

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO
ENDÓCRINA PANCREÁTICA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO
TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

CURITIBA

2012

ALINE CALIL SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO
ENDÓCRINA PANCREÁTICA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO
TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita

CURITIBA

2012



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos dois dias do mês de abril de 2012, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação “ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA PANCREÁTICA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSE HUMANO” apresentada por **ALINE CALIL SILVA** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita PUCPR - Presidente	
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman PUCPR	
Prof. Dr. Fernando Henrique Lojudice da Silva USP	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita

Conceito: APROVADO

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman

Conceito: APROVADO

Prof. Dr. Fernando Henrique Lojudice da Silva

Conceito: Aprovado

Conceito Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

A toda equipe que tornou possível esse trabalho.

Aos meus pais por não pouparem esforços para eu poder alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Carlos Aita pela paciência e dedicação, pela seriedade e amizade.

A Ana Luiza pela importante participação na parte final do projeto, pela seriedade do seu trabalho e companheirismo.

As parceiras de laboratório Carla, Thatiana, Patricia, Ire, Elaine pelo apoio e amizade.

Ao professor Dr. Paulo Brofman e toda a sua equipe pelo apoio, conselhos e inúmeros favores imprescindíveis para conclusão deste trabalho.

A Carmen por sempre se lembrar do meu projeto, sem o seu apoio o caminho seria ainda mais difícil.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao IBMP por abrir suas portas sempre que precisamos.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho. O caminho não foi fácil e sem ajuda mútua dos pesquisadores seria impossível.

APOIO FINANCEIRO

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

“Melhor que tudo é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e a força podem faltar, mas aquilo que você coloca na sua mente, será para sempre seu.”

Louis L´Amour

RESUMO

Introdução: A busca de uma fonte renovável e de fácil obtenção de células com capacidade de produção e secreção de insulina de modo regulado, para reposição das células β perdidas no Diabetes Mellito tipo 1 (DM1), é um tema de enorme interesse e uma alternativa promissora para o tratamento desta doença. Para tanto, as células-tronco mesenquimais (CTM) do tecido adiposo humano surgem como uma fonte capaz de diferenciar-se em alguns tipos de tecidos e apresentam uma vantagem em relação às células-tronco embrionárias ou adultas da medula óssea, devido a sua facilidade de obtenção como produto residual de lipoaspiração.

Objetivo: Cultivar, expandir e diferenciar CTM do tecido adiposo humano em células endócrinas pancreáticas. **Métodos:** As CTM foram obtidas do tecido adiposo humano por digestão com solução de colagenase, caracterizadas por citoquímica e citometria de fluxo, e expandidas *in vitro*. A diferenciação das CTM foi realizada em meio contendo baixa concentração de glicose (5,5 mM), nicotinamida, exendina-4 e β -mercaptoetanol durante um período de até 4 meses. A expressão dos hormônios insulina e glucagon foi avaliada por imunofluorescência indireta. **Resultados:** As células isoladas e mantidas em cultivo aderente foram positivas para os marcadores CD105, CD166, CD29, CD90, CD73 e CD44, negativas para CD31, CD45, CD34 e CD14, e diferenciaram-se em adipócitos e osteócitos, demonstrando se tratar de CTM. Por imunofluorescência indireta detectou-se a expressão de insulina nas CTM diferenciadas, porém não se observou a expressão de glucagon. **Conclusão:** O processo de diferenciação empregado foi capaz de induzir a expressão de insulina pelas CTM, sugerindo uma potencial aplicação destas células em protocolos de terapia celular. Entretanto, é necessária a utilização de novas técnicas para confirmação da expressão deste hormônio.

Descritores: Diabetes Mellitus Tipo 1, Insulina, Células-Tronco Mesenquimais, Tecido adiposo humano.

ABSTRACT

Introduction: The search for a renewable source of cells with insulin-producing capacity to replace β cells destroyed by the autoimmune process in Type 1 Diabetes Mellitus, is a very interesting subject and a promising therapeutic alternative for this disease. Mesenchymal stem cells (MSC) from human adipose tissue have a great potential for use in cell therapy due to its ease of isolation, expansion and differentiation, besides relative acceptance of the ethical point of view. They also have an advantage in relation to the embryonic or to the adult bone marrow MSC, because they are easier to get as it is the waste product of liposuction. **Objective:** Isolate and promote *in vitro* expansion and differentiation of MSC from human adipose tissue into a pancreatic endocrine phenotype. **Methods:** MSC were obtained from human adipose tissue through collagenase digestion, characterized by cytochemistry and FACS, and *in vitro* expanded. MSC differentiation into a pancreatic endocrine phenotype was induced with low glucose (5,5 mM) media containing nicotinamide, exendin-4 and 2-mercaptoethanol, during a period of 4 months culture. Insulin and glucagon expression was analyzed by immunofluorescence. **Results:** Human adipose tissue MSC were isolated and maintained in adherent cultures *in vitro*. As demonstrated by FACS, they were CD105, CD166, CD29, CD90, CD73 and CD44 positive, CD31, CD45, CD34 and CD14 negative. These cells were also able to differentiate into adipocyte and osteocyte lineages, confirming their MSC origin. Insulin expression by differentiated cells were demonstrated by immunofluorescence, although glucagon was not expressed. **Conclusion:** The differentiation protocol employed in this work induced the expression of insulin by MSC, suggesting its potential application in cell therapy protocols. However, analysis by other techniques are necessary to confirm the expression of this hormone.

Key words: Diabetes Mellitus Type 1, Insulin, Mesenchymal Stem Cells, Adipose tissue.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
1. INTRODUÇÃO	01
2. LITERATURA	05
2.1. DIABETES MELITO	06
2.1.1. Diabetes Melito Tipo 1	06
2.1.2. Tratamento do DM1	07
2.1.3. Terapia celular no DM1	08
2.2. ORGANOGÊNESE DO PÂNCREAS ENDÓCRINO	10
2.2.1. Organogênese do pâncreas	10
2.2.2. Controle transcricional do desenvolvimento pancreático	12
2.3. CÉLULAS-TRONCO	13
3.3.1. Células-tronco	13
3.3.2. Células-Tronco Mesenquimais	15
2.3.3. Células-Tronco Mesenquimais do tecido adiposo humano	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GERAL	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. TECIDO ADIPOSEO	21
4.2. ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CTM DO TECIDO ADIPOSEO	21
4.3. ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO EM LINHAGENS MESENQUIMAIS	23
4.4. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	24
4.5. DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA DAS CTM	25
4.6. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	27
5. RESULTADOS	29
5.1. ISOLAMENTO E CULTIVO DE CTM DO TECIDO ADIPOSEO	30
5.2. ANÁLISE DE DIFERENCIAÇÃO PARA LINHAGENS MESENQUIMAIS	30
5.3. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	32
5.4. DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA PANCREÁTICA DAS CTM	35
5.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	36

6.	DISCUSSÃO	38
7.	CONCLUSÕES	45
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9.	ANEXO	57

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina de soro bovino

CPI – Células produtoras de insulina

CT – Célula-tronco

CTA – Células-tronco adultas

CTE – Células-tronco embrionárias

CTH – Célula-tronco hematopoiética

CTM – Célula-tronco mesenquimal

DAPI – 4',6-diamino-2 fenilindol

DM – Diabetes Melito

DM1 – Diabetes Melito tipo 1

DM2 – Diabetes Melito tipo 2

DMEM – Meio Dulbecco Modificado por Eagle

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

GLP1 - Glucagon-like peptide-1

H-DMEM – Alta glicose- Meio Dulbecco Modificado por Eagle

HE – Hematoxilina - Eosina

HEPES – ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico

IDF - Federação Internacional de Diabetes

iPSCs - Células-tronco Pluripotentes induzidas

L-DMEM – Baixa glicose- Meio Dulbecco Modificado por Eagle

PARP - Poli ADP-ribose polimerase

PBS – Tampão fosfato salina

PDX-1 – Pancreatic and duodenal homeobox gene 1

PFA – Paraformaldeído

RT-PCR - Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase

SFB – Soro Fetal Bovino

TA – Temperatura Ambiente

TR – Texas Red

xg – Força centrífuga relativa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama do desenvolvimento embrionário do pâncreas de camundongo	11
Figura 2 - Etapas do isolamento de CTM do tecido adiposo humano	22
Figura 3 - Etapas do processo de diferenciação de CTM para células endócrinas pancreáticas	26
Figura 4 - CT do tecido adiposo humano em cultivo	30
Figura 5 - Diferenciação osteogênica de CTM do tecido adiposo humano	31
Figura 6 - Diferenciação adipogênica de CTM do tecido adiposo humano	32
Figura 7 - Imunofenotipagem de CTM do tecido adiposo humano	33
Figura 8 - Diferentes estágios de cultivo e diferenciação das CTM do tecido adiposo humano	35
Figