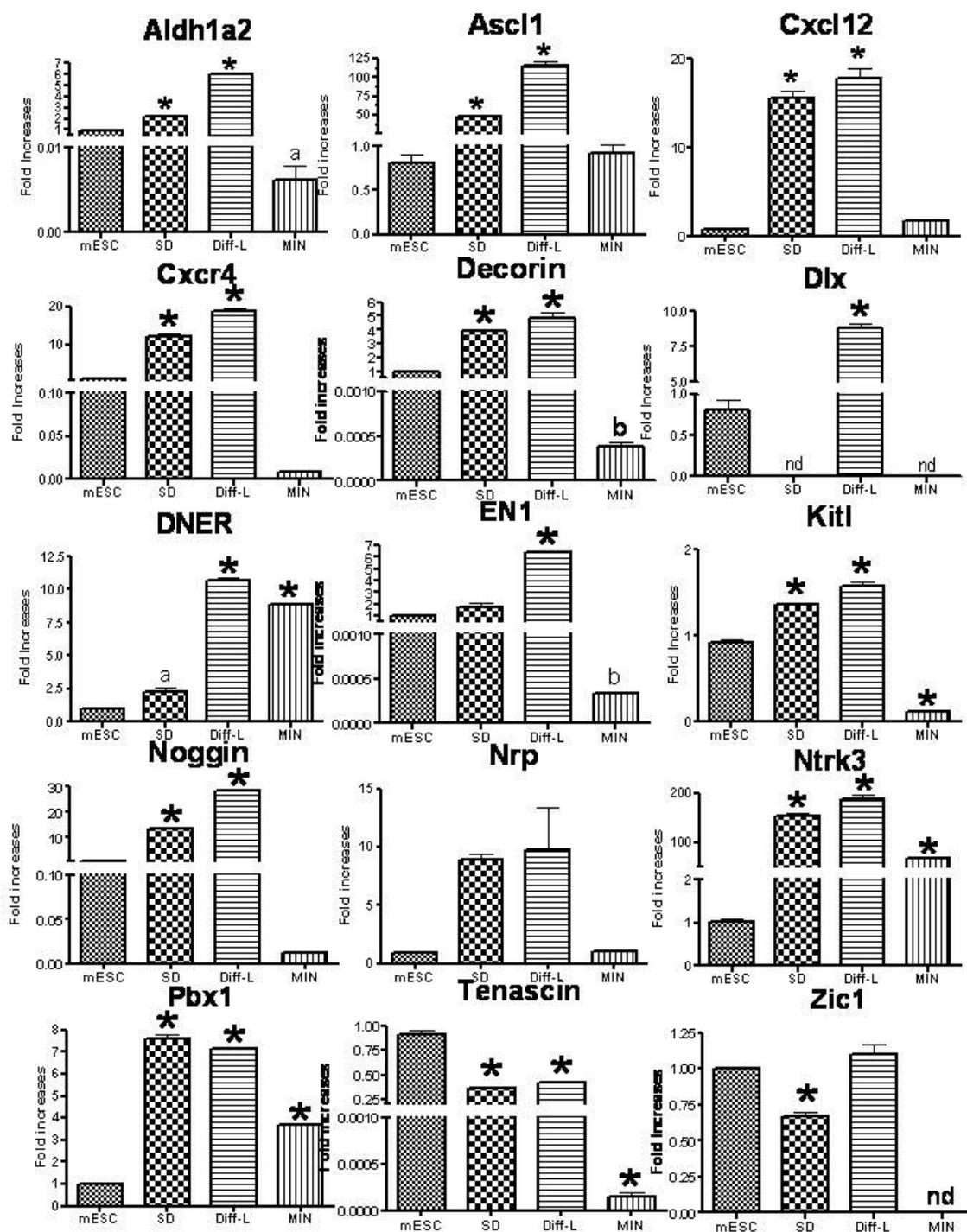
#### 4.1.3. Confirmação da expressão gênica diferencial por *Real-Time PCR*

Antes de iniciar a análise dos genes selecionados, foi calculada a eficiência dos *primers* sintetizados. Para isso, foram realizadas reações de *Real-Time PCR* utilizando como *template* diluições seriadas (1:20, 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320) de um *mix* de cDNA das amostras que seriam analisadas. Após a reação, foi elaborado um gráfico do logaritmo da diluição utilizada em função do Ct obtido, sendo que a eficiência do *primer* foi calculada em função do coeficiente angular da curva obtida. Foram aceitos aqueles *primers* que apresentaram uma eficiência entre 80 e 100% e com um  $R^2$  maior que 0,85.

Como não haviam dados na literatura que indicassem os controles adequados para o sistema estudado, optou-se por se basear nos dados do *CodeLink* para esta seleção. Comparando-se as lâminas das amostras diferenciadas com as lâminas das amostras indiferenciadas, observou-se que para o gene do GAPDH havia uma indução de 0,8 vezes. A  $\beta$ -Actina, para a qual haviam *primers* também, não estava representada na lista de genes do *CodeLink*, entretanto haviam outras isoformas de actina no *bioarray*, e estas, assim como as isoformas de  $\beta$ -Tubulina apareciam sempre como induzidas mais de 2 vezes nas lâminas hibridizadas com as amostras diferenciadas. O gene para HPRT apresentou uma indução superior a 2,5 vezes nas lâminas das amostras diferenciadas. Portanto, dentre as possibilidades, o controle interno feito pelo GAPDH mostrou-se o mais confiável, e passou a ser utilizado em todos os experimentos de *Real-Time PCR*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com amostras de RNAs obtidos a partir de três experimentos independentes.

Após cada reação de *Real-Time PCR*, definiu-se um *threshold* de 0,25 e, com base neste *threshold*, o programa *7300 System SDS Software* forneceu os Cts que foram utilizados para calcular os  $\Delta$ Cts e o aumento de

expressão em relação às amostras indiferenciadas (mESC). Foram utilizadas 3 outros cDNAs além da amostra indiferenciada: SD – Spontaneous Differentiation, a partir de amostras diferenciadas espontaneamente, Diff-L – induzidas à diferenciação seguindo o protocolo de Lumelsky e colaboradores (Lumelsky et al., 2001), e cDNA obtido a partir do cultivo da linhagem MIN-6, uma linhagem de insulinoma de camundongos. Para análise dos dados, os aumentos na expressão das diferentes amostras foram submetidos ao programa Prism, onde após uma análise da variância unidirecional (*ANOVA One-way*), foi realizado um teste de Tukey, obtendo-se para cada gene as diferenças de expressão entre as amostras analisadas e a significância estatística de cada diferença, como demonstrado na figura 21. Foram consideradas as razões e significâncias entre cada uma das condições em relação à amostra indiferenciada.



**Figura 21:** Resultado do *Real-Time PCR* dos genes analisados. Representação gráfica de 15 genes dos 16 genes selecionados (não houve amplificação de MGLAP). No eixo das ordenadas estão representadas as diferenças de expressão em relação à amostra indiferenciada e no das abcissas, a amostra cujo cDNA foi utilizado como *template* para a reação. mESC – indiferenciadas, SD – diferenciação espontânea, Diff-L – Diferenciadas segundo o protocolo de Lumelsky e colaboradores e MIN – MIN6. \* $p < 0,001$  vs mESC, <sup>a</sup> $p < 0,01$  vs mESC e <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs mESC.

Nem todos os genes confirmaram sua expressão diferencial, como indicado pelos *bioarrays*. Alguns inclusive mostraram-se reprimidos pelo processo de diferenciação, como demonstrado na tabela 2.

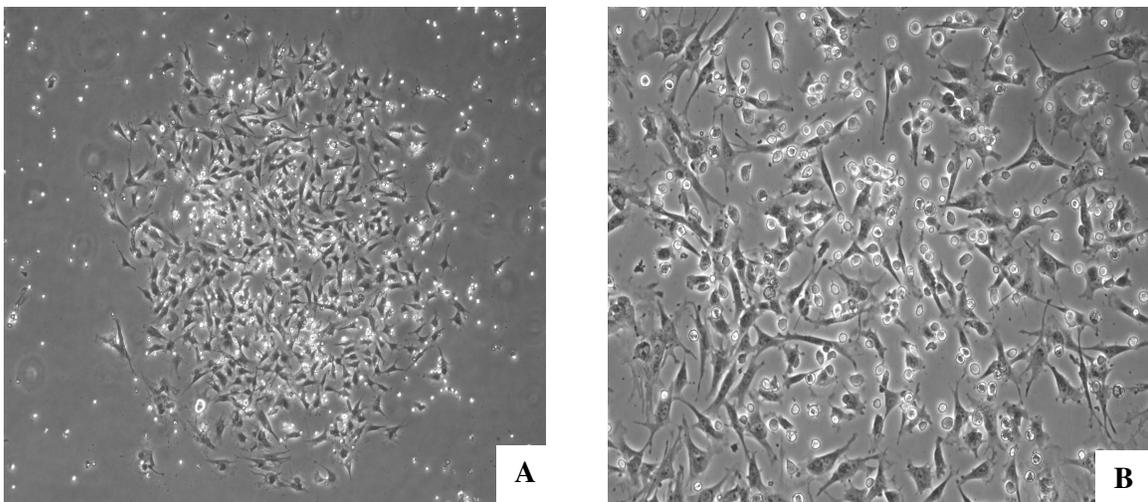
**Tabela 2:** Expressão diferencial dos genes selecionados pelos *bioarrays*, comparados pela expressão nos experimentos de *Real-Time PCR*. NO-Não Obtido

| <b>Gene</b> | <b>Indução(<i>CodeLink</i>)</b> | <b>Indução(<i>Q-PCR</i>)</b> |
|-------------|---------------------------------|------------------------------|
| Aldh1a2     | 7,4 ± 0,45                      | 5,9 ± 0,30                   |
| Ascl1       | 6,6 ± 0,69                      | 114 ± 9,23                   |
| CXCL12      | 21,5 ± 1,23                     | 17,8 ± 1,83                  |
| CXCR4       | 13,4 ± 7,62                     | 16,2 ± 4,70                  |
| Decorin     | 432 ± 46,36                     | 4,8 ± 0,60                   |
| DLX         | 6,7 ± 1,64                      | 8,8 ± 0,52                   |
| DNER        | 11,1 ± 0,05                     | 10,7 ± 0,24                  |
| EN1         | 7,5 ± 1,21                      | 6,4 ± 0,30                   |
| Kitl        | 10,7 ± 1,99                     | 1,5 ± 0,08                   |
| MGLAP       | 52,8 ± 9,2                      | NO                           |
| Noggin      | 8,7 ± 0,30                      | 28,4 ± 0,86                  |
| Nrp1        | 17,8 ± 4,27                     | 9,7 ± 6,28                   |
| Ntrk        | 6,8 ± 0,85                      | 189 ± 15,02                  |
| Pbx1        | 5,6 ± 0,01                      | 6,2 ± 1,65                   |
| Tenascin C  | 67,2 ± 3,94                     | 0,4 ± 0,01                   |
| Zic1        | 63,1 ± 24,93                    | 1,1 ± 0,10                   |

## 4.2. Células-tronco da medula óssea de rato

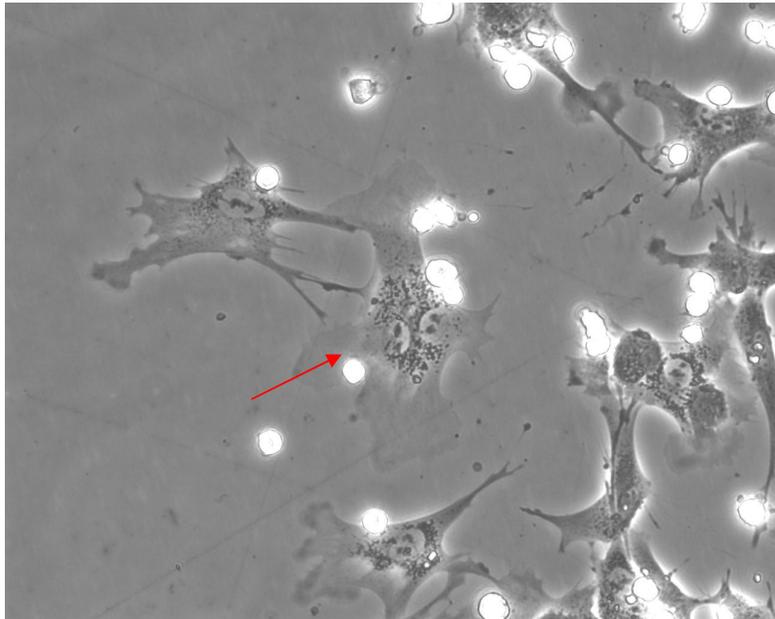
As culturas medulares foram obtidas como especificado nos Materiais e Métodos. Os animais foram sacrificados, de acordo com os preceitos éticos no uso de animais recomendados pelo COBEA, e suas patas traseiras eram dissecadas para obtenção dos fêmures (ossos longos). Após a dissecação dos fêmures, os ossos eram levados ao laboratório onde tinham suas epífises removidas para que pudesse ser feito o *flushing* através do osso e desta maneira obter as células da medula. Depois de realizado este procedimento, as células de medula óssea eram plaqueadas em placas tratadas com meio DMEM contendo 10% soro fetal bovino e antibióticos e mantidas em estufa à 37°C por 24h. Após este período de cultivo, as células não-aderentes eram descartadas e meio novo era adicionado.

As células aderentes de medula óssea de ratos, foram mantidas até o início da formação de colônias fibroblastóides (figura 22), reconhecidas como colônias de células-tronco mesenquimais, o que geralmente acontecia entre 1 e 2 semanas.



**Figura 22:** Formação de colônias de células de medula óssea de rato, com características fibroblastóides após 10 dias de cultivo das células que haviam aderido nas 24h iniciais do cultivo. As células que não aderiam em 24h eram descartadas e o meio trocado a cada 3-4 dias. Após 10 dias de cultivo começavam a surgir colônias com este aspecto. A- aumento de 40X. B- aumento de 100x.

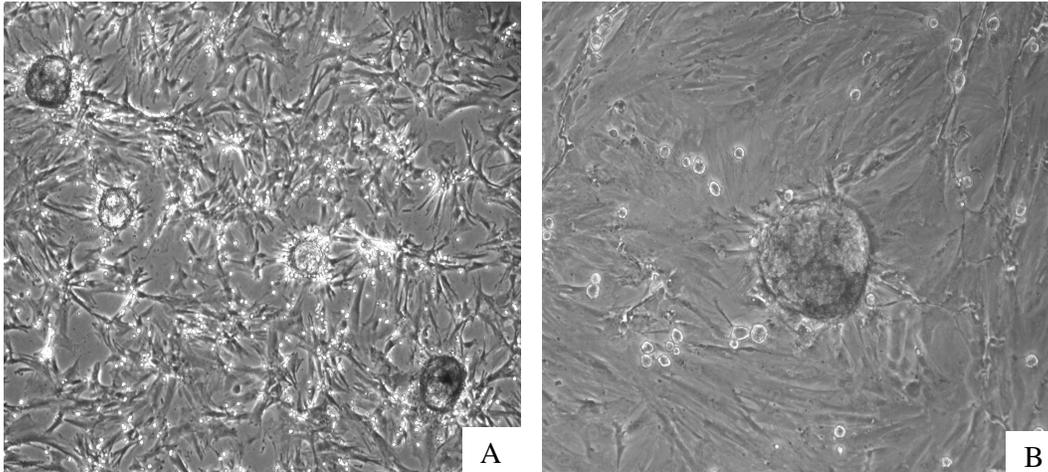
Estas células apresentavam-se com diferentes graus de granulação interna como mostrado na figura 23. O grau de granulação é um indicador do potencial proliferativo e de diferenciação da célula (Colter et al., 2000).



**Figura 23:** Granulação das Células-tronco Mesenquimais. Dependendo da quantidade de grânulos no interior da célula, podemos estimar seu potencial proliferativo e de diferenciação. Geralmente as menores e com mais grânulos são as que possuem maior capacidade de proliferação e diferenciação. A seta indica uma destas células em mitose. Aumento de 200x.

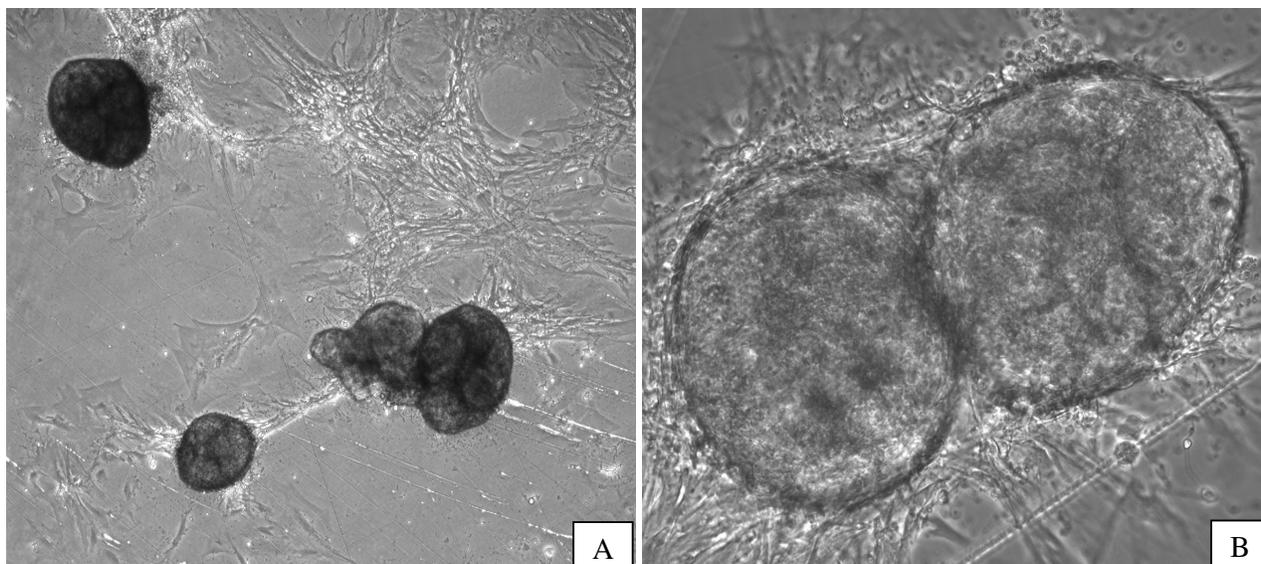
Quando as células de medula óssea de rato eram cultivadas em DMEM-HG suplementado com 10 % soro fetal bovino e alta concentração de glicose, adquiriam uma homogeneidade após 1 ou 2 passagens, sem contaminantes hematopoiéticos ou outros tipos celulares. Estas células foram induzidas a diferenciarem-se em células beta-pancreáticas, seguindo fielmente o protocolo publicado por Tang e colaboradores (Tang et al., 2004). Quando a confluência atingia seu limite, estas células começavam a se agrupar na forma de pequenos *clusters*, muito similares, em forma, à cultura de ilhotas pancreáticas (figura 24). Estes *clusters* aumentavam em tamanho e número com o passar do tempo. Foi observado que depois de

quatro meses de cultura, estes *clusters* não aumentam mais em seu tamanho e ainda, que seu desenvolvimento não ocorre antes de dois primeiros meses de cultivo.



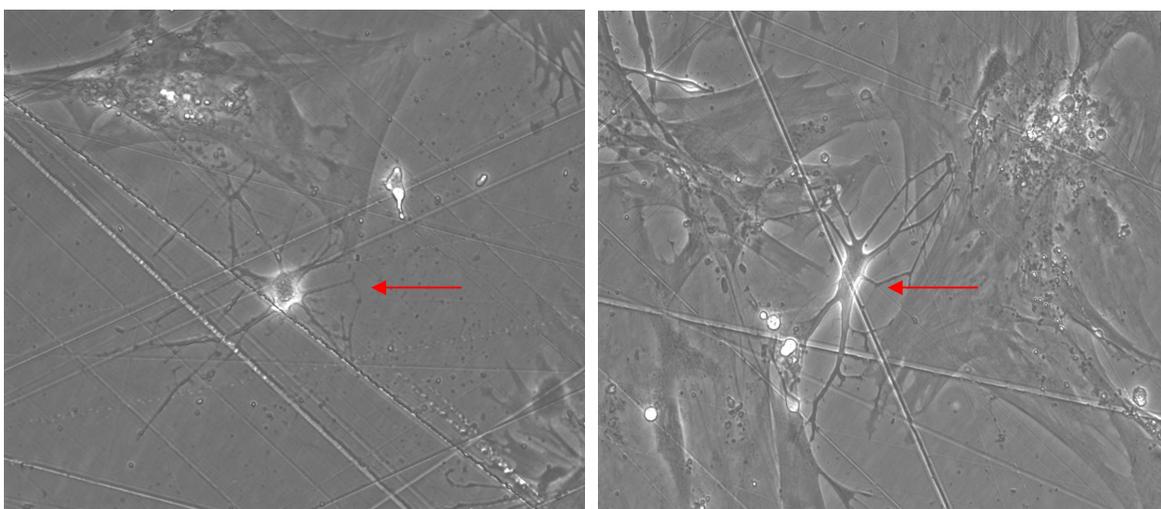
**Figura 24:** *Clusters* originados da fração aderente de medula óssea de ratos cultivados sob estímulo de alta concentração de glicose e alta densidade celular por 4 meses. Aumentos: A; 40x e B; 100x.

Interessantemente, estas culturas de células de medula óssea de ratos tratadas sob estímulo de alta concentração de glicose e alta densidade por longos períodos, tiveram um aumento no número e no tamanho dos *clusters* formados (figura 25), quando foi adicionado o tratamento com 10 mM de Nicotinamida por 7 dias, seguido por mais 7 dias com 10  $\eta$ M de Exendina 4.



**Figura 25:** Culturas de células de medula óssea de ratos após o tratamento de 7d com 10 mM de Nicotinamida seguidos de mais 7d com 10  $\eta$ M de Exendina 4. Aumentos: A; 40x e B; 100x.

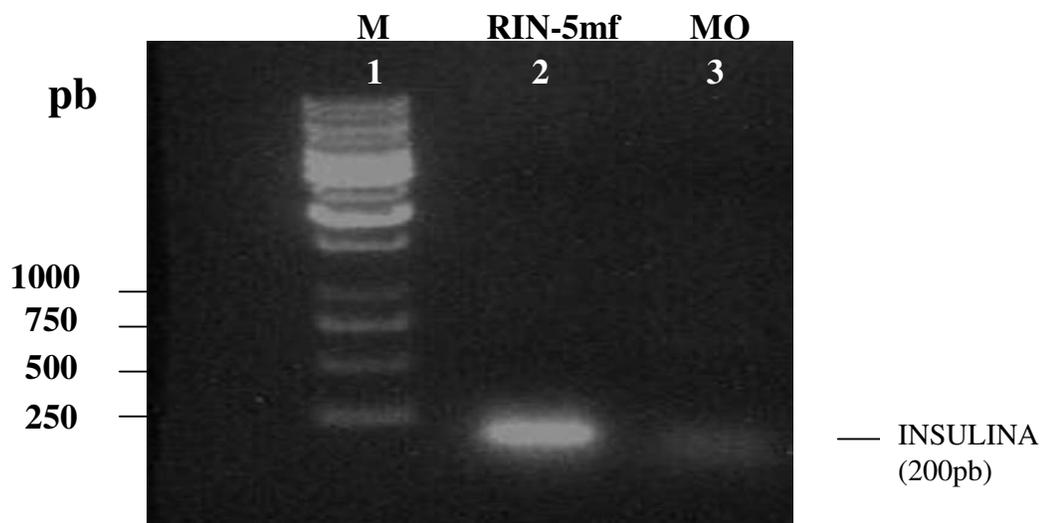
Por volta do 2º mês de tratamento, era possível observar outros tipos celulares (neurônios), como pode ser visto na figura 26.



**Figura 26:** Tipos celulares diferente dos *clusters*, observados durante o processo de diferenciação de células de medula óssea de ratos. As setas indicam tipos celulares similares à células do sistema nervoso. Aumento 200x.

Para verificar se o protocolo de diferenciação adotado foi eficaz, o RNA dessas culturas foi isolado, transcrito e analisado quanto a presença

do transcrito de insulina por amplificação através de PCR. Tanto em ratos como camundongos, existem dois genes que codificam para o gene da insulina, com 91% de identidade entre eles. Para evitar o problema de apenas um dos dois genes ser efetivamente expresso, escolheu-se um par de *primers* que hibridizava com as duas seqüências, ou seja, tanto com a insulina I, como com a insulina II. Como controle positivo, utilizou-se RNA extraído de células de insulinomas de rato, Rin-5mf, que reconhecidamente super-expressam ambos os genes da insulina (figura 27).



**Figura 27:** Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação dos genes das insulinas de rato. Canaleta 1: Padrão de peso molecular (M), Canaleta 2: cDNA de células RIN-5mf . Canaleta3: cDNA de células de medula óssea de ratos diferenciadas.

Como pode ser observado na figura 25, houve amplificação apenas no tubo onde o *template* era o cDNA de células Rin-5mf. Como houve amplificação, descartamos a possibilidade do *primer* não estar hibridizando, portanto acredita-se que o protocolo de diferenciação é que não estava adequado. Para confirmar estes resultados, foram feitas reações de *Real-Time PCR* para os genes INS1, INS2, PDX-1, ISL-1 e GLUT-2. Em nenhuma das reações obteve-se amplificação (dados não mostrados).

### **4.3. Células-tronco de Cordões Umbilicais**

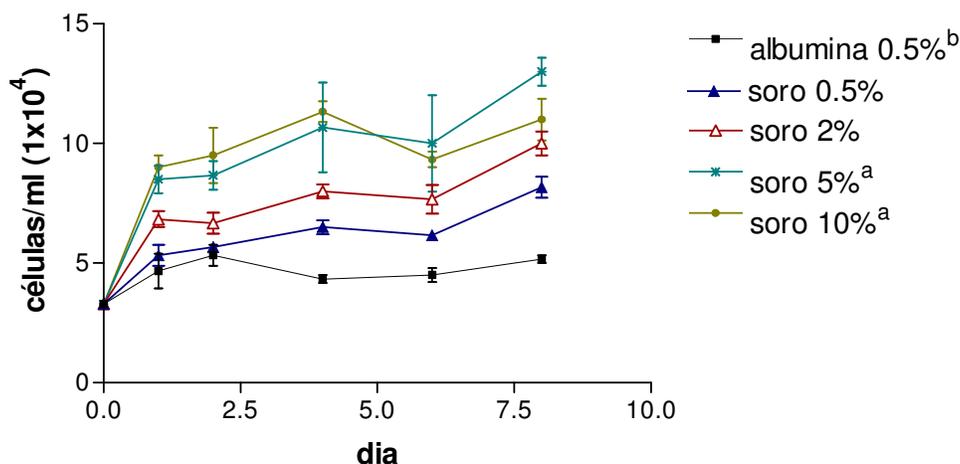
#### **4.3.1. Cordão Umbilical Congelado**

As amostras de sangue de cordão umbilical foram coletadas e congeladas no Banco de Sangue do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), sob a supervisão da Dr<sup>a</sup>. Andreza Alice Feitosa Ribeiro. As amostras utilizadas permaneceram congeladas por não mais do que quatro anos.

O rendimento médio de células mononucleadas foi de  $1,3 \cdot 10^8$  células/cordão, o que está dentro do que é previsto com base nos dados de literatura para rendimento de células mononucleadas de cordão umbilical. Todas as amostras apresentavam 98% de viabilidade no momento do descongelamento, sendo esta avaliada pelo método do Tripán Blue.

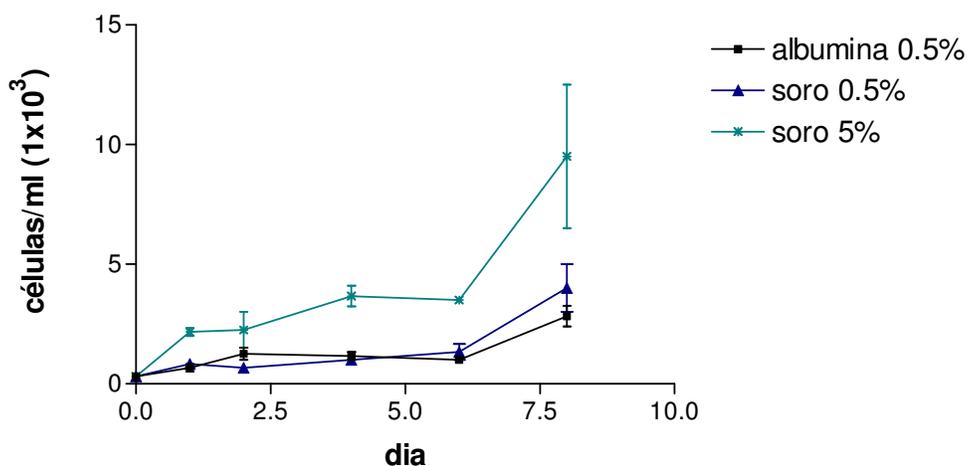
As células mononucleadas foram obtidas a partir do sangue de cordão umbilical, como descrito nos Materiais e Métodos e utilizadas em duas curvas de crescimento com diferentes concentrações de soro fetal bovino e duas densidades celulares diferentes para se avaliar qual a melhor condição de cultivo para estas células. Os resultados encontram-se nas figuras 28 e 29.

### Curva de Crescimento 1



**Figura 28:** Curva de crescimento 1. As células mononucleadas de sangue de cordão umbilical foram plaqueadas na densidade inicial de  $1.10^4$  células/cm<sup>2</sup> em placas de multiwell P48 e cultivadas durante 8 dias. Foram coletados pontos da curva nos dias 1, 2, 4, 6 e 8, todos em triplicata. A condição de cultivo com o meio RPMI+Glicose 5,6mM+0,5% BSA era a condição controle. b vs. a,  $p < 0,05$ .

### Curva de Crescimento 2

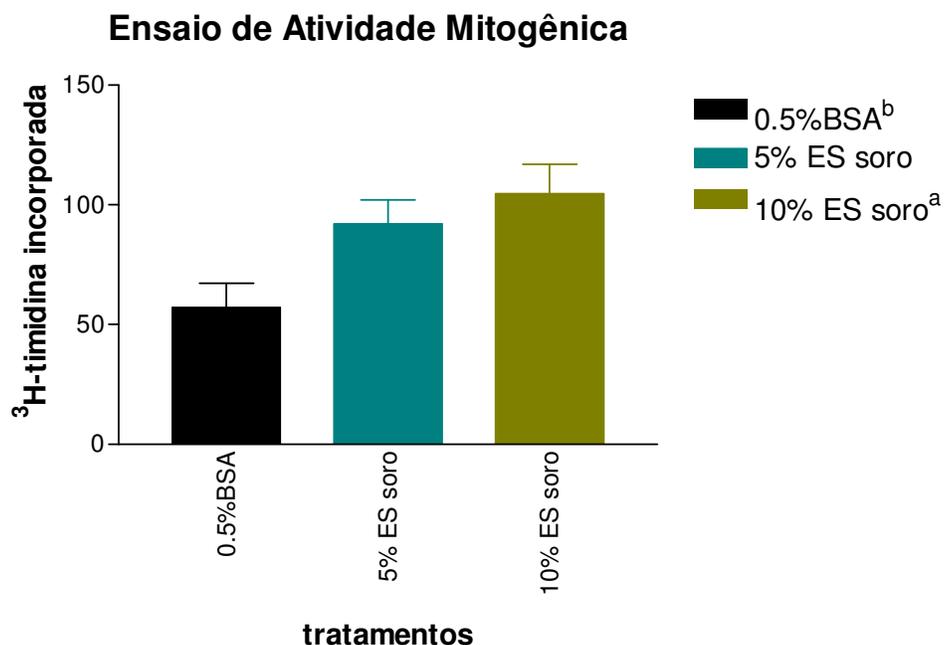


**Figura 29:** Curva de crescimento 2: As células mononucleadas de sangue de cordão umbilical foram plaqueadas na densidade inicial de  $1.10^3$  células/cm<sup>2</sup> em placas multiwell P48 e cultivadas durante 8 dias. Foram coletados pontos da curva nos dias 1, 2, 4, 6, e 8, todos em triplicata. A condição de cultivo com o meio RPMI+Glicose 5,6mM+0,5% BSA era a condição controle.

Em ambas as curvas pode-se observar que o crescimento das células é diretamente proporcional à concentração de soro do meio. A única

diferença significativa observada entre os diferentes tratamentos foi quando as células foram plaqueadas na densidade de  $1.10^4$  células/cm<sup>2</sup> e tratadas com concentrações de SFB-ES de 5 e 10%, quando comparados com os controles (P<0,05). Não foi observada diferença significativa entre as amostras cultivadas em 5% ou 10% de soro, demonstrando que o crescimento máximo destas células pode ser alcançado com 5% de SFB.

Para corroborar os dados da curva de crescimento, foi feito um ensaio de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina para analisar a capacidade mitogênica das diferentes concentrações de soro. Os resultados deste experimento encontram-se na figura 30.



**Figura 30:** Ensaio de atividade mitogênica. Células mononucleadas de sangue de cordão umbilical foram plaqueadas na densidade de  $1.10^4$  células/cm<sup>2</sup>, carenciadas para soro por 24h e depois estimuladas com diferentes concentrações de SFB, na presença de <sup>3</sup>H-timidina. A incorporação deste isótopo na nova cadeia de DNA sintetizada pela célula reflete a atividade mitogênica de cada tratamento. b vs. a, p<0,05.

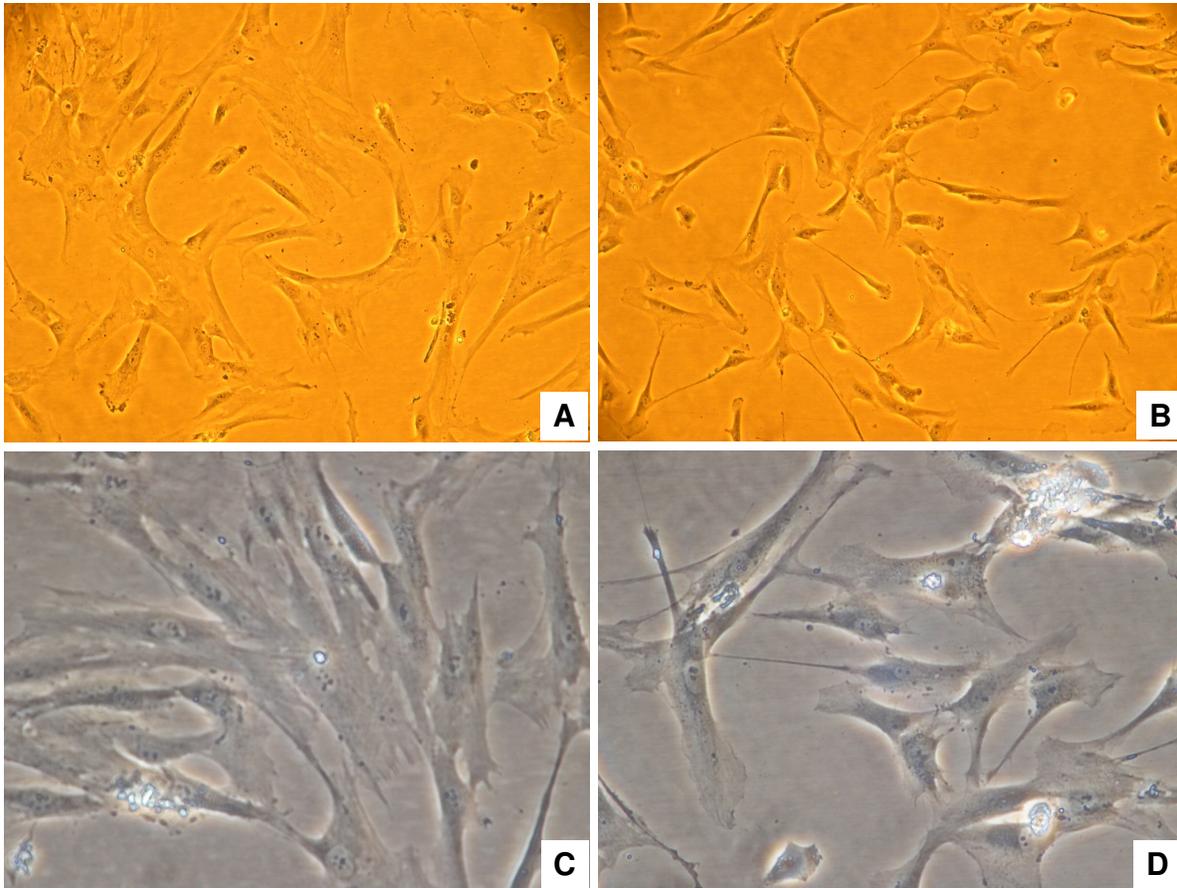
Como já observado nas curvas de crescimento, apenas altas concentrações de soro induzem um crescimento significativamente diferente quando comparado com o controle.

#### **4.3.1. Cordão Umbilical Fresco**

Os cordões umbilicais, assim como o sangue do cordão foram coletados no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP), campus da capital, em colaboração montada com esta instituição e aprovada (Setembro de 2004) e tutoriada pelo Dr. Paulo Bastos. Todo o protocolo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do HU (CEP-HU) e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) em Brasília. Todos os cordões foram coletados após consentimento informado das famílias e todas as parturientes foram devidamente informadas sobre a natureza da pesquisa. Foram coletados cordões tanto de partos normais quanto de cesarianas e sangue do cordão umbilical, apenas de partos normais.

O sangue e o cordão foram coletados e processados como descrito nos Materiais e Métodos. Depois de 2-3 passagens, as células tanto do sangue (figura 31A e C) quanto da parede (figura 31B e D), adquirem uma morfologia homogênea e crescem de maneira uniforme. Apesar de alguns trabalhos já descreverem uma alta plasticidade para as células provenientes destas duas fontes ([Minguell et al., 2001](#); [Romanov et al., 2003](#); [Panepucci et al., 2004](#); [Secco et al., 2008](#)), ainda não se sabe se estas células são as mesmas e qual a real potencialidade de cada uma delas.

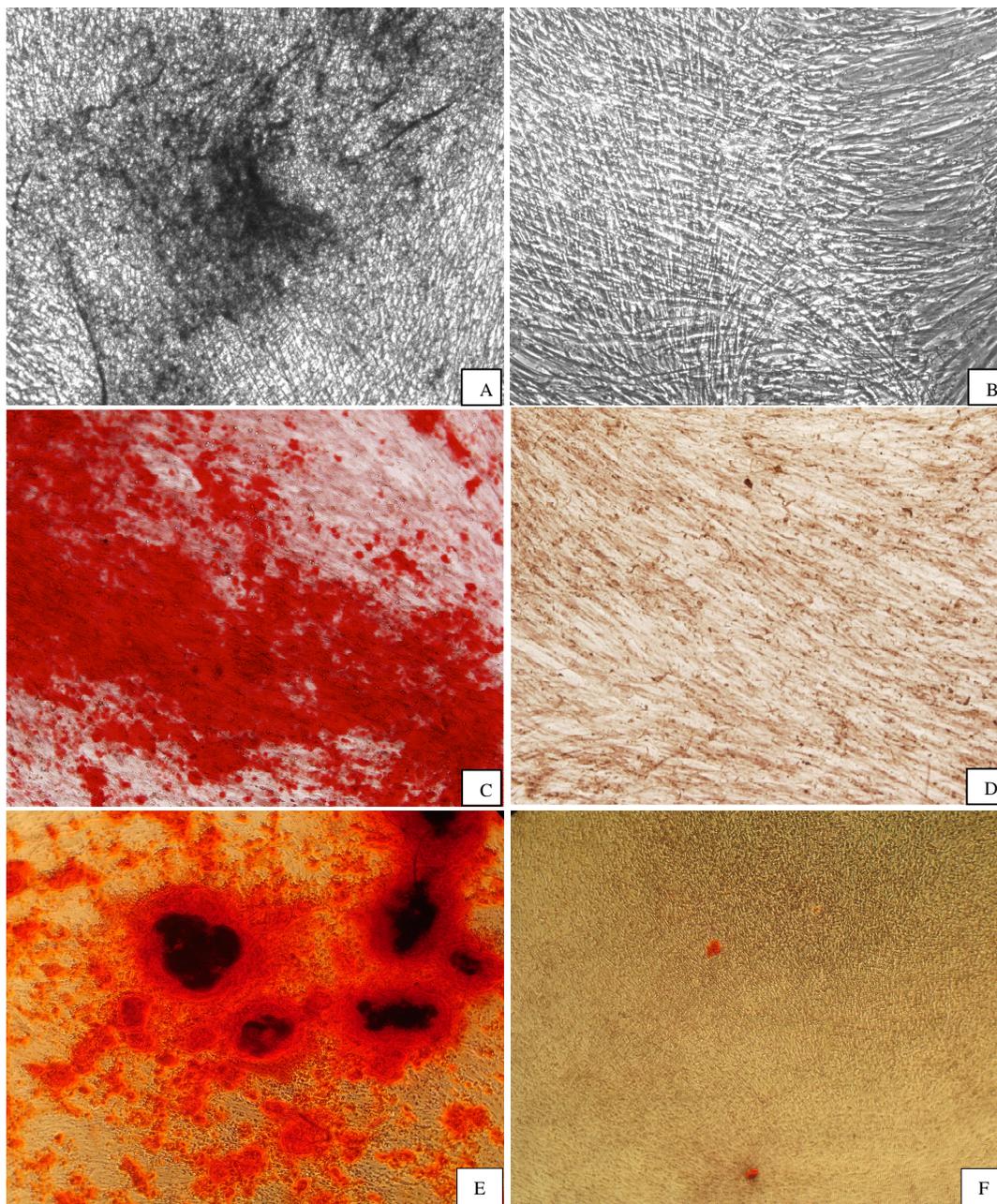
Apesar de muito similares na morfologia, essas células apresentavam algumas diferenças que nos levaram a supor que essas células, apesar de estarem localizadas em um mesmo compartimento e cumprirem os requisitos básicos de uma célula-tronco progenitora mesenquimal, não eram as mesmas células. A morfologia de cada uma das células também é muito característica. As células mesenquimais provenientes da parede do cordão umbilical são ligeiramente maiores, achatadas e espalham-se mais que as do sangue, enquanto que as sanguíneas são menores e mais cilíndricas que as da parede, como demonstrado na figura 31.



**Figura 31:** Diferenças morfológicas entre as células-tronco progenitoras mesenquimais de parede de cordão umbilical e de sangue de cordão umbilical. As células da parede de cordão umbilical (A e C) são maiores, achatadas e espalhadas que as de sangue de cordão umbilical (B e D) que são menores e mais cilíndricas. A e B aumento 40x, C e D aumento 100x.

A potencialidade destas células para diferenciação também foi testada. É amplamente conhecido o potencial das células-tronco mesenquimais, como sendo capazes de originar osteócitos, condrócitos e adipócitos. Para iniciar este processo de caracterização, submetemos as culturas tanto de células da parede de cordões umbilicais, quanto as células do sangue de cordão umbilical, ao protocolo de diferenciação na linhagem óssea, como já descrito em Materiais e Métodos. Resumidamente, as culturas induzidas foram cultivadas durante 21 dias com 100  $\mu\text{g/ml}$  de Ácido Ascórbico, 10 mM  $\beta$ -Glicero-Fosfato e 100 $\eta\text{M}$  Dexametasona em meio DMEM contendo 10% Soro Fetal Bovino, enquanto os controles

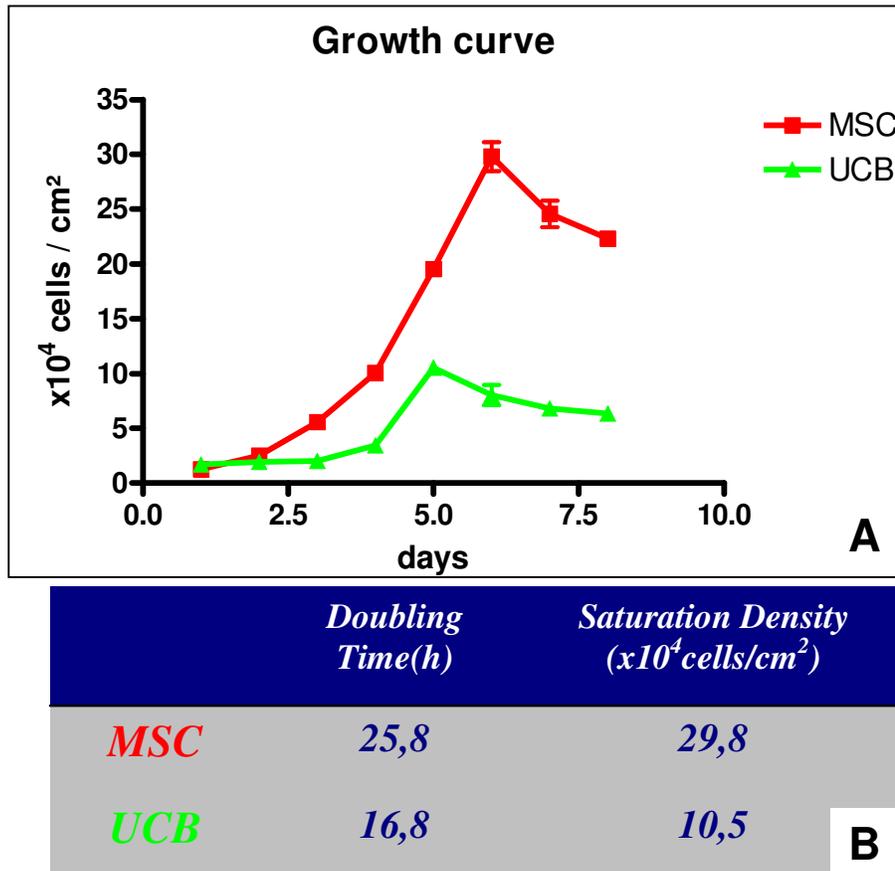
continham apenas DMEM e 10% Soro Fetal Bovino. Para a detecção da diferenciação, as culturas foram coradas pelo método da Alizarin Red, que cora exclusivamente os cristais de fosfato de cálcio dentro das células diferenciadas. Os resultados obtidos com as culturas das células do subendotélio da parede do cordão umbilical comparadas com aquelas de sangue de cordão umbilical encontram-se na figura 32.



**Figura 32:** Células progenitoras mesenquimais da parede e do sangue de cordões umbilicais diferenciadas na linhagem óssea. A-D parede de cordão umbilical, E e F sangue de cordão umbilical. A, C e E células tratadas com meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino, 100 µg/ml Ácido Ascórbico, 10 mM β-Glicero Fosfato e 100nM Dexametasona. B, D e F células controle tratadas com meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino. A e B sem coloração. C, D, E e F coradas com Alizarin Red. Aumento 100x.

Foi observada também, uma diferença na cinética de crescimento das células mesenquimais provenientes da parede de cordão umbilical quando comparadas com aquelas obtidas a partir do sangue do cordão umbilical.

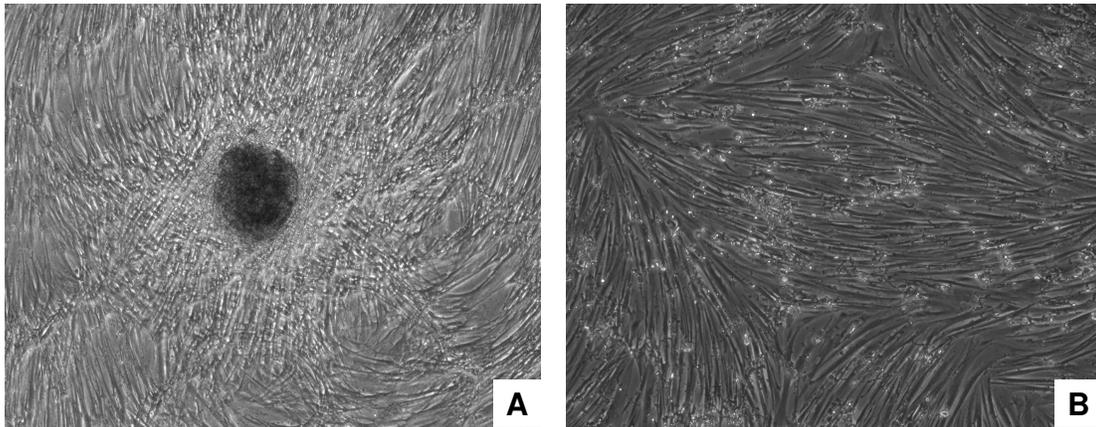
Para comprovarmos isso, foi realizada uma curva de crescimento para ambas as populações celulares. Os resultados são apresentados na figura 33.



**Figura 33:** Cinética de crescimento das células mesenquimais da parede de cordão umbilical (MSC) e do sangue de cordão umbilical (UCB). A – Curvas de crescimento, B – Tabela com valores da taxa de dobramento e densidade de saturação de cada uma das populações.

De fato, é possível observar, na figura 33 que as duas populações celulares crescem de maneira distinta. As células do sangue de cordão umbilical, possuem uma velocidade de dobramento maior e saturam numa densidade muito mais baixa do que aquelas da parede do cordão umbilical. Outra característica que corrobora estes achados é o fato das células de parede de cordão umbilical, quando em alta confluência na placa,

formarem agregados celulares, com aumento do número de células na placa, ao contrário das células de sangue de cordão umbilical, que não formam estes agregados como pode ser visto na figura 34.



**Figura 34:** Formação de agregados celulares. Em alta confluência, as células da parede de cordão umbilical formam agregados celulares, enquanto as células da parede de cordão umbilical crescem em monocamada Aumento 100x

Com os procedimentos de obtenção das culturas tanto de sangue quanto da camada subendotelial da veia umbilical bem estabelecidos no laboratório, passou-se então, para um trabalho de caracterização destas células. Foi montada uma colaboração com o Hospital Israelita Albert Einstein para a caracterização destas células, através da análise de alguns marcadores de membrana através de FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-Imunotipagem.

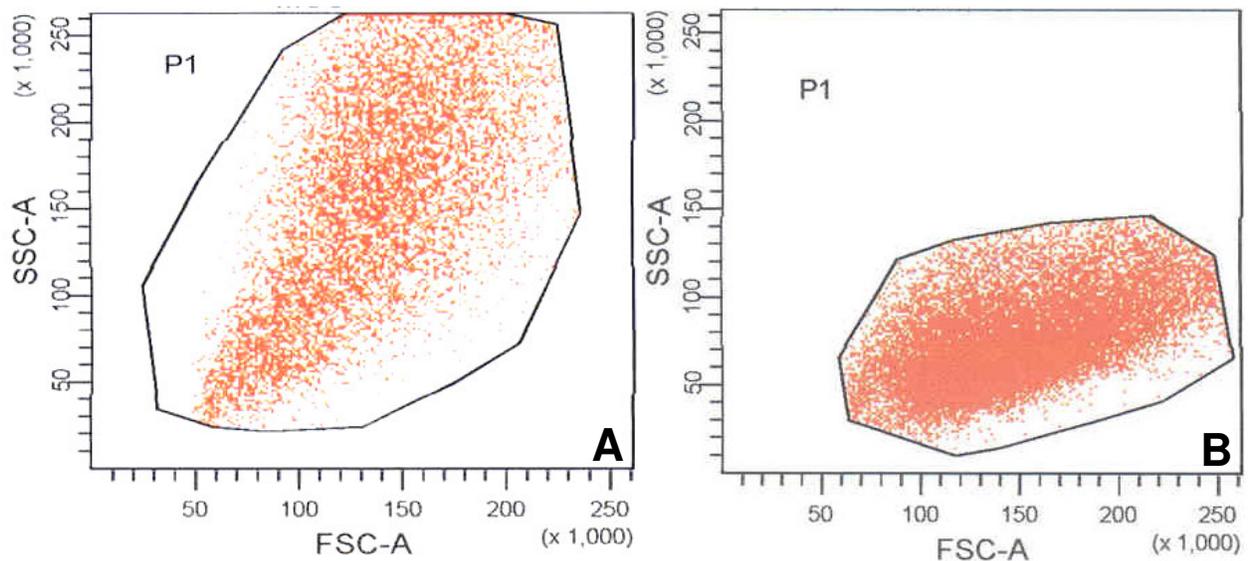
Até hoje ainda não existe um fenótipo imunológico conhecido para se identificar as células-tronco mesenquimais, o que dificulta muito seu isolamento. Ao contrário das células progenitoras hematopoiéticas, que expressam na superfície de sua membrana, a proteína CD34, não há um único marcador capaz de diferenciar as células-tronco mesenquimais de outros tipos celulares. As culturas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> passagens foram submetidas à marcação com anticorpos contra: CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD106, CD117, CD133, CD166 e

HLA-DR, na esperança de se poder traçar um “perfil” dessas células e assim, facilitar sua identificação. A tabela 3 mostra resumidamente os anticorpos utilizados e os principais tipos celulares onde são expressos, além de sua marcação em células mesenquimais.

**Tabela 3:** Anticorpos utilizados e sua expressão em diversos tipos celulares.

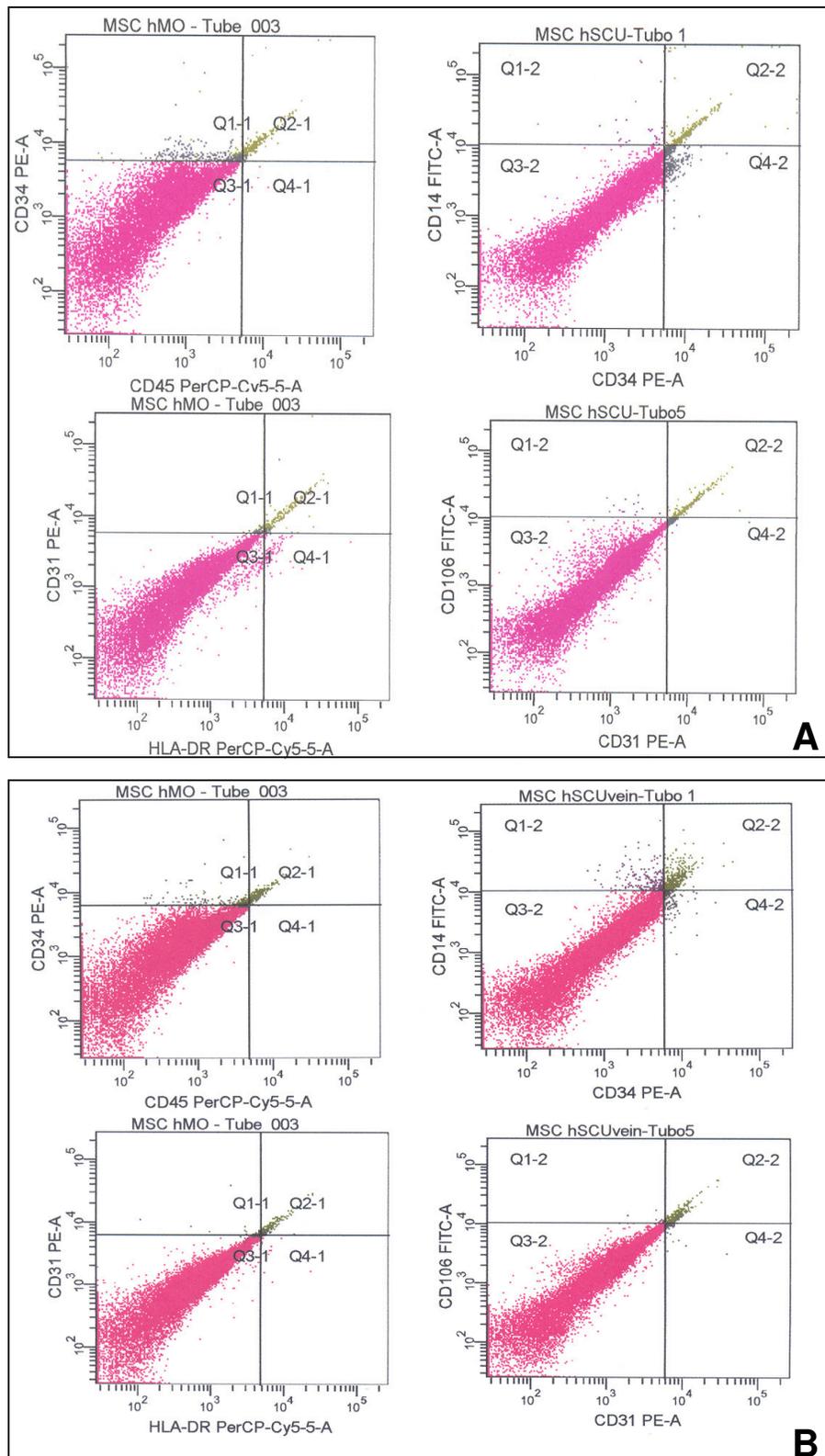
| <i>Antígeno</i>            | <i>Expressão Celular</i>                                                                | <i>Marcação em Mesenquimais</i> |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <b>CD14 (LPS-R)</b>        | Monócitos e Macrófagos                                                                  | -                               |
| <b>CD29 (ITGB1)</b>        | Fibroblastos, Células Epiteliais, Plaquetas, Timócitos, Eosinófilos                     | +++                             |
| <b>CD31 (PECAM1)</b>       | Monócitos, Plaquetas, Neutrófilos, Linfócitos T naive, Células NK e Células Endoteliais | -                               |
| <b>CD34</b>                | Marca Progenitores Hematopoiéticos                                                      | -                               |
| <b>CD44 (Pgp1, H-CAM)</b>  | Células Hematopoiéticas, Fibroblastos, Células da Glia e Miócitos                       | +++                             |
| <b>CD45 (PTPRC, GP180)</b> | Células Hematopoiéticas                                                                 | -                               |
| <b>CD73</b>                | Linfócitos B e T, Células Epiteliais                                                    | +++                             |
| <b>CD90 (Thy-1)</b>        | Progenitores Hematopoiéticos e Neurônios                                                | +++                             |
| <b>CD105 (Endogлина)</b>   | Células Endoteliais, Células de Medula e Macrófagos Ativados                            | +++                             |
| <b>CD106 (VCAM1)</b>       | Células Endoteliais Ativadas                                                            | -                               |
| <b>CD117 (c-kit, SCFR)</b> | Progenitoras Hematopoiéticas                                                            | -                               |
| <b>CD133 (AC133)</b>       | Progenitoras Hematopoiéticas, Células Epiteliais e Células Endoteliais                  | -                               |
| <b>CD166 (ALCAM)</b>       | Monócitos ativados, Linfócitos T Ativados, Neurônios, Células Epiteliais e Fibroblastos | +                               |
| <b>HLA-DR (DRB1)</b>       | Linfócitos B, Monócitos, Macrófagos, Precursores Linfóides e Eritróides                 | -                               |

Os resultados apresentados na figura 35 permitem analisar as células mesenquimais de cordão umbilical (sangue e parede) em termos de tamanho e complexidade, e já se podendo observar algumas diferenças entre estas células: as células da parede são maiores e possuem uma distribuição mais heterogênea, enquanto as do sangue são mais homogêneas e mais complexas.



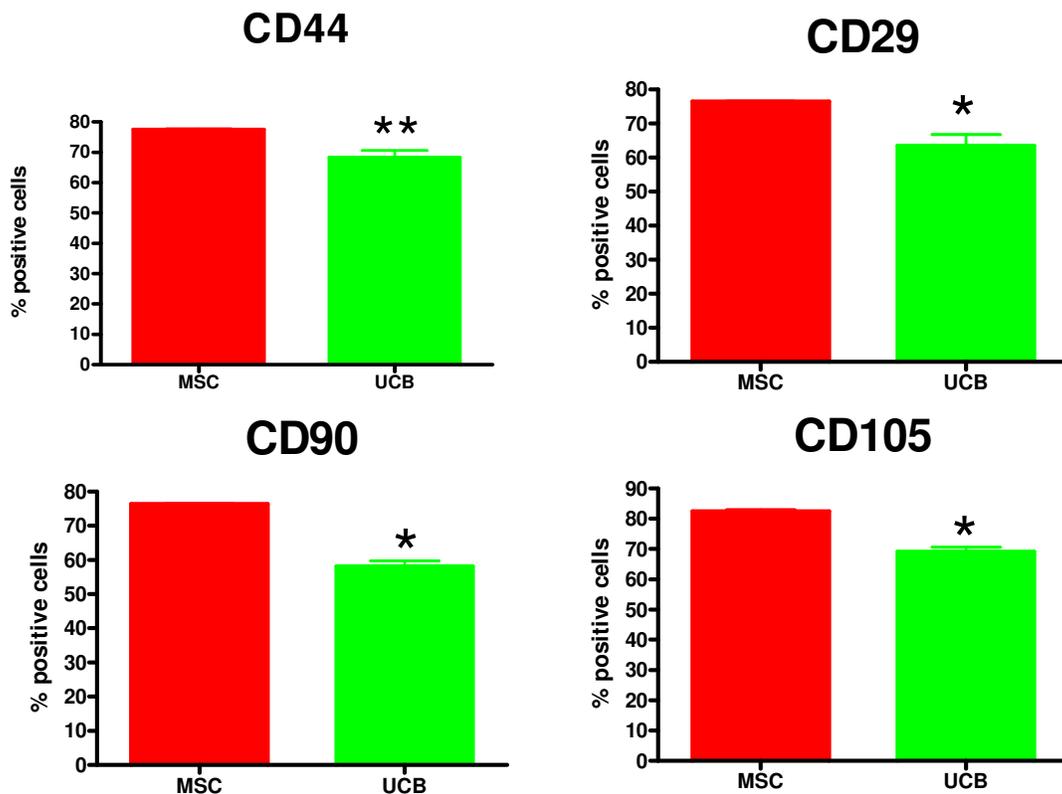
**Figura 35:** Análise por citometria de fluxo do tamanho e da complexidade das células da parede de cordão umbilical (A) e de sangue de cordão umbilical (B).

A figura 36 mostra que, tanto as células da parede do cordão umbilical, quanto às células provenientes do sangue deste cordão não apresentaram marcação para qualquer marcador hematopoiético (CDs 14, 34, 45 e HLA-DR) ou endotelial (CDs 31 e 106).



**Figura 36:** As células progenitoras mesenquimais de sangue de cordão umbilical (A) e de parede de cordão umbilical (B) são negativas para os marcadores CD14, CD31, CD34, CD45, CD106 e DLA-DR.

Para testar nossa hipótese de que as células mesenquimais de sangue de cordão e mesenquimais de parede de cordão são realmente dois tipos distintos de células, submetemos estas duas populações celulares a experimentos de citometria de fluxo para analisar a expressão de diferentes proteínas em sua superfície. Como mostrado na figura 37, ambos tipos celulares apresentam os mesmos marcadores de superfície, o que as caracteriza como mesenquimais, entretanto, apresentam porcentagens diferentes de marcação.



**Figura 37:** Porcentagens de células marcadas com marcadores de células progenitoras mesenquimais (CD29, CD44, CD90 e CD105) de parede de cordão umbilical (MSC) e de sangue de cordão umbilical (UCB). Resultados obtidos de células de cinco diferentes amostras de sangue de cordão comparadas com as respectivas amostras de células da parede do cordão umbilical, na mesma passagem. \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$ .

A tabela 4 resume as porcentagens de marcação dos marcadores mesenquimais em cada uma das populações.

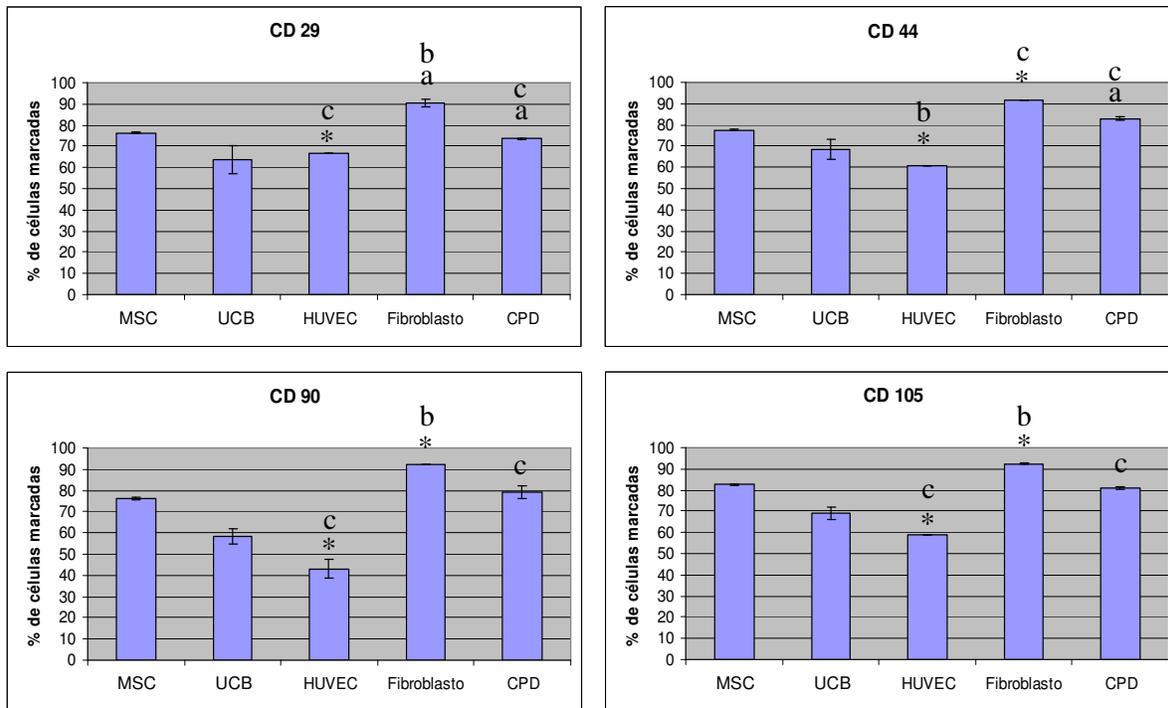
**Tabela 4:** Porcentagem de marcação dos antígenos de células mesenquimais nas culturas de células da parede do cordão e do sangue de cordão umbilical.

| <i>Antígenos</i>          | <i>Células da Parede do Cordão (%)</i> | <i>Células do Sangue de Cordão (%)</i> |
|---------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>CD29 (ITGB1)</b>       | 76                                     | 55                                     |
| <b>CD44 (Pgp1, H-CAM)</b> | 77                                     | 62,4                                   |
| <b>CD73</b>               | <b>NR*</b>                             | 67                                     |
| <b>CD90 (Thy-1)</b>       | 76                                     | 54                                     |
| <b>CD105 (Endoglina)</b>  | 82                                     | 70,5                                   |
| <b>CD166 (ALCAM)</b>      | 10                                     | 40                                     |

\*NR= Não Realizado.

Como observado na figura 37 e na tabela 4, apesar de ambos os tipos celulares exibirem a expressão dos mesmos marcadores, existe uma diferença marcante na porcentagem de marcação para os diferentes antígenos de superfície entre os dois tipos celulares, comprovando mais uma vez, a diferença entre estas células.

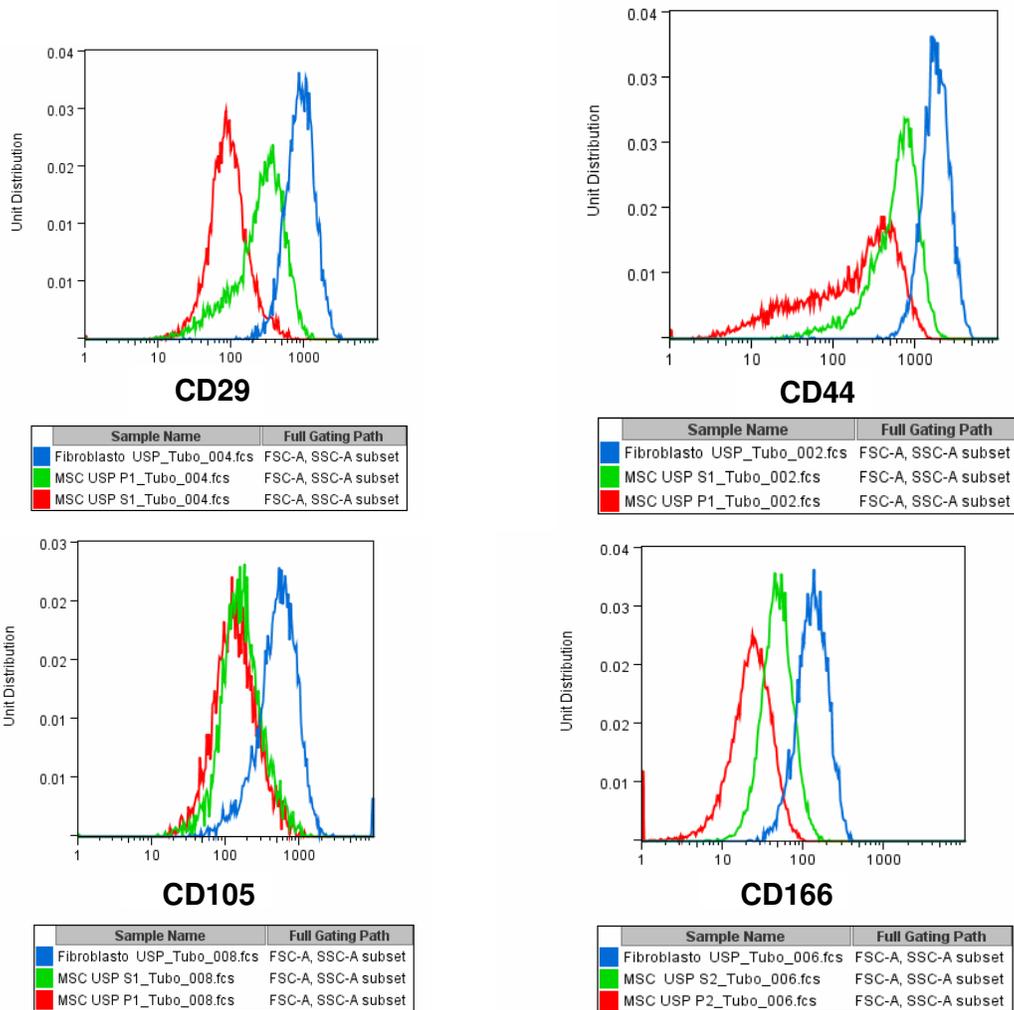
Propusemos então, que as células mesenquimais apesar de expressarem os mesmos marcadores, podem ser diferenciadas pela porcentagem de células que expressam estes marcadores na população. Para comprovar esta hipótese, comparamos as células mesenquimais de sangue e de parede de cordões umbilicais com uma linhagem de fibroblasto de pele (HNF), células de endotélio vascular (HUVEC) e células progenitoras mesenquimais de polpa dentária (CPD). Como mostrado na figura 38, todos estes tipos celulares exibem marcação para os mesmos marcadores, no entanto, as porcentagens de cada marcador variam dentro de cada tipo celular.



**Figura 38:** Porcentagens de marcação das células mesenquimais da parede de cordão umbilical (MSC), sangue de cordão umbilical (UCB), células de endotélio vascular de cordão umbilical (HUVEC), Fibroblasto de Pele e Células progenitoras mesenquimais de polpa dentária (CPD). \*:  $p < 0,0001$  vs CTM. a:  $p < 0,05$  vs CTM. b:  $p < 0,0001$  vs SCU e c:  $p < 0,05$  vs SCU. Amostras de três cordões diferentes.

Como pode ser observado na figura 38, apesar destas células (progenitoras mesenquimais da parede de cordão umbilical, progenitoras mesenquimais do sangue de cordão umbilical, endotélio vascular de cordão umbilical, fibroblasto de pele e progenitoras mesenquimais de polpa dentária) serem originadas de tecidos diferentes, todas apresentam expressão dos mesmos marcadores, o que as caracteriza como mesenquimais, entretanto as proporções são diferentes.

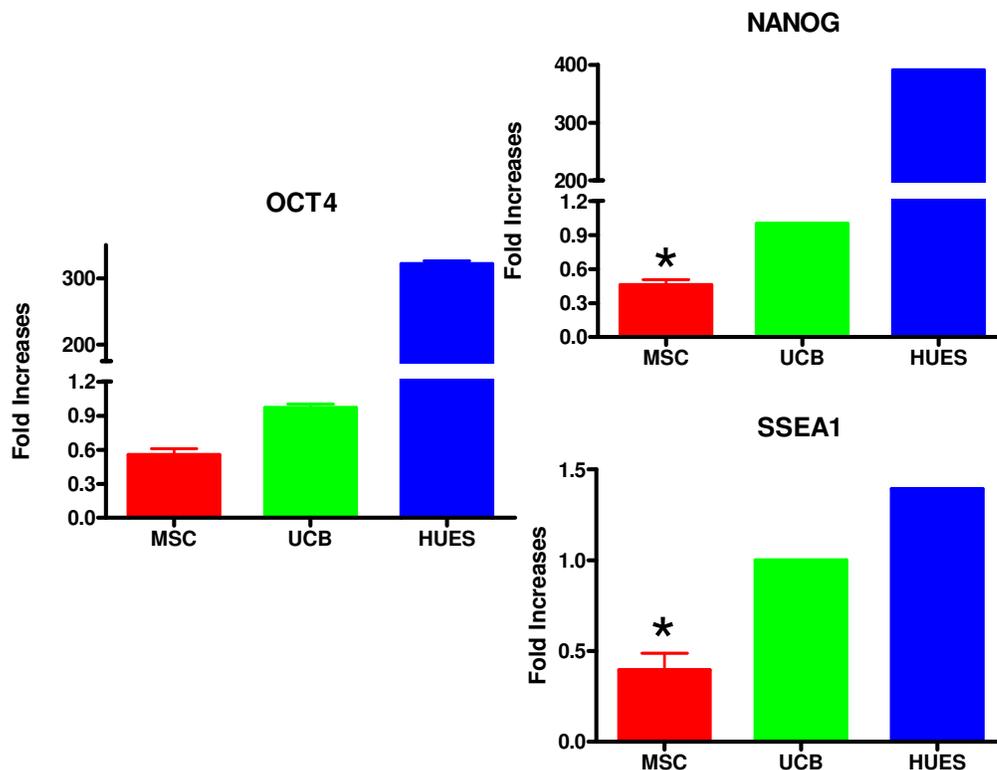
Além da marcação das populações celulares, com o intuito de caracterizar diferencialmente cada uma dessas populações, analisamos a expressão de alguns desses marcadores na superfície celular, como mostra a figura 39.



**Figura 39:** Expressão relativa dos marcadores de células progenitoras mesenquimais em diferentes populações celulares. Vermelho, expressão nas células de parede de cordão umbilical, Verde, expressão em células de sangue de cordão umbilical, Azul, expressão em células de fibroblastos.

Mais uma vez pudemos verificar que as células apresentam expressão diferencial desses marcadores não somente entre as proporções das populações celulares marcadas, mas também na expressão destes marcadores entre os dois diferentes tipos celulares. Interessantemente, enquanto que uma maior proporção de células da parede marcam para os marcadores mesenquimais, a expressão destes mesmos marcadores é maior nas células do sangue.

Além disso, são conhecidos alguns genes que são expressos em células-tronco embrionárias e que são marcadores de células com alto potencial tanto de diferenciação quanto de proliferação. Entre estes, incluem-se a família dos fatores de transcrição POU (OCT 3 e 4), os genes que codificam antígenos de estágios embrionários (SSEAs) e, o mais recentemente descrito, NANOG. *Primers* para estes genes foram desenhados e o RNA das culturas de células mesenquimais tanto de sangue de cordão umbilical, quanto da parede da veia de cordão umbilical foi extraído para analisar a diferença de potencialidade destas células, também ao nível de expressão gênica. Os resultados dessa análise encontram-se na figura 40.



**Figura 40:** Expressão dos marcadores de pluripotência em células progenitoras mesenquimais da parede de cordão umbilical (MSC), sangue de cordão umbilical (UCB) e células-tronco embrionárias humanas (HUES). \* $p < 0,01$  MSC vs UCB. Resultados obtidos do RNA de três diferentes amostras de sangue de cordão comparadas com as respectivas amostras de RNA da parede do cordão umbilical, na mesma passagem.

Como pode ser observado na figura 40, estas células também diferem quanto à expressão dos marcadores de pluripotência, sendo que as células da parede do cordão umbilical expressam esses genes aproximadamente duas vezes menos que as células do sangue de cordão umbilical.

## 5. Discussão

O transplante de ilhotas pancreáticas humanas é uma alternativa promissora para o tratamento do DM, porém ainda requer estudos adicionais para permitir sua viabilização prática. Os protocolos utilizados atualmente para isolamento de ilhotas pancreáticas humanas de doadores cadavéricos, ainda apresentam uma baixa eficiência, somando-se, ainda, a escassa doação de órgãos para transplante. Isto limita o número de ilhotas disponíveis para transplante terapêutico visando a reversão do DM nos pacientes. Portanto, o desenvolvimento de métodos alternativos que permitam aumentar o *pool* de células produtoras de insulina disponíveis para transplante, seria de grande valor. O potencial de aplicação de células-tronco para a produção de células  $\beta$  aumentou o otimismo no campo da pesquisa para o tratamento do DM. Por outro lado, ainda existem algumas questões que merecem considerações. Embora tenha havido um enorme progresso no conhecimento na biologia do desenvolvimento das células  $\beta$  (Kim et al., 2002; Ackermann et al., 2007), ainda falta conhecimento a respeito dos processos que estão envolvidos na diferenciação de células-tronco em células  $\beta$ . No presente trabalho nós demonstramos que células-tronco embrionárias de camundongo podem originar células produtoras de insulina *in vitro* e identificamos novos genes associados à esse processo. Mostramos também que células progenitoras mesenquimais da medula óssea de ratos foram incapazes de gerar células  $\beta$  *in vitro* e que existem duas populações distintas de células progenitoras mesenquimais no cordão umbilical humano.

### ***5.1. Embriogênese e Organogênese do pâncreas endócrino***

A organização característica do pâncreas é formada após o tubo intestinal ser criado a partir da endoderme. Os brotos pancreáticos dorsais e ventrais são gerados no epitélio da endoderme. Subsequentemente, o broto ventral gira em direção ao broto dorsal e se funde ao mesmo tempo em que o epitélio forma invaginações. As células precursoras pancreáticas se diferenciam então nas estruturas endócrinas e exócrinas (Edlund, 2002), e, em seguida, os vários tipos celulares são formados.

O subsequente desenvolvimento do pâncreas endócrino está sob o fino controle de vários fatores de transcrição específicos, entre os quais estão: PDX-1, Neurogenina 3, PAX-4 e PAX-6, ISL-1, BETA2-NEUROD1, MAF, NKX2.2, NKX6.1. Estes fatores de transcrição regulam a migração e proliferação durante o desenvolvimento. O entendimento da seqüência, dos sinais e do padrão de expressão destes fatores de transcrição é essencial para a delimitação *ex vivo* de células beta funcionais.

Um dos genes mais intensamente estudados é o PDX-1. Durante a organogênese, PDX-1 é amplamente expresso nas células que eventualmente se diferenciarão em células endócrinas e exócrinas, uma vez que no pâncreas adulto, a expressão de PDX-1 é restrita às células beta e alfa (Hui et al., 2002). PDX-1 está envolvido na expressão de vários genes, cuja expressão é específica de ilhotas, os quais são essenciais para o metabolismo de glicose, como aqueles que codificam a insulina e a somatostatina (Jonsson et al., 1994; Barrow et al., 2006). Camundongos “knock-out” para PDX-1, apresentam completa ausência do pâncreas (Johnson et al., 2003).

Neurogenina 3 também é crucial para o desenvolvimento do pâncreas, estando presente tanto no pâncreas embrionário quanto no neonato, onde contribui para a renovação das células insulares, sob condições

fisiológicas. A expressão de Neurogenina 3 induz a expressão de ligantes extracelulares de NOTCH em células precursoras. Subsequentemente leva também à ativação dos receptores de NOTCH, que é crucial no desenvolvimento do pâncreas (Habener et al., 2005).

O gene que codifica BETA2-NEUROD1, uma proteína do tipo “basic helix-loop-helix” (bHLH), está associado com a ativação do gene da insulina (INS) (Naya et al., 1997). Durante a embriogênese, BETA2-NEUROD1 é expresso em uma subpopulação do epitélio pancreático de camundongos, até o dia embrionário E9.5, uma vez que posteriormente, sua expressão é restrita somente às ilhotas (Mutoh et al., 1997; Naya et al., 1997). Camundongos deficientes em BETA2-NEUROD1 morrem entre 3-5 dias após o nascimento, com uma severa hiperglicemia e anormalidades nas ilhotas (Naya et al., 1997).

PAX4 e PAX6 são proteínas especificamente expressas no pâncreas endócrino em desenvolvimento, regulando a diferenciação e proliferação das ilhotas. Durante a embriogênese, PAX6 está presente a partir do dia E9 em uma pequena subpopulação da endoderme pancreática. A expressão de PAX4 é observada a partir do dia E10 no broto pancreático. Ao final do desenvolvimento, os níveis de PAX4 diminuem enquanto os níveis de PAX6 permanecem elevados. Camundongos “knock-out” revelaram que animais PAX4<sup>-/-</sup> não geram células  $\beta$  nem células  $\delta$ , enquanto animais PAX6<sup>-/-</sup> são incapazes de formar células  $\alpha$  (Dohrmann et al., 2000).

O gene ISL-1 é expresso em células endócrinas e em uma subpopulação de neurônios adultos de ratos (Thor et al., 1991). Durante o desenvolvimento, ISL-1 está presente a partir do dia E9 no epitélio pancreático dorsal de camundongos. No dia E11, ISL-1 é detectado no epitélio pancreático ventral, que é necessário para a diferenciação de ilhotas. Em embriões mutantes para ISL-1, o desenvolvimento de ilhotas é completamente ausente (Ahlgren et al., 1997).

As proteínas MAF são também essenciais para o desenvolvimento do pâncreas endógeno. Em adultos e durante a embriogênese, MAFA é um ativador-chave da expressão de insulina (Olbrot et al., 2002; Matsuoka et al., 2004; Artner et al., 2006). Embora MAFB especificamente regule a expressão de glucagon em adultos, recentemente MAFB foi observado ao dia E12.5, quando co-expressa com insulina (Artner et al., 2006). Esta co-expressão MAFB/insulina persiste através do desenvolvimento subsequente. No pâncreas neo-nato, MAFB tem sua expressão diminuída em células  $\beta$ , mas não em células  $\alpha$ . Nos estágios tardios de desenvolvimento embrionários (E18.5), estão presentes somente algumas poucas células positivas para PDX-1 e MAFB, sendo interpretadas como precursoras de células produtoras de insulina (Artner et al., 2006). Em estudo recente, foi mostrado que, em embriões, MAFB é expresso antes de MAFA, sugerindo que a diferenciação de células  $\beta$  procede via células intermediárias  $MAFB^+MAFA^-INS^+$ , em células  $MAFB^-MAFA^+INS^+$  (Nishimura et al., 2006). Estes resultados indicam que MAFB tem um papel duplo na diferenciação embrionária tanto de células  $\beta$  quanto de células  $\alpha$ .

A família do homeodomínio NKX também está envolvida no desenvolvimento das ilhotas. A expressão de NKX2.2 é detectada durante a embriogênese precoce em todas os tipos de células endócrinas (Cissell et al., 2003), uma vez que, em ilhotas adultas, é restrita à células  $\beta$ ,  $\alpha$  e PP. Camundongos “knock-out” para NKX2.2, desenvolveram hiperglicemia severa, porque os precursores das células  $\beta$  sobrevivem, mas são incapazes de maturação total. Outro membro da mesma família é o fator de transcrição NKX6.1. No pâncreas de camundongos em desenvolvimento, a expressão de NKX6.1 é observada a partir do dia E10.5. A partir do dia E15.5 a expressão de NKX6.1 torna-se restrita às células produtoras de insulina e às células ductais. Em estágios tardios, no pâncreas adulto,

NKX6.1 torna-se exclusivo das células produtoras de insulina. O rompimento/nocautamento do gene que codifica NKX6.1 leva ao bloqueio da neogênese das células  $\beta$  (Sander et al., 2000).

O conhecimento adequado do padrão de expressão dos fatores de transcrição é essencial não só para as pesquisas com células-tronco mas, também, para o entendimento da fisiopatologia do DM. Isto pode ser ilustrado pela descoberta de seis genes humanos (MODY – *maturity onset diabetes of the young*), que são responsáveis pelo desenvolvimento de um tipo de DM2 (Gupta et al., 2004). Entre estes genes MODY, existem genes que codificam fatores de transcrição carregando mutações. Estes genes são: MODY-4, na realidade uma forma de PDX-1 mutada e MODY-6, uma forma de BETA2-NEUROD1 mutado.

## ***5.2. Células-tronco Embrionárias***

A habilidade de células-tronco se desenvolverem em uma grande variedade de tipos celulares, tem chamado a atenção como um nova fonte potencial para o desenho de novas estratégias terapêuticas. Em particular, de doenças que resultem da destruição de um limitado número de tipos celulares, como Parkinson, causado pela destruição de neurônios dopaminérgicos dentro de uma região particular do cérebro ou o DM, onde as células beta secretoras de insulina são seletivamente destruídas nas ilhotas de Langerhans. Os passos importantes para o desenvolvimento de terapias baseadas em células-tronco, incluem o estabelecimento de um protocolo que permita que as células-tronco diferenciem num tipo celular específico e a descoberta dos mecanismos através dos quais essas células se desenvolvem.

Foi sugerido que as células  $\beta$  derivadas de células-tronco embrionárias não representem o melhor campo de estudo para o

desenvolvimento de células  $\beta$ , mas sim produtos aberrantes de genes desregulados ou uma mistura de programas de diferenciação (Smith, 2001). A falta de conhecimento sobre a diferenciação regular é provavelmente uma das causas desta descrença (Vassilopoulos et al., 2003). Além do mais, faltam evidências de que células  $\beta$  diferenciadas a partir de células-tronco são capazes de produzir insulina de uma maneira normal e regulada. Não são apenas problemas funcionais que podem ser observados em células-tronco embrionárias diferenciadas, mas também, o aparecimento de células cancerosas durante o processo de diferenciação que deve ser considerado como uma ameaça. Células-tronco embrionárias se comportam muito similarmente aos carcinomas embrionários, que formam teratocarcinomas. Os animais que foram tratados com células-tronco embrionárias desenvolveram tumores, como mostrado na figura 6 (Fujikawa et al., 2005). Desta maneira, são necessários mais estudos ainda, antes de se propor estas células como uma fonte disponível de células para a diferenciação de células produtoras de insulina para o tratamento do DM.

A elucidação dos processos intracelulares responsáveis pela alteração do fenótipo de uma célula-tronco para uma célula endócrina pancreática, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos gerais de diferenciação destas células, ainda muito pouco conhecidos. Assim, os conhecimentos adquiridos poderiam ser utilizados para expansão de células  $\beta$ .

As células-tronco embrionárias (ESCs) de camundongos utilizadas neste trabalho são células isoladas da massa interna de blastocistos (Sukoyan et al., 2002) com capacidade de auto-renovação e de diferenciação em vários tipos celulares. Estas células podem ser mantidas indefinidamente em cultura, quando em estado indiferenciado e foram capazes de gerar teratomas quando implantadas em animais *NUDE* imunodeficientes (figura 6).

A produção de corpos embrióides em gotas se mostrou mais eficiente que a geração em suspensão, em placas não tratadas, uma vez que cada gota dava origem à um corpo embrióide, e estes eram muito mais homogêneos, possuíam uma menor quantidade de células mortas e aderiam melhor à placa no estágio seguinte (figura7). Mesmo que existam outros tipos celulares durante a diferenciação (cardiomiócitos, neurônios, etc), isto pode ser um indício do direcionamento linhagem-específico do processo de diferenciação. O pâncreas é uma glândula mista que durante a sua organogênese recebe estímulos de vários tecidos, entre eles a mesoderme cardíaca e a neuroectoderme.

Nós demonstramos que após a diferenciação os *clusters* marcavam para ditizona (figura 12) e continham insulina (figura 13). A ditizona é um quelante de zinco, por isso reconhecidamente marca ilhotas de várias espécies animais como humanos, porcos, camundongo, etc, devido à altas concentrações deste metal. O zinco é necessário para células  $\beta$  pancreáticas para a produção dos cristais de insulina. No entanto é pequena a fração celular positiva para ditizona entre as células-tronco embrionárias que diferenciam espontaneamente e até mesmo em protocolos de indução. Dessa maneira, a marcação com ditizona pode ser uma excelente estratégia para isolar uma população exclusiva de células diferenciadas.

Em recente publicação na Science, Rajagopal e colaboradores (Rajagopal et al., 2003) questionam se a diferenciação destas células ES de camundongos em células secretoras de insulina não seria apenas um artefato da cultura. Este estudo mostra que a insulina encontrada no interior das células pode ter sido captada durante o processo de seleção, que utiliza um meio rico em insulina (ITSFn). A insulina estaria sendo captada pela célula e armazenada ou secretada por esta célula mais tarde. O estudo não descarta a possibilidade da ocorrência de diferenciação, mas apenas sugere que este processo ocorra numa razão muito menor que aquela proposta

inicialmente. A principal evidência para esta suspeita é que os autores não conseguiram detectar o mRNA de insulina nas células diferenciadas. No entanto, no presente trabalho, fomos capazes de detectar ambos os mRNAs de insulina de camundongo (INS-I e INS-II) por *Real-Time PCR*, utilizando os mesmos protocolos de diferenciação (figura 17). Verificamos ainda que depois de diferenciadas seja pelo protocolo de indução ou por diferenciação espontânea, estas células expressam genes específicos de células beta pancreáticas maduras, como PDX-1, ISL-1, GLUT-2 e INS-1 e INS-2. Apesar das células diferenciadas pelo protocolo de indução possuírem uma menor expressão de PDX-1, ISL-1 e INS-1, do que outros estágios da diferenciação ou até mesmo daquelas células diferenciadas espontaneamente, estas foram as que apresentaram uma maior expressão de GLUT-2 e INS-2. O gene para insulina 2 de murinos (INS-2) é aquele que mais se aproxima ao da insulina humana, respondendo ao estímulo de glicose. A proteína GLUT-2 é um transportador de glicose, presente em células beta, responsável pela sensibilidade da célula às variações da glicemia e conseqüentemente, secreção de insulina, portanto, para a identificação de novos genes, decidimos continuar utilizando apenas estas células.

Os resultados obtidos no teste de secreção de insulina (figura 15) mostram que utilizando este processo de diferenciação, as células não responderam ao estímulo com glicose, uma vez que quando incubadas na solução de maior concentração de glicose elas secretavam menor quantidade de insulina do que quando incubadas na solução de menor concentração. Além do mais, as alterações no protocolo não atingiram o objetivo de aumentar o conteúdo interno de insulina, como já demonstrado pelos resultados de secreção de insulina. Esta observação também pode explicar o fato dos animais diabéticos não reverterem para um estado normoglicêmico após o implante de células diferenciadas (figura 16), uma

vez que essas células não eram responsivas ao estímulo com glicose. Tudo isso possivelmente remete a uma diferenciação não terminal. Claramente, pudemos observar que há uma descontinuidade entre a produção e armazenamento da insulina e sua subsequente secreção. Apesar de produzir, o conteúdo interno de insulina produzida nas células diferenciadas era aproximadamente 2% do conteúdo interno de insulina de uma célula beta adulta. Parece razoável supor que ainda são necessários protocolos de diferenciação que visem uma melhor maturação das células diferenciadas.

A geração de células secretoras de insulina a partir de células-tronco embrionárias é alavancada pelo fato das células  $\beta$  pancreáticas aparecerem tardiamente durante o desenvolvimento embrionário. Este evento envolve a ativação e desativação seqüencial de um considerável número de genes, controlando, primeiramente, a geração da linhagem de células endodérmicas e, subsequentemente, a geração de células pancreáticas, a linhagem endócrina, e, finalmente, células secretoras de insulina. O conhecimento da via de desenvolvimento e seus passos, levando da endoderme indiferenciada para células  $\beta$  maduras, é o instrumento essencial para o desenho de protocolos de diferenciação de células  $\beta$  *in vitro*.

Além disso, o modelo de diferenciação de células-tronco em células produtoras e secretoras de insulina se presta para a busca dos genes associados com este processo, os quais poderão ser utilizados, no futuro, como ferramentas potentes em geneterapia do DM. Foram identificados mais de 600 genes induzidos pelo processo de diferenciação. Destes, foram selecionados aqueles com função em diferenciação celular e sem participação conhecida em diferenciação de células beta tanto murinas quanto humanas. Dos 16 genes inicialmente selecionados através dos

resultados obtidos com os *bioarrays*, 13 tiveram o aumento de expressão confirmado por *Real-Time PCR* (tabela 2).

Resta avaliar qual o papel exato de cada um desses genes nesse processo. Como a diferenciação não ocorre para apenas uma linhagem, mas sim ao final de todo processo, serem gerados vários tipos celulares juntos (figura 11), com diferentes graus de diferenciação, existe a dúvida se os genes selecionados fazem parte do programa de diferenciação de células beta ou de algum outro tipo celular encontrado ao acaso na mesma placa, ou mesmo, em qual estágio da diferenciação este gene é expresso, visto que o aparecimento de genes durante a diferenciação pancreática ocorre em cascata e com regulação temporal.

Outro fato ainda relevante é se o programa de diferenciação *in vitro* é fiel ao programa de desenvolvimento *in vivo*. Neste sentido, a utilização da célula MIN-6 para comparação, pode não ser a mais adequada também, uma vez que se trata de uma célula transformada e terminalmente diferenciada. Vários genes com papel importante no processo de diferenciação são expressos durante alguma etapa do desenvolvimento, tendo sua expressão diminuída ou até mesmo ausente em células adultas e/ou transformadas. Ainda assim, 11 dos genes selecionados tiveram sua expressão confirmada em células MIN-6.

### **5.3. Células-tronco Adultas**

A identificação e total caracterização de possíveis células-tronco a partir de tecidos adultos, juntamente com o desenvolvimento de protocolos de expansão e diferenciação *in vitro*, são cruciais para explorar estas células em protocolos de terapia celular.

Células-tronco adultas são normalmente comprometidas com as células maduras do tecido no qual elas estão localizadas. Em condições

específicas, as células-tronco adultas apresentam certa plasticidade, de acordo com os sinais do ambiente extracelular, propriedade conhecida como *transdiferenciação* (Wagers et al., 2004). As células-tronco adultas podem ser mantidas em cultura por longos períodos de tempo, embora esta capacidade seja mais restrita quando comparadas com células-tronco embrionárias. Em ambos os casos, foram descritas anormalidades cromossômicas e alterações no padrão de expressão gênica, após múltiplas divisões *in vitro* (Draper et al., 2004; Rubio et al., 2005). Isto pode estar relacionado com o desenvolvimento de tumores *in vivo*, restringindo sua utilização em protocolos de terapia celular. A caracterização cariotípica normalmente é necessária para se assegurar a estabilidade cromossomal nestes tipos de células.

A diferenciação de células de uma linhagem terminalmente diferenciada em outra linhagem não relacionada pode ocorrer em teoria, devido ao processo de transdiferenciação, ou pela desdiferenciação para um estado mais primitivo, multipotente e então subsequente diferenciação. A desdiferenciação é caracterizada como um processo de múltiplos passos, que envolve a perda de traços celulares específicos e a reentrada no ciclo celular. Neste sentido, células pancreáticas não-endócrinas apresentam um grande potencial como fonte de novas células  $\beta$  (De Lisle et al., 1990; Hall et al., 1992; Arias et al., 1993), devido ao fato de células endócrinas e exócrinas compartilharem a mesma origem desenvolvimental (Edlund, 1998; Edlund, 1999; St-Onge et al., 1999). Em cultura, células endócrinas e exócrinas rapidamente desdiferenciam e passam a expressar o mesmo marcador ductal, a citoqueratina 19 (CK-19/KRT-19) (em humanos), indicando que desdiferenciam com o mesmo padrão.

É importante mencionar que as células-tronco presentes nas ilhotas, não foram completamente caracterizadas. Experimentos *in vitro* e de localização celular, indicam que o epitélio ductal, tecido exócrino e a

replicação das próprias células  $\beta$  podem contribuir para produzir novas células positivas para insulina (Bonner-Weir et al., 2000; Dor et al., 2004; Baeyens et al., 2005). Além disso, foi mostrado que células de tecidos extra-pancreáticos podem também ser bioengenheiradas para expressar insulina. Estes incluem tecido hepático (Zalzman et al., 2005), medula óssea (Oh et al., 2004; Tang et al., 2004) e monócitos da circulação (Ruhnke et al., 2005). O fígado compartilha a origem endodérmica embrionária com o pâncreas, tendo sido mostrado que as células hepáticas ovais podem ser manipuladas para induzir a co-expressão de insulina e glucagon (Yang et al., 2002). Alternativamente, o repovoamento pancreático a partir de células-tronco de medula óssea também já foi descrito. Os mecanismos implicados neste processo parecem estar mais relacionados a neoformação da vasculatura pancreática do que a transdiferenciação de células-tronco de medula óssea (Hess et al., 2003). No entanto, não há trabalho na literatura relatando sucesso na tentativa de diferenciar células-tronco hematopoiéticas em células de tecido endócrino ou exócrino pancreático.

### **5.3.1. Células-tronco da Medula Óssea de Rato**

O aparecimento de vários tipos celulares durante a diferenciação das células de medula óssea de ratos (figura 26), demonstra claramente a multipotencialidade das populações de células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos obtidas em nosso laboratório. Como após diferenciadas essas células não expressaram genes-chave do processo de diferenciação de células-tronco em *clusters* similares à ilhotas pancreáticas, como descrito na literatura (Tang et al., 2004), aparentemente ou a etapa de maturação destas células não foi realizada com sucesso, ou ainda necessitam mais estudos para a geração de um protocolo eficiente. A Exendina 4 é um peptídeo sintético, primeiramente descoberto na saliva do

lagarto monstro de Gila (*Heloderma suspectum*), que apresenta 53% de homologia com relação ao hormônio GLP1, secretado pelas células do intestino, e que é um potente secretagogo de insulina (Doyle et al., 2001). Tanto a nicotinamida (Otonkoski et al., 1993), quanto a exendina (Movassat et al., 2002) são reconhecidamente importantes indutores de diferenciação de células beta. O aumento do número e tamanho dos *clusters* gerados após a diferenciação e sob o estímulo da Exendina 4 (figura 24) é um forte indício de que estas células haviam sido efetivamente diferenciadas para a linhagem pancreática endócrina e que respondiam de maneira fisiológica como tal, no entanto, estas células não expressavam nem mesmo o gene da insulina (figura 27).

### **5.3.2. Células-tronco da Parede de Cordão Umbilical e do Sangue de Cordão Umbilical**

O possível emprego de células progenitoras derivadas de sangue de cordão umbilical para reconstituição de tecidos, seria uma alternativa à manipulação de células humanas fetais e germinativas com essa finalidade, presentemente alvo de intensa controvérsia devido a implicações éticas e legais (Lenoir, 2000).

A comprovação de que o sangue de cordão umbilical também é rico em células-tronco mesenquimais e não apenas em células progenitoras hematopoiéticas ainda gera controvérsias. A principal hipótese reside no fato da camada subendotelial da veia umbilical (pericito) funcionar como “fonte” deste tipo de células, de forma que aquelas que estão presentes no sangue “migraram” de seu local original, ou seja, o subendotélio venoso, para se alojar na corrente sanguínea do cordão.

Os dados obtidos com as culturas de sangue de cordão congelado não nos permitem observar qualquer diferença entre as densidades iniciais de células sobre a razão de crescimento (figuras 28 e 29), a não ser pelo fato

de que quando as células foram plaqueadas em baixa densidade ( $1.10^3$  células/cm<sup>2</sup>), a concentração de 5% SFB não apresentou um crescimento significativamente diferente quando comparado com o controle. Através dos experimentos de incorporação de timidina radioativa, a concentração de SFB de 5% não foi significativamente diferente (figura 30). Apesar da viabilidade das células ter sido alta no momento do descongelamento (98%), estas células não sobreviviam por mais do que 10 dias na placa de cultura e não haviam células aderidas ao fundo da placa, ou seja, o processo de congelamento do sangue de cordão umbilical não preservava adequadamente as células progenitoras mesenquimais. Além disso, em 10 dias de cultura, mesmo em altas concentrações de soro, as células descongeladas de sangue de cordão umbilical não foram capazes nem mesmo de dobrar o número inicial de células. Ainda resta considerar que a porcentagem de células-tronco é extremamente baixa quando comparadas com os outros tipos celulares. Quanto ao congelamento de cordão, é amplamente conhecido que a criopreservação pode afetar o estado de algumas células mantidas em cultura, o que pode estar dificultando a manutenção destas células em cultura, e mesmo assim, Erices e colaboradores (Erices et al., 2000) demonstraram que as únicas amostras para as quais obtiveram sucesso na recuperação de células-tronco progenitoras mesenquimais foram obtidas de amostras de sangue de cordão umbilical não-congelado e de gestação com menos de 36 semanas.

Ainda é desconhecido o fenótipo da verdadeira célula-tronco hematopoiética. Pesquisas sobre a real potencialidade destas células ainda não geraram resultados conclusivos, portanto, ainda não se pode afirmar nada sobre sua plasticidade. Recentemente, alguns trabalhos mostraram uma plasticidade alta para células-tronco hematopoiéticas que possuíam a capacidade de diferenciar (transdiferenciar) tanto *in vitro* quanto *in vivo* em tipos celulares de linhagens germinativas não relacionadas (Brazelton et al.,

2000; Mezey et al., 2000). Outros estudos mostraram que esta “aparente” transdiferenciação podia ser devida à fusão celular (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002), quando mais de um tipo de células eram cultivados juntos na tentativa de indução de diferenciação, não excluindo também a possibilidade de ocorrer diferenciação. Recentemente, um trabalho publicado por Weimann e colaboradores (Weimann et al., 2003) mostraram que células-tronco hematopoiéticas obtidas a partir de medula óssea de doadores humanos, quando enxertadas em pacientes com doenças hematológicas e que sofreram quimioterapia, contribuía também para a formação de novas células de Pukinje no cérebro destes pacientes. Este trabalho foi feito, buscando-se por marcadores de cromossomo Y dos doadores homens no cérebro das receptoras mulheres. Foi visto, também, que algumas células apresentavam mais do que um número diplóide de cromossomos, no entanto, estas representavam menos que 30% da população de células diferenciadas.

Devido a isso foi realizado um intenso trabalho visando a caracterização das células mesenquimais obtidas tanto do sangue quanto da parede de cordão umbilical. Foi possível notar diferenças significativas entre as células mesenquimais da parede do cordão umbilical e do sangue do cordão umbilical, desde seu isolamento. As colônias formadas pelas células da parede, geralmente aparecem na placa, a partir de onde ocorre um grande assentamento de células endoteliais, enquanto que nas progenitoras mesenquimais do sangue, isto não é observado. O formato de cada uma das células também é muito característico. As células mesenquimais provenientes da parede do cordão são ligeiramente maiores, achatadas e espalham-se mais que as do sangue, que são menores e mais cilíndricas (figura 31). As células do sangue também cresciam mais rapidamente que as da parede do cordão, no entanto saturavam numa concentração 3 vezes menor que aquela observada nas células da parede do

cordão (figura 33). Ambas as células eram capazes de diferenciação na linhagem óssea *in vitro* (figura 32).

Verifica-se uma tendência para uma maior porcentagem de células marcadas contra os marcadores de células mesenquimais nas amostras obtidas das culturas de células da parede do cordão, quando comparadas com aquelas obtidas de sangue (figura 36, tabela 4). No entanto as amostras de sangue de cordão umbilical possuíam uma maior expressão dessas proteínas em suas células (figura38), além de uma maior expressão (aproximadamente o dobro) do mRNA de genes relacionados à pluripotência (figura 39). Estas células eram negativas para HLA-DR (uma proteína reconhecidamente ausente em células mesenquimais) e, estranhamente negativas também para CD117, que é conhecido também como c-Kit ou SCFR (receptor de *Stem Cell Factor*) um importante fator de crescimento de alguns tipos de células progenitoras.

As colônias formadas pelas células mesenquimais da parede do cordão eram formadas, a partir de um assentamento de um grande número de células endoteliais, visivelmente mostrando a interação entre essas células, enquanto que nas culturas de células mesenquimais do sangue, isto não é observado. Entretanto, durante a primeira passagem das células mesenquimais de sangue de cordão umbilical, foi observado que aproximadamente 50% das células aderidas são positivas para PECAM1 (CD31), que é um marcador de células endoteliais e 90% são positivas para LPS-R (CD14), marcador de macrófagos e monócitos, enquanto que nas células mesenquimais da parede de cordão somente 8% são positivas para CD31 e não foram observadas células positivas para CD14. Um fato interessante é que esta marcação tanto para CD31, quanto para CD14 desaparece a partir da segunda passagem. Por outro lado, a marcação de vários outros marcadores não é detectada até o aparecimento das colônias

fibroblastóides, nem mesmo em células mononucleares do sangue de cordão umbilical.

O que se sabe é que apesar de serem de origem similares, as diferentes células mesenquimais presentes no corpo possuem características diferentes. Panepucci e colaboradores compararam células mesenquimais originárias da medula óssea de doadores humanos com as células mesenquimais provenientes da camada subendotelial da parede da veia de cordões umbilicais (Panepucci et al., 2004). Apesar de serem fenotipicamente muito similares, estas células apresentaram profundas diferenças quando comparadas em relação à sua expressão gênica: enquanto as células derivadas da medula óssea expressavam uma maior quantidade de genes relacionados com osteogênese e atividade antimicrobial, aquelas derivadas da parede da veia de cordões umbilicais apresentaram uma maior expressão de genes relacionados com o remodelamento de matriz extracelular via metaloproteinases e angiogênese. Esta evidência corrobora nossa hipótese de que estas células, sangue de cordão umbilical e parede de cordão umbilical, supostamente de mesma origem, apresentam profundas diferenças fenotípicas e fisiológicas *in vitro*, podendo, até mesmo, apresentar graus diferentes de plasticidade também, sendo mais indicadas somente para alguns tipos de terapias. É provável que não possuam a mesma origem.

Nossas observações levam-nos à propor que o fenótipo mesenquimal consiste de um conjunto de características comuns a este grupo de células (crescimento fibroblastóide, expressão de moléculas de superfície, etc), que são provavelmente devidas ao método de cultivo destas, que envolve o cultivo sobre superfície plástica e na presença de soro, o que deve induzir o aparecimento do fenótipo. Estas células provavelmente estão presentes em todos os tecidos do corpo, sendo responsáveis pelo reparo quando o tecido sofre algum tipo de dano ou injúria. Esta particularidade explica o fato

destas células serem muito similares, mas, ainda assim, serem diferentes umas das outras, devido a características mantidas desde seus tecidos de origem. Eventualmente, em alguns tecidos, como a medula óssea, por possuírem uma fonte muito grande deste tipo de célula, estas células, sob certos estímulos, podem migrar, caindo na corrente sanguínea e aparecendo em outros tecidos.

Por outro lado, células CD14 positivas já foram descritas como sendo progenitoras de outros tipos celulares, como músculo, endotélio vascular, hepatócitos e ilhotas. Isso nos leva a crer que o CD14 possa ser um marcador da “verdadeira” células-tronco, pelo menos no caso das mesenquimais. Acredita-se que esta célula multipotente seja encontrada na corrente sanguínea de cordão umbilical e uma vez aderida ao plástico e sob o efeito do soro fetal bovino altere suas características, perca a expressão de CD14 e inicie a expressão de outros marcadores de superfície.

Num trabalho recente publicado ([Ruhnke et al., 2005](#)), foi observada a geração de células secretoras de insulina e células similares à hepatócitos a partir de monócitos de sangue periférico adulto. A reprogramação de monócitos do sangue na presença de citocinas (IL-3 e M-CSF) e a exposição subsequente a fatores de crescimento (EGF e HGF) e nicotinamida, permitiram obter células que expressavam insulina ([Ruhnke et al., 2005](#)). Estas células apresentaram-se funcionais tanto *in vitro* quanto *in vivo* e abriram uma enorme janela de possibilidades para a utilização deste tipo de células para terapia celular. Estas células foram chamadas de PCMOs (“*Programmable Cells of Monocytic Origin*”).

De modo geral, todos estes procedimentos parecem ser muito promissores, mas o mecanismo envolvido no processo de (trans) diferenciação, ainda é a questão-chave para melhorar os protocolos existentes.

## 6. Conclusões

- ✚ O modelo de células-tronco embrionárias murinas foi devidamente certificado através da geração de tumores (teratomas) quando injetadas em camundongos imunodeficientes.
- ✚ Foi possível gerar células que produziam e armazenavam insulina a partir de células-tronco embrionárias de camundongo.
- ✚ As células diferenciadas, produtoras de insulina, não respondiam ao estímulo de glicose e num ensaio de 7 dias, não foram capazes de reverter a hiperglicemia, quando implantadas em camundongos diabéticos, sugerindo que sua diferenciação/maturação ainda não estavam completa funcionalmente.
- ✚ As células diferenciadas expressavam genes característicos de células beta diferenciadas e em diferenciação.
- ✚ A partir das células-tronco diferenciadas, foi possível selecionar mais de 600 genes com expressão diferencial superior a 5 vezes, quando comparadas com as células indiferenciadas.
- ✚ Utilizando-se o programa *FatiGO* para classificar a lista dos genes de acordo com o processo biológico em que estão envolvidos, cerca de 5% dos genes selecionados possuíam função conhecida em processos de diferenciação celular.
- ✚ Foram selecionados 16 genes que até então não haviam sido relacionados com diferenciação de células beta, seja em humanos ou em murinos, visando novos alvos para terapia gênica.
- ✚ Dos 16 genes selecionados para análise, 13 tiveram seu aumento de expressão confirmado e 11 eram expressos também em células MIN-6, a maioria num nível de expressão muito mais baixo do que aquele encontrado nas células em diferenciação ou diferenciadas,

provavelmente pelo fato de MIN-6 ser uma célula transformada e terminalmente diferenciada.

- ✚ As células progenitoras mesenquimais de medula óssea de ratos proliferaram rapidamente em cultura e geraram *clusters* similares à ilhotas pancreáticas quando cultivadas em confluência e sob alta glicose e também, outros tipos celulares similares à neurônios.
- ✚ Os *clusters* gerados a partir das células de medula óssea de rato respondiam à Exendina 4 e Nicotinamida, no entanto não expressavam genes relacionados à diferenciação de células  $\beta$ .
- ✚ As células obtidas a partir de amostras de sangue de cordão umbilical humano congelado mostraram-se incapazes de serem mantidas em cultura e de gerar colônias de células mesenquimais.
- ✚ O cordão umbilical humano possui dois tipos distintos de células-tronco progenitoras mesenquimais: um está presente na parede da veia do cordão umbilical, enquanto o outro esta circulante na corrente, sendo que ambos aderem, crescem em formato de colônias mesenquimais e são capazes de diferenciação na linhagem óssea.
- ✚ As células da parede do cordão umbilical humano são maiores, achatadas e espalhadas, e crescem mais lentamente, sendo capazes de gerar agregados e atingir saturam em maior densidade na placa.
- ✚ As células do sangue do cordão umbilical humano são menores e alongadas, crescem mais rapidamente, não formam agregados e atingem menor densidade celular.
- ✚ Uma porcentagem maior das células da parede do cordão marca para os marcadores mesenquimais, no entanto, estes são mais expressos nas células do sangue do cordão umbilical.
- ✚ As células do sangue de cordão umbilical possuem uma maior expressão de genes relacionados com pluripotência do que as células da parede do cordão umbilical.

## 7. Referências Bibliográficas

- Achenbach, P., K. Warncke, et al. (2006). "Type 1 diabetes risk assessment: improvement by follow-up measurements in young islet autoantibody-positive relatives." Diabetologia **49**(12): 2969-76.
- Ackermann, A. M. and M. Gannon (2007). "Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion." J Mol Endocrinol **38**(1-2): 193-206.
- ADA (1999). "American Diabetes Association. Vital Statistics."
- Adorini, L. (2001). "Interleukin 12 and autoimmune diabetes." Nat Genet **27**(2): 131-2.
- Ahlgren, U., S. L. Pfaff, et al. (1997). "Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells." Nature **385**(6613): 257-60.
- Ahren, B. (2000). "Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease." Diabetologia **43**(4): 393-410.
- Akin, C. and D. D. Metcalfe (2004). "The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics." J Allergy Clin Immunol **114**(1): 13-9; quiz 20.
- Al-Shahrour, F., R. Diaz-Uriarte, et al. (2004). "FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes." Bioinformatics **20**(4): 578-80.
- Arias, A. E. and M. Bendayan (1993). "Differentiation of pancreatic acinar cells into duct-like cells in vitro." Lab Invest **69**(5): 518-30.
- Arseniev, L., N. Pickerd, et al. (1999). "Comparative evaluation of commonly used clones and fluorochrome conjugates of monoclonal antibodies for CD34 antigen detection." J Hematother Stem Cell Res **8**(5): 547-59.
- Artner, I., J. Le Lay, et al. (2006). "MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells." Diabetes **55**(2): 297-304.
- Assady, S., G. Maor, et al. (2001). "Insulin production by human embryonic stem cells." Diabetes **50**(8): 1691-7.
- Bach, J. F. (2002). "The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases." N Engl J Med **347**(12): 911-20.
- Baeyens, L., S. De Breuck, et al. (2005). "In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells." Diabetologia **48**(1): 49-57.

- Banerjee, M. and R. R. Bhonde (2003). "Islet generation from intra islet precursor cells of diabetic pancreas: in vitro studies depicting in vivo differentiation." Jop **4**(4): 137-45.
- Barker, J. M., S. H. Goehrig, et al. (2004). "Clinical characteristics of children diagnosed with type 1 diabetes through intensive screening and follow-up." Diabetes Care **27**(6): 1399-404.
- Barker, J. M., J. Yu, et al. (2005). "Autoantibody "subspecificity" in type 1 diabetes: risk for organ-specific autoimmunity clusters in distinct groups." Diabetes Care **28**(4): 850-5.
- Barker, J. N., D. J. Weisdorf, et al. (2005). "Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy." Blood **105**(3): 1343-7.
- Barrow, J., C. W. Hay, et al. (2006). "Transcription factor cycling on the insulin promoter." FEBS Lett **580**(2): 711-5.
- Bauer, G., D. Selander, et al. (2000). "Gene therapy for pediatric AIDS." Ann N Y Acad Sci **918**: 318-29.
- Bell, G. I. and K. S. Polonsky (2001). "Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function." Nature **414**(6865): 788-91.
- Bianco, P. and P. Gheron Robey (2000). "Marrow stromal stem cells." J Clin Invest **105**(12): 1663-8.
- Biden, T. J., D. Robinson, et al. (2004). "Chronic effects of fatty acids on pancreatic beta-cell function: new insights from functional genomics." Diabetes **53 Suppl 1**: S159-65.
- Bisikirska, B., J. Colgan, et al. (2005). "TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs." J Clin Invest **115**(10): 2904-13.
- Bjornson, C. R., R. L. Rietze, et al. (1999). "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo." Science **283**(5401): 534-7.
- Blyszczuk, P., J. Czyz, et al. (2003). "Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 998-1003.
- Bonner-Weir, S., M. Taneja, et al. (2000). "In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7999-8004.
- Bonner-Weir, S. and G. C. Weir (2005). "New sources of pancreatic beta-cells." Nat Biotechnol **23**(7): 857-61.
- Brazelton, T. R., F. M. Rossi, et al. (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." Science **290**(5497): 1775-9.

- Bresson, D., L. Togher, et al. (2006). "Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs." J Clin Invest **116**(5): 1371-81.
- Brittan, M. and N. A. Wright (2004). "Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development." Gut **53**(6): 899-910.
- Bruno, R. (1999). "Pacientes diabéticos em diálise: características clínicas, sobrevida e fatores prognósticos. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas." Endocrinologia.
- Bui, H., K. Perlman, et al. (2005). "Self-monitoring of blood glucose in children and teens with diabetes." Pediatr Diabetes **6**(1): 50-62.
- Burdon, T., I. Chambers, et al. (1999). "Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells." Cells Tissues Organs **165**(3-4): 131-43.
- Cao, L. Z., D. Q. Tang, et al. (2004). "High glucose is necessary for complete maturation of Pdx1-VP16-expressing hepatic cells into functional insulin-producing cells." Diabetes **53**(12): 3168-78.
- Chakrabarti, S. K. and R. G. Mirmira (2003). "Transcription factors direct the development and function of pancreatic beta cells." Trends Endocrinol Metab **14**(2): 78-84.
- Chatenoud, L. and J. F. Bach (2005). "Regulatory T cells in the control of autoimmune diabetes: the case of the NOD mouse." Int Rev Immunol **24**(3-4): 247-67.
- Choi, J. B., H. Uchino, et al. (2003). "Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells." Diabetologia **46**(10): 1366-74.
- Ciccolini, F. (2001). "Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development." Mol Cell Neurosci **17**(5): 895-907.
- Cissell, M. A., L. Zhao, et al. (2003). "Transcription factor occupancy of the insulin gene in vivo. Evidence for direct regulation by Nkx2.2." J Biol Chem **278**(2): 751-6.
- Cohen, J. L., A. Trenado, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease." J Exp Med **196**(3): 401-6.
- Colter, D. C., R. Class, et al. (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3213-8.
- Confer, L. D. (1998). "What do Transplant Centers want from Cord Blood Banks?" AABB Meeting.

- Conget, P. A. and J. J. Minguell (1999). "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells." J Cell Physiol **181**(1): 67-73.
- Covas, D. T., J. L. Siufi, et al. (2003). "Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells." Braz J Med Biol Res **36**(9): 1179-83.
- Cui, J., R. L. Wahl, et al. (1999). "Bone marrow cell trafficking following intravenous administration." Br J Haematol **107**(4): 895-902.
- Czyz, J., C. Wiese, et al. (2003). "Potential of embryonic and adult stem cells in vitro." Biol Chem **384**(10-11): 1391-409.
- Dao, M. A. and J. A. Nolte (2000). "CD34: to select or not to select? That is the question." Leukemia **14**(5): 773-6.
- Dariavach, P., M. G. Mattei, et al. (1988). "Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains." Eur J Immunol **18**(12): 1901-5.
- DCCT (1993). "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group." N Engl J Med **329**(14): 977-86.
- DCCT (1994). "Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Control and Complications Trial Research Group." J Pediatr **125**(2): 177-88.
- De Lisle, R. C. and C. D. Logsdon (1990). "Pancreatic acinar cells in culture: expression of acinar and ductal antigens in a growth-related manner." Eur J Cell Biol **51**(1): 64-75.
- Deans, R. J. and A. B. Moseley (2000). "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses." Exp Hematol **28**(8): 875-84.
- Delacour, A., V. Nepote, et al. (2004). "Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages." Mech Dev **121**(1): 3-14.
- DiPersio, J. F., H. Khoury, et al. (2000). "Innovations in allogeneic stem-cell transplantation." Semin Hematol **37**(1 Suppl 2): 33-41.
- Dohrmann, C., P. Gruss, et al. (2000). "Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas." Mech Dev **92**(1): 47-54.
- Domen, J. and I. L. Weissman (1999). "Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate." Mol Med Today **5**(5): 201-8.

- Dor, Y., J. Brown, et al. (2004). "Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation." Nature **429**(6987): 41-6.
- Doyle, M. E. and J. M. Egan (2001). "Glucagon-like peptide-1." Recent Prog Horm Res **56**: 377-99.
- Draper, J. S., K. Smith, et al. (2004). "Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **22**(1): 53-4.
- Du, W., F. S. Wong, et al. (2006). "TGF-beta signaling is required for the function of insulin-reactive T regulatory cells." J Clin Invest **116**(5): 1360-70.
- Edlund, H. (1998). "Transcribing pancreas." Diabetes **47**(12): 1817-23.
- Edlund, H. (1999). "Pancreas: how to get there from the gut?" Curr Opin Cell Biol **11**(6): 663-8.
- Edlund, H. (2002). "Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy." Nat Rev Genet **3**(7): 524-32.
- Eisenbarth, G. S. (2007). "Update in type 1 diabetes." J Clin Endocrinol Metab **92**(7): 2403-7.
- Erices, A., P. Conget, et al. (2000). "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." Br J Haematol **109**(1): 235-42.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.
- Fernandes, A., L. C. King, et al. (1997). "Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets." Endocrinology **138**(4): 1750-62.
- Fife, B. T., I. Guleria, et al. (2006). "Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway." J Exp Med **203**(12): 2737-47.
- Fine, I., A. R. Wade, et al. (2003). "Long-term deprivation affects visual perception and cortex." Nat Neurosci **6**(9): 915-6.
- Fisher, G. H., F. J. Rosenberg, et al. (1995). "Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome." Cell **81**(6): 935-46.
- Flier, J. S. (2004). "Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic." Cell **116**(2): 337-50.
- Fujikawa, T., S. H. Oh, et al. (2005). "Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells." Am J Pathol **166**(6): 1781-91.

- Fujita, A., J. R. Sato, et al. (2007). "GEDI: a user-friendly toolbox for analysis of large-scale gene expression data." BMC Bioinformatics **8**: 457.
- Fujita, Y., A. T. Cheung, et al. (2004). "Harnessing the gut to treat diabetes." Pediatr Diabetes **5 Suppl 2**: 57-69.
- Gaede, P., P. Vedel, et al. (1999). "Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomised study." Lancet **353**(9153): 617-22.
- Gale, E. A. (2005). "Latent autoimmune diabetes in adults: a guide for the perplexed." Diabetologia **48**(11): 2195-9.
- Garg, S. and L. Jovanovic (2006). "Relationship of fasting and hourly blood glucose levels to HbA1c values: safety, accuracy, and improvements in glucose profiles obtained using a 7-day continuous glucose sensor." Diabetes Care **29**(12): 2644-9.
- Gianani, R., A. Putnam, et al. (2006). "Initial results of screening of nondiabetic organ donors for expression of islet autoantibodies." J Clin Endocrinol Metab **91**(5): 1855-61.
- Gluckman, E. (2000). "Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation." Exp Hematol **28**(11): 1197-205.
- Grez, M., S. Becker, et al. (2000). "Gene therapy of chronic granulomatous disease." Bone Marrow Transplant **25 Suppl 2**: S99-104.
- Gupta, R. K. and K. H. Kaestner (2004). "HNF-4alpha: from MODY to late-onset type 2 diabetes." Trends Mol Med **10**(11): 521-4.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, et al. (1999). "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." Nature **401**(6751): 390-4.
- Guz, Y., I. Nasir, et al. (2001). "Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes." Endocrinology **142**(11): 4956-68.
- Habener, J. F., D. M. Kemp, et al. (2005). "Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development." Endocrinology **146**(3): 1025-34.
- Hall, P. A. and N. R. Lemoine (1992). "Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas." J Pathol **166**(2): 97-103.
- Havel, P. J. (2004). "Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism." Diabetes **53 Suppl 1**: S143-51.
- HDS (1993). "Hypertension in Diabetes Study (HDS): I. Prevalence of hypertension in newly presenting type 2 diabetic patients and the association with risk factors for cardiovascular and diabetic complications." J Hypertens **11**(3): 309-17.

- Herbein, G., H. Sovalat, et al. (1994). "Isolation and identification of two CD34+ cell subpopulations from normal human peripheral blood." Stem Cells **12**(2): 187-97.
- Hernandez-Sanchez, C., A. Mansilla, et al. (2003). "Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level." Embo J **22**(20): 5582-92.
- Herold, K. C., S. E. Gitelman, et al. (2005). "A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes." Diabetes **54**(6): 1763-9.
- Heron, L., A. Virsolvy, et al. (1999). "Isolation, characterization, and chromosomal localization of the human ENSA gene that encodes alpha-endosulfine, a regulator of beta-cell K(ATP) channels." Diabetes **48**(9): 1873-6.
- Hess, D., L. Li, et al. (2003). "Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration." Nat Biotechnol **21**(7): 763-70.
- Hoffenberg, E. J., L. M. Emery, et al. (2004). "Clinical features of children with screening-identified evidence of celiac disease." Pediatrics **113**(5): 1254-9.
- Hoffmann, P., J. Ermann, et al. (2002). "Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." J Exp Med **196**(3): 389-99.
- Homann, D. and G. S. Eisenbarth (2006). "An immunologic homunculus for type 1 diabetes." J Clin Invest **116**(5): 1212-5.
- Hori, Y., I. C. Rulifson, et al. (2002). "Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16105-10.
- Horie, N., T. Moriya, et al. (2004). "Lowered glucose suppressed the proliferation and increased the differentiation of murine neural stem cells in vitro." FEBS Lett **571**(1-3): 237-42.
- Hui, H. and R. Perfetti (2002). "Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood." Eur J Endocrinol **146**(2): 129-41.
- Hurley, C. K., J. A. Wade, et al. (1999). "A special report: histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors. Quality Assurance and Donor Registries Working Groups of the World Marrow Donor Association." Hum Immunol **60**(4): 347-60.
- Huss, R. (2000). "Isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources." Stem Cells **18**(1): 1-9.
- Hussain, M. A. and N. D. Theise (2004). "Stem-cell therapy for diabetes mellitus." Lancet **364**(9429): 203-5.

- Hutton, J. C. and G. S. Eisenbarth (2003). "A pancreatic beta-cell-specific homolog of glucose-6-phosphatase emerges as a major target of cell-mediated autoimmunity in diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8626-8.
- Ianus, A., G. G. Holz, et al. (2003). "In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion." J Clin Invest **111**(6): 843-50.
- in 't Anker, P. S., W. A. Noort, et al. (2003). "Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice." Exp Hematol **31**(10): 881-9.
- Jaroscak, J., K. Goltry, et al. (2003). "Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System." Blood **101**(12): 5061-7.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-9.
- Johnson, J. D., N. T. Ahmed, et al. (2003). "Increased islet apoptosis in Pdx1+/- mice." J Clin Invest **111**(8): 1147-60.
- Jonsson, J., L. Carlsson, et al. (1994). "Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice." Nature **371**(6498): 606-9.
- Kent, S. C., Y. Chen, et al. (2005). "Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope." Nature **435**(7039): 224-8.
- Keymeulen, B., E. Vandemeulebroucke, et al. (2005). "Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes." N Engl J Med **352**(25): 2598-608.
- Kim, D. W., Y. J. Chung, et al. (2004). "Cotransplantation of third-party mesenchymal stromal cells can alleviate single-donor predominance and increase engraftment from double cord transplantation." Blood **103**(5): 1941-8.
- Kim, S. K. and R. J. MacDonald (2002). "Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis." Curr Opin Genet Dev **12**(5): 540-7.
- Kim, S. Y., S. H. Lee, et al. (2004). "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 **230**(1): 1-11.
- Kodama, S., W. Kuhlreiber, et al. (2003). "Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice." Science **302**(5648): 1223-7.
- Kogler, G., W. Nurnberger, et al. (1999). "Simultaneous cord blood transplantation of ex vivo expanded together with non-expanded cells for high risk leukemia." Bone Marrow Transplant **24**(4): 397-403.

- Kojima, H., M. Fujimiya, et al. (2003). "NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice." Nat Med **9**(5): 596-603.
- Kolb, H. and T. Mandrup-Poulsen (2005). "An immune origin of type 2 diabetes?" Diabetologia **48**(6): 1038-50.
- Krishnamurthy, B., N. L. Dudek, et al. (2006). "Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP." J Clin Invest **116**(12): 3258-65.
- Ku, H. T., N. Zhang, et al. (2004). "Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas in vitro." Stem Cells **22**(7): 1205-17.
- Kushida, T., M. Inaba, et al. (2001). "Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice." Blood **97**(10): 3292-9.
- Lan, R. Y., A. A. Ansari, et al. (2005). "Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity." Autoimmun Rev **4**(6): 351-63.
- Lechner, A., Y. G. Yang, et al. (2004). "No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo." Diabetes **53**(3): 616-23.
- Lee, M. S., I. Chang, et al. (2004). "Death effectors of beta-cell apoptosis in type 1 diabetes." Mol Genet Metab **83**(1-2): 82-92.
- Lehto, S., T. Ronnema, et al. (1997). "Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM." Diabetes **46**(8): 1354-9.
- Lenoir, N. (2000). "Europe confronts the embryonic stem cell research challenge." Science **287**(5457): 1425-7.
- Leon-Quinto, T., J. Jones, et al. (2004). "In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells." Diabetologia **47**(8): 1442-51.
- Li, W. C., M. E. Horb, et al. (2005). "In vitro transdifferentiation of hepatoma cells into functional pancreatic cells." Mech Dev **122**(6): 835-47.
- Liang, Y. and F. M. Matschinsky (1994). "Mechanisms of action of nonglucose insulin secretagogues." Annu Rev Nutr **14**: 59-81.
- Liu, Y. and C. A. Janeway, Jr. (1992). "Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 3845-9.
- Lombaert, I. M., P. K. Wierenga, et al. (2006). "Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands." Clin Cancer Res **12**(6): 1804-12.

- Lumelsky, N., O. Blondel, et al. (2001). "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." Science **292**(5520): 1389-94.
- Maestre, I., J. Jordan, et al. (2003). "Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1." Endocrinology **144**(1): 335-45.
- Maria-Engler, S. S., M. L. Correa-Giannella, et al. (2004). "Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures." J Endocrinol **183**(3): 455-67.
- Mathews, V., P. T. Hanson, et al. (2004). "Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury." Diabetes **53**(1): 91-8.
- Mathis, D., L. Vence, et al. (2001). "beta-Cell death during progression to diabetes." Nature **414**(6865): 792-8.
- Matsuoka, T. A., I. Artner, et al. (2004). "The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2930-3.
- Mazurier, F., M. Doedens, et al. (2003). "Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells." Nat Med **9**(7): 959-63.
- McAlister, V. C., Z. Gao, et al. (2000). "Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression." Lancet **355**(9201): 376-7.
- McKinnon, C. M. and K. Docherty (2001). "Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function." Diabetologia **44**(10): 1203-14.
- McNiece, I. K., G. Almeida-Porada, et al. (2002). "Ex vivo expanded cord blood cells provide rapid engraftment in fetal sheep but lack long-term engrafting potential." Exp Hematol **30**(6): 612-6.
- Meier, J. J., A. Bhushan, et al. (2005). "Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?" Diabetologia **48**(11): 2221-8.
- Melloul, D., S. Marshak, et al. (2002). "Regulation of insulin gene transcription." Diabetologia **45**(3): 309-26.
- Mezey, E., K. J. Chandross, et al. (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science **290**(5497): 1779-82.
- Minguell, J. J., P. Conget, et al. (2000). "Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells." Braz J Med Biol Res **33**(8): 881-7.

- Minguell, J. J., A. Erices, et al. (2001). "Mesenchymal stem cells." Exp Biol Med (Maywood) **226**(6): 507-20.
- Miura, M., S. Gronthos, et al. (2003). "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5807-12.
- Miyazaki, S., E. Yamato, et al. (2004). "Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells." Diabetes **53**(4): 1030-7.
- Miyoshi, H., K. A. Smith, et al. (1999). "Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors." Science **283**(5402): 682-6.
- Mordes, J. P., R. Bortell, et al. (2004). "Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity." Ilar J **45**(3): 278-91.
- Moritoh, Y., E. Yamato, et al. (2003). "Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells." Diabetes **52**(5): 1163-8.
- Movassat, J., G. M. Beattie, et al. (2002). "Exendin 4 up-regulates expression of PDX 1 and hastens differentiation and maturation of human fetal pancreatic cells." J Clin Endocrinol Metab **87**(10): 4775-81.
- Mukherjee, R., P. Chaturvedi, et al. (2003). "CD4+CD25+ regulatory T cells generated in response to insulin B:9-23 peptide prevent adoptive transfer of diabetes by diabetogenic T cells." J Autoimmun **21**(3): 221-37.
- Mutoh, H., B. P. Fung, et al. (1997). "The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3560-4.
- Mysliwska, J., K. Zorena, et al. (2005). "High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients." Eur Cytokine Netw **16**(2): 117-22.
- Nagasao, J., K. Yoshioka, et al. (2004). "Expression of nestin and IGF-1 in rat pancreas after streptozotocin administration." Anat Histol Embryol **33**(1): 1-4.
- Nakayama, M., N. Abiru, et al. (2005). "Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice." Nature **435**(7039): 220-3.
- Naya, F. J., H. P. Huang, et al. (1997). "Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice." Genes Dev **11**(18): 2323-34.
- Nesher, R., E. Anteby, et al. (2002). "Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose." Diabetes **51 Suppl 1**: S68-73.

- Newgard, C. B., D. Lu, et al. (2002). "Stimulus/secretion coupling factors in glucose-stimulated insulin secretion: insights gained from a multidisciplinary approach." Diabetes **51 Suppl 3**: S389-93.
- Nishimura, W., T. Kondo, et al. (2006). "A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells." Dev Biol **293**(2): 526-39.
- Nistico, L., R. Buzzetti, et al. (1996). "The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry." Hum Mol Genet **5**(7): 1075-80.
- Noort, W. A., A. B. Kruisselbrink, et al. (2002). "Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice." Exp Hematol **30**(8): 870-8.
- Notkins, A. L. (2002). "Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes." J Biol Chem **277**(46): 43545-8.
- Oh, S. H., T. M. Muzzonigro, et al. (2004). "Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes." Lab Invest **84**(5): 607-17.
- Olbrot, M., J. Rud, et al. (2002). "Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6737-42.
- Otonkoski, T., G. M. Beattie, et al. (1993). "Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells." J Clin Invest **92**(3): 1459-66.
- Ouyang, Q., N. E. Standifer, et al. (2006). "Recognition of HLA class I-restricted beta-cell epitopes in type 1 diabetes." Diabetes **55**(11): 3068-74.
- Palmer, J. P., C. M. Asplin, et al. (1983). "Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment." Science **222**(4630): 1337-9.
- Pan, D., E. Aronovich, et al. (2000). "Retroviral vector design studies toward hematopoietic stem cell gene therapy for mucopolysaccharidosis type I." Gene Ther **7**(21): 1875-83.
- Panepucci, R. A., J. L. Siufi, et al. (2004). "Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Stem Cells **22**(7): 1263-78.
- Panzram, G. (1987). "Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus." Diabetologia **30**(3): 123-31.
- Pecora, A. L., P. Stiff, et al. (2000). "Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using ex vivo

- expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood." Bone Marrow Transplant **25**(7): 797-9.
- Pelosi, E., M. Valtieri, et al. (2002). "Identification of the hemangioblast in postnatal life." Blood **100**(9): 3203-8.
- Perin, E. C., H. F. Dohmann, et al. (2003). "Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure." Circulation **107**(18): 2294-302.
- Pessina, A., B. Eletti, et al. (2004). "Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells." Biochem Biophys Res Commun **323**(1): 315-22.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Piro, S., M. Anello, et al. (2002). "Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress." Metabolism **51**(10): 1340-7.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Pociot, F. and M. F. McDermott (2002). "Genetics of type 1 diabetes mellitus." Genes Immun **3**(5): 235-49.
- Prentki, M., E. Joly, et al. (2002). "Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes." Diabetes **51 Suppl 3**: S405-13.
- Prusa, A. R., E. Marton, et al. (2003). "Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research?" Hum Reprod **18**(7): 1489-93.
- Qu-Petersen, Z., B. Deasy, et al. (2002). "Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration." J Cell Biol **157**(5): 851-64.
- Rajagopal, J., W. J. Anderson, et al. (2003). "Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake." Science **299**(5605): 363.
- Ramiya, V. K., M. Maraist, et al. (2000). "Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells." Nat Med **6**(3): 278-82.
- REDCDM (1997). "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." Diabetes Care **20**(7): 1183-97.
- Richards, M., C. Y. Fong, et al. (2002). "Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells." Nat Biotechnol **20**(9): 933-6.

- Ricordi, C., P. E. Lacy, et al. (1988). "Automated method for isolation of human pancreatic islets." Diabetes **37**(4): 413-20.
- Roche, E., M. P. Sepulcre, et al. (2003). "Bio-engineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells: a review of progress." Med Biol Eng Comput **41**(4): 384-91.
- Roep, B. O. (2003). "The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure." Diabetologia **46**(3): 305-21.
- Romanov, Y. A., V. A. Svintsitskaya, et al. (2003). "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord." Stem Cells **21**(1): 105-10.
- Rubio, D., J. Garcia-Castro, et al. (2005). "Spontaneous human adult stem cell transformation." Cancer Res **65**(8): 3035-9.
- Rudd, C. E. (1996). "Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function." Immunity **4**(6): 527-34.
- Ruhnke, M., H. Ungefroren, et al. (2005). "Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells." Gastroenterology **128**(7): 1774-86.
- Ryan, E. A., B. W. Paty, et al. (2005). "Five-year follow-up after clinical islet transplantation." Diabetes **54**(7): 2060-9.
- Saltiel, A. R. (2001). "New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes." Cell **104**(4): 517-29.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press **3**: various.
- Sander, M., L. Sussel, et al. (2000). "Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas." Development **127**(24): 5533-40.
- Schuchman, E. H. (1999). "Hematopoietic stem cell gene therapy for Niemann-Pick disease and other lysosomal storage diseases." Chem Phys Lipids **102**(1-2): 179-88.
- Secco, M., E. Zucconi, et al. (2008). "Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood!" Stem Cells **26**(1): 146-50.
- Segev, H., B. Fishman, et al. (2004). "Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters." Stem Cells **22**(3): 265-74.

- Shapiro, A. M., J. R. Lakey, et al. (2000). "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen." N Engl J Med **343**(4): 230-8.
- Shields, L. E., H. P. Kiem, et al. (2000). "Highly efficient gene transfer into preterm CD34 hematopoietic progenitor cells." Am J Obstet Gynecol **183**(3): 732-7.
- Shpall, E. J., R. Quinones, et al. (2002). "Transplantation of ex vivo expanded cord blood." Biol Blood Marrow Transplant **8**(7): 368-76.
- Silvestre, J. A. (1997). "Hospitalizações SUS 1997." Coordenadoria da saúde do idoso. Ministério da Saúde.
- Sipione, S., A. Eshpeter, et al. (2004). "Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells." Diabetologia **47**(3): 499-508.
- Smith, A. G. (2001). "Embryo-derived stem cells: of mice and men." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 435-62.
- Soria, B., E. Roche, et al. (2000). "Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice." Diabetes **49**(2): 157-62.
- Soria, B., A. Skoudy, et al. (2001). "From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus." Diabetologia **44**(4): 407-15.
- Souza, F., N. Simpson, et al. (2006). "Longitudinal noninvasive PET-based beta cell mass estimates in a spontaneous diabetes rat model." J Clin Invest **116**(6): 1506-13.
- Spichler, E. R. S., D. Spichler, et al. (1998). "Diabetic lower extremities amputation - Rio de Janeiro, BR." Diabetologia **41**((A279)): 90-96.
- St-Onge, L., R. Wehr, et al. (1999). "Pancreas development and diabetes." Curr Opin Genet Dev **9**(3): 295-300.
- Stene, L. C., K. Barriga, et al. (2006). "Normal but increasing hemoglobin A1c levels predict progression from islet autoimmunity to overt type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY)." Pediatr Diabetes **7**(5): 247-53.
- Strain, A. J. and H. A. Crosby (2000). "Hepatic stem cells." Gut **46**(6): 743-5.
- Street, C. N., J. R. Lakey, et al. (2004). "Heterogenous expression of nestin in human pancreatic tissue precludes its use as an islet precursor marker." J Endocrinol **180**(2): 213-25.
- Su, M. A. and M. S. Anderson (2004). "Aire: an update." Curr Opin Immunol **16**(6): 746-52.

- Sukoyan, M. A., A. Y. Kerkis, et al. (2002). "Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases." Braz J Med Biol Res **35**(5): 535-42.
- Sutherland, D. E., R. W. Gruessner, et al. (2001). "Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus." World J Surg **25**(4): 487-96.
- Suzuki, A., H. Nakauchi, et al. (2004). "Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting." Diabetes **53**(8): 2143-52.
- Suzuki, A., Y. W. Zheng, et al. (2004). "Liver repopulation by c-Met-positive stem/progenitor cells isolated from the developing rat liver." Hepatogastroenterology **51**(56): 423-6.
- Taneera, J., A. Rosengren, et al. (2006). "Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic beta-cell fate." Diabetes **55**(2): 290-6.
- Tang, D. Q., L. Z. Cao, et al. (2004). "In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow." Diabetes **53**(7): 1721-32.
- Taylor, P. A., C. J. Lees, et al. (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." Blood **99**(10): 3493-9.
- Taylor, P. A., R. J. Noelle, et al. (2001). "CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade." J Exp Med **193**(11): 1311-8.
- Terada, N., T. Hamazaki, et al. (2002). "Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion." Nature **416**(6880): 542-5.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.
- Thor, S., J. Ericson, et al. (1991). "The homeodomain LIM protein Isl-1 is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat." Neuron **7**(6): 881-9.
- Timper, K., D. Seboek, et al. (2006). "Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells." Biochem Biophys Res Commun **341**(4): 1135-40.
- Tivol, E. A., F. Borriello, et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." Immunity **3**(5): 541-7.
- Toma, J. G., M. Akhavan, et al. (2001). "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin." Nat Cell Biol **3**(9): 778-84.
- Treutelaar, M. K., J. M. Skidmore, et al. (2003). "Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet." Diabetes **52**(10): 2503-12.

- Turvey, S. E., E. Swart, et al. (2005). "Noninvasive imaging of pancreatic inflammation and its reversal in type 1 diabetes." J Clin Invest **115**(9): 2454-61.
- UKPDS (1998). "Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group." Lancet **352**(9131): 837-53.
- UKPDS (1998a). "Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group." Lancet **352**(9131): 854-65.
- UKPDS (1998b). "Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group." Bmj **317**(7160): 703-13.
- Vassilopoulos, G., P. R. Wang, et al. (2003). "Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion." Nature **422**(6934): 901-4.
- Vella, A., J. D. Cooper, et al. (2005). "Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms." Am J Hum Genet **76**(5): 773-9.
- Vogel, G. (2000). "Can old cells learn new tricks?" Science **287**(5457): 1418-9.
- Voltarelli, J. C., C. E. Couri, et al. (2007). "Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus." Jama **297**(14): 1568-76.
- Wagers, A. J. and I. L. Weissman (2004). "Plasticity of adult stem cells." Cell **116**(5): 639-48.
- Wagner, V. M., E. Muller-Godeffroy, et al. (2005). "Age, metabolic control and type of insulin regime influences health-related quality of life in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus." Eur J Pediatr **164**(8): 491-6.
- Wang, J., T. Kimura, et al. (2003). "SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34<sup>-</sup> cells assured by intra-bone marrow injection." Blood **101**(8): 2924-31.
- Wang, J., D. Miao, et al. (2007). "Prevalence of autoantibody-negative diabetes is not rare at all ages and increases with older age and obesity." J Clin Endocrinol Metab **92**(1): 88-92.
- Wang, R., J. Li, et al. (2004). "Phenotypic analysis of c-Kit expression in epithelial monolayers derived from postnatal rat pancreatic islets." J Endocrinol **182**(1): 113-22.

- Wang, R., J. Li, et al. (2005). "Nestin expression and clonal analysis of islet-derived epithelial monolayers: insight into nestin-expressing cell heterogeneity and differentiation potential." J Endocrinol **184**(2): 329-39.
- Wang, R., N. Yashpal, et al. (2004). "Hepatocyte growth factor regulates proliferation and differentiation of epithelial monolayers derived from islets of postnatal rat pancreas." J Endocrinol **183**(1): 163-71.
- Weimann, J. M., C. A. Charlton, et al. (2003). "Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 2088-93.
- Weissman, I. L. (2000). "Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities." Science **287**(5457): 1442-6.
- Wexler, S. A., C. Donaldson, et al. (2003). "Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not." Br J Haematol **121**(2): 368-74.
- Wildin, R. S. and A. Freitas (2005). "IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives." J Autoimmun **25** *Suppl*: 56-62.
- Yahata, T., K. Ando, et al. (2003). "A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow." Blood **101**(8): 2905-13.
- Yang, L., S. Li, et al. (2002). "In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8078-83.
- Yashpal, N. K., J. Li, et al. (2004). "Characterization of c-Kit and nestin expression during islet cell development in the prenatal and postnatal rat pancreas." Dev Dyn **229**(4): 813-25.
- Yates, K., A. Hasnat Milton, et al. (2006). "Continuous glucose monitoring-guided insulin adjustment in children and adolescents on near-physiological insulin regimens: a randomized controlled trial." Diabetes Care **29**(7): 1512-7.
- Ying, Q. L., J. Nichols, et al. (2002). "Changing potency by spontaneous fusion." Nature **416**(6880): 545-8.
- Zalzman, M., L. Anker-Kitai, et al. (2005). "Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype." Diabetes **54**(9): 2568-75.
- Zalzman, M., S. Gupta, et al. (2003). "Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7253-8.

- Zhang, S., D. Wang, et al. (2004). "Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo." Circulation **110**(25): 3803-7.
- Zhong, J. F., Y. Zhan, et al. (2002). "Murine hematopoietic stem cell distribution and proliferation in ablated and nonablated bone marrow transplantation." Blood **100**(10): 3521-6.
- Zimmet, P., K. G. Alberti, et al. (2001). "Global and societal implications of the diabetes epidemic." Nature **414**(6865): 782-7.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." Tissue Eng **7**(2): 211-28.
- Zulewski, H., E. J. Abraham, et al. (2001). "Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes." Diabetes **50**(3): 521-33.

## 8. Apêndices

### 8.1. *Primers Utilizados*

#### 8.1.1. Primers de Camundongo

| <i>Gene</i> | <i>Sequência</i>            |
|-------------|-----------------------------|
| mAldh1a2F   | - AGGATGGATGCGTCTGAAAGA     |
| mAldh1a2R   | - TTAGGGATTCCATAGTTGCAAGAGT |
| mAscl1F     | - ACCGGGTCAAGTTGGTCAAC      |
| mAscl1R     | - CGTCTCCACCTTGCTCATCTT     |
| mCxcl12F    | - CATCAGTGACGGTAAACCAGTCA   |
| mCxcl12R    | - TGTTGAGGATTTTCAGATGCTTGA  |
| mCxcr4F     | - ACGGCTGTAGAGCGAGTGTTG     |
| mCxcr4R     | - AGTCTCCAGAACCCACTTCTTCA   |
| mDecorinF   | - CCTACCGATGCCAGTGTCATCT    |
| mDecorinR   | - AGGTTGTGTCGGGTGGAAAA      |
| mDNERF      | - CAACCGTGACACTGCCAACT      |
| mDNERR      | - CAACATCAGGGACCACCTCTACT   |
| mEN1F       | - TGGGTCTACTGCACACGCTATT    |
| mEN1R       | - GGAACTCCGCCTTGAGTCTCT     |
| mGLUT2rtF   | - AGATCGCTCCAACCACACTCA     |
| mGLUT2rtR   | - GGCCAGCAATCTGACTAATAAGAAT |
| mINS1rtF    | - TAAAGCTGGTGGGCATCCA       |
| mINS1rtR    | - GCACCAACAGGGCCATGT        |
| mINS2rtF    | - AGGACCCACAAGTGGCACAA      |
| mINS2rtR    | - GATCTACAATGCCACGCTTCTG    |
| mISLrtF     | - AACCCAACGACAAAATAATATCCA  |
| mISLrtR     | - TAGCCTGTAAACCACCATCATGTCT |
| mKitlF      | - AAGGAGATCTGCGGGAATCC      |
| mKitlR      | - GGCACATAGTTGAGGGTTATCA    |
| mNrp1F      | - TCCAATCAGAGTTCCCGACAT     |
| mNrp1R      | - GAGCTGTGCATGGCTGTCAT      |
| mNtrk3F     | - CAGTACTTCCGTCAGGGTCACA    |
| mNtrk3R     | - CCAATTCTCTCTTCAACACGATGT  |
| mPbx1F      | - TCAGTGGAGCATTCCGACTACA    |
| mPbx1R      | - TCATTGCATGCCTGCTCATACT    |
| mPDX1rtF    | - TCCAAAACCGTTCGCATGAA      |
| mPDX1rtR    | - CAATCTTGCTCCGGCTCTTC      |

|            |                           |
|------------|---------------------------|
| mTenascinF | - ACAGTCAGGGCGTTAACTGGTT  |
| mTenascinR | - GCTTACGCCTGCCTTCCA      |
| mZic1F     | - CGAGCGACAAGCCCTACCT     |
| mZic1R     | - AGGACTCATGGACCTTCATGTGT |

### 8.1.2. Primers de Rato

| <i>Gene</i> | <i>Sequência</i>             |
|-------------|------------------------------|
| INSF        | - CCCTAAGTGACCAGCTACAATCATAG |
| INSR        | - TTTGACAAAAGCCTGGGCAGGCTT   |

### 8.1.3. Primers de Humano

| <i>Gene</i> | <i>Sequência</i>           |
|-------------|----------------------------|
| NANOG F     | - CATCCTGAACCTCAGCTACAAACA |
| NANGO R     | - TTGCTATTCTTCGGCCAGTTGT   |
| OCT4 F      | - AAGCTCCTGAAGCAGAAGAGGA   |
| OCT4 R      | - ATGCTCGTTTGGCTGAATACCT   |
| SSEA1 F     | - AAGAGCATGCAGTTTGGAGTCA   |
| SSEA1 R     | - GGCATTCATGCATTGTAAAGGA   |

# SÚMULA CURRICULAR

## DADOS PESSOAIS

*Nome:* Fernando Henrique Lojudice da Silva  
*Nascimento:* 17/05/1980 - São José do Rio Preto/SP - Brasil  
*Carteira de Identidade:* 266471596 SSP - SP - 09/02/2004  
*CPF:* 28629814861

*Endereço residencial:* Av. Nossa Senhora da Assunção, nº 647, ap 23  
Butantã - Sao Paulo  
05359001, SP - Brasil  
Telefone: 11 81141312

*Endereço eletrônico* : lojudice@iq.usp.br

## FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2001           Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica).  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil  
Título: Clonagem e Caracterização de Genes Diferencialmente Expressos Durante o Processo de Diferenciação de Células-Tronco (Stem Cells") em Células Secretoras de Insulina  
Orientador: Profª Drª Mari Cleide Sogayar  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

1998 - 2001 Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2000 - 2005 Graduação em Licenciatura para Ciências Biológicas.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

## ATUAÇÃO PROFISSIONAL

4/2002 - Atual **Projeto de pesquisa**, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica

1. Clonagem e Caracterização de Genes Diferencialmente Expresso Durante o Processo de Diferenciação de Células-Tronco ("Stem Cells") em Células Secretoras de Insulina

7/2000 - Atual **Projeto de pesquisa**, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica

1. Isolamento de Ilhotas Pancreáticas Humanas para Transplante em Pacientes Diabéticos

7/2003 - Atual **Projeto de ensino e pesquisa**, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica

1. Orientação de Aluno de Iniciação Científica para a geração de novas terapias para o diabetes.  
Produção de proteínas recombinantes, para o tratamento do diabetes.

2002 - Atual **Cursos para Graduação**, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica

Esporte e Nutrição: uma abordagem bioquímica – QBQ-2002

1. Disciplina optativa oferecida para alunos de graduação da Universidade de São Paulo.
2. Disciplina optativa oferecida para alunos de graduação da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (EFOA).
3. Disciplina optativa oferecida no XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq.

7/2000 - 12/2001 **Estágio**, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica

1. Extração e Purificação de Ilhotas Pancreáticas Humanas e Busca de Genes Induzidos por Glicose e Prolactina em Ilhotas Pancreáticas Humanas

2/1999 - 6/2000 **Estágio**, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica

1. Caracterização da proteína Rrp43p de *Saccharomyces cerevisiae* na Degradação de mRNA e no Processamento dos rRNA 5S, 25S e 18S

3/1999 - 7/1999 **Estágio**, Instituto de Biociências, Interdepartamental

1. Monitor voluntário da disciplina "Fauna, Flora e Ambiente - 041.101

7/1998 - 12/1998 **Estágio**, Instituto de Geociências, Departamento de Paleontologia e Estratigrafia

1. Catalogação e Limpeza da Coleção Paleobotânica

## IDIOMAS

Inglês nível Fluente

Espanhol nível Fluente

Francês nível Básico

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### Artigos completos publicados em periódicos

1. Lojudice, F.H., SOGAYAR, Mari Cleide, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, AITA, Carlos Alberto Mayora, GENZINI, Tercio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene, SILVA, Irenice Cairo da, KROGH, Karin, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, LABRIOLA, Letícia, MENDONÇA, Zizi de, FRANCO, Denise, NODA, Eduardo, GOLDBERG, Anna Carla  
First Brazilian Pancreatic Islet Transplantation in a Patient with type 1 Diabetes Mellitus. Transplantation Proceedings. , v.36, p.1117 - 1118, 2004.

2. Lojudice, F.H., SILVA, Daniel, ZANCHIN, Nilson, OLIVEIRA, Carla Columbano, PESSOA JUNIOR, Adalberto  
Overexpression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Genetically Modified Saccharomyces cerevisiae. Applied Biochemistry and Biotechnology. , v.91, p.161 - 169, 2001.

3. Fernando H. Lojudice, Vitor A. Fortuna, Letícia Labriola, Anna C. Goldberg, Freddy G. Eliaschewitz & Mari C. Sogayar (2005). CÉLULAS-TRONCO PARA O TRATAMENTO DE DIABETES MELLITUS, In: Células Tronco. Marco Antonio Zago & Dimas Covas, Edits. Editora o Atheneu.

4. Letícia Labriola, Wagner R Montor, Karin Krogh, Fernando H Lojudice, Tercio Genzini, Anna C Goldberg, Freddy G Eliaschewitz & Mari Cleide Sogayar (2006). Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet cell cultures. Molecular and Cellular Endocrinology.

### Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. KROGH, Karin, COLIN, Christian, BENGTON, Mario Henrique, LABRIOLA, Letícia, AITA, Carlos Alberto Mayora, Lojudice, F.H., OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, SÁ, Sandra Valéria, GIANELLA, Maria Lúcia Corrêa, MACHADO, Marcel C, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene L, GIANELLA NETO, Daniel, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, SOGAYAR, Mari Cleide  
Identification of differentially expressed genes in human insulinoma and in normal islet cells In: AACR, 2004, Los Angeles. , 2004.

2. SOGAYAR, Mari Cleide, AITA, Carlos Alberto Mayora, Lojudice, F.H., LABRIOLA, Letícia, KROGH, Karin, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene L, GOLDBERG, Anna Carla, SILVA, Irenice Cairo da, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg  
Islet Transplantation for Diabetes Cure: Challenges and Perspectives In: SBBq, 2003,

Caxambú-MG.  
, 2003.

3. OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, AITA, Carlos Alberto Mayora, Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, SILVA, Irenice Cairo da, KROGH, Karin, LABRIOLA, Letícia, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, GOLDBERG, Anna Carla, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, SOGAYAR, Mari Cleide, NORONHA, Irene L

Avaliação Funcional IN VITRO e IN VIVO de Ilhotas Pancreáticas Humanas In: XXII Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2004, Salvador-BA.

**Jornal Brasileiro de Nefrologia.** , 2004. v.26. p.79 - 79

4. Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, SOGAYAR, Mari Cleide, AITA, Carlos Alberto Mayora, SILVA, Irenice Cairo da, KROGH, Karin, LABRIOLA, Letícia, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, GOLDBERG, Anna Carla, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, NORONHA, Irene L

Isolamento de Ilhotas Pancreáticas Humanas na Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo In: XXII Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2004, Salvador-BA.

**Jornal Brasileiro de Nefrologia.** , 2004. v.26. p.90 - 90

5. OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, SOGAYAR, Mari Cleide, NORONHA, Irene L, AITA, Carlos Alberto Mayora, Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, SILVA, Irenice Cairo da, KROGH, Karin, LABRIOLA, Letícia, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, GOLDBERG, Anna Carla, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg

Microencapsulamento de Ilhotas Pancreáticas Humanas In: XXII Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2004, Salvador-BA.

**Jornal Brasileiro de Nefrologia.** , 2004. v.47. p.91 - 91

5. LABRIOLA, Letícia, AITA, Carlos Alberto Mayora, MONTOR, Wagner Ricardo, Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, KROGH, Karin, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene L, GOLDBERG, Anna Carla, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, SOGAYAR, Mari Cleide

Beneficial Effects of Human Prolactin (hPRL) and Laminin on Human Islet Primary Culture In: 9th Congress of the International Pancreas & Islet Transplant Association, 2003, Dublin-Irlanda.

**Final Programme & Book of Abstracts.** , 2003. p.94 - 94

6. SOGAYAR, Mari Cleide, AITA, Carlos Alberto Mayora, Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, LABRIOLA, Letícia, KROGH, Karin, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, SILVA, Irenice Cairo da, MENDONÇA, Zizi de, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene L, FRANCO, Denise, NODA, Eduardo, CASTRO, Luis A de, GOLDBERG, Anna Carla, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg

Brazilian Islet Transplantation Program: First Allograft in a Type I DM Patient In: COPEM, 2003, São Paulo.

**V Congresso Paulista de Endocrinologia & Metabologia.** , 2003. v.47. p.36 - 36

7. LABRIOLA, Letícia, AITA, Carlos Alberto Mayora, MONTOR, Wagner Ricardo, Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, KROGH, Karin, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene L, GOLDBERG, Anna Carla, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, SOGAYAR, Mari Cleide

Effect of Prolactin (PRL) and Laminin on Human Islet Primary Culture In: SBBq, 2003, Caxambú-MG.

**Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual.** , 2003. p.18 - 18

8. AITA, Carlos Alberto Mayora, Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, LABRIOLA, Letícia, KROGH, Karin, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, SILVA, Irenice Cairo da, MENDONÇA, Zizi de, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene L, FRANCO, Denise, NODA, Eduardo, CASTRO, Luis A de, GOLDBERG, Anna Carla, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, SOGAYAR, Mari Cleide

First Brazilian Islet Allograft Transplantation In A Type I DM Patient In: 9th Congress of the International Pancreas & Islet Transplant Association, 2003, Dublin-Ireland.

**Ginal Programme & Book of Abstracts.** , 2003. p.58 - 58

9. LABRIOLA, Letícia, AITA, Carlos Alberto Mayora, MONTOR, Wagner Ricardo, Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, KROGH, Karin, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene L, GOLDBERG, Anna Carla, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, SOGAYAR, Mari Cleide

Human Prolactin (hPRL) and Laminin (LN) Stimulate Proliferation and Secretory Function of Human Islet Primary Cultures In: COPEM, 2003, São Paulo.

**V Congresso Paulista de Endocrinologia & Metabologia.** , 2003. v.47. p.33 - 33

10. MARIA-ENGLER, Silvy Stuchi, KROGH, Karin, GIANELLA, Maria Lúcia Corrêa, Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, AITA, Carlos Alberto Mayora, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, CORRÊA, Tatiana C Silveira, SILVA, Irenice Cairo da, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene L, MORTARA, Renato A, VILELA, Luciano, MARESGUIA, Marcos, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, SOGAYAR, Mari Cleide

Insulin and Pluripotential Nestin-Positive Cells in Long-Term Human Pancreatic Islet Cultures In: SBBq, 2002, Caxambú-MG.

**Programa e Resumos da XXXI Reunião Anual.** , 2002. p.21 - 21

11. AITA, Carlos Alberto Mayora, Lojudice, F.H., KROGH, Karin, BENGTON, Mario Henrique, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, MARIA-ENGLER, Silvy Stuchi, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, SILVA, Irenice Cairo da, NORONHA, Irene L, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, SOGAYAR, Mari Cleide

Glucose Regulated Genes in Human Pancreatic Islets In: SBBq, 2001, Caxambú-MG.

**Programa e Resumos da XXX Reunião Anual.** , 2001. p.16 - 16

12. Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, ZANCHIN, Nilson I T, GOLDFARB, David, OLIVEIRA, Carla Columbano

Characterization of the function of the Saccharomyces cerevisiae exosome subunit RRP43 in mRNA degradation In: SBBq, 2000, Caxambú-MG.

**Programa e Resumos da XXIX Reunião Anual.** , 2000. p.48 - 48

### **Artigos em revistas (Magazine)**

1. AITA, Carlos Alberto Mayora, SOGAYAR, Mari Cleide, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, KROGH, Karin, LABRIOLA, Letícia, SILVA, Irenice Cairo da, SANTOS, Patricia Barros dos, GOLDBERG, Anna Carla, GENZINI, Tércio, NORONHA, Irene L, MIRANDA, Marcelo Perosa de, FRANCO, Denise, CASTRO, Luis A de, ANDREOLLI, Mario, NODA, Eduardo

TRANSPLANTE Alternativa atraente. Ciência Hoje. Brasil, v.35, p.34 - 40, 2004.

2. Lojudice, F.H., LOJUDICE, Fernando Henrique, MARIA-ENGLER, Silvy Stuchi, KROGH, Karin, GIANELLA, Maria Lúcia Corrêa, AITA, Carlos Alberto Mayora, OLIVEIRA, Elizabeth Maria da Costa, CORRÊA, Tatiana C Silveira, SILVA, Irenice Cairo da, GENZINI, Tércio, MIRANDA, Marcelo Perosa de, NORONHA, Irene L, MORTARA, Renato A, MARESGUIA, Marcos, ELIASCHEWITZ, Freddy Goldberg, SOGAYAR, Mari Cleide

Terapia Celular para Tratamento do Diabetes. Avanços em Biologia Celular. Brasil, p.143 - 146, 2002.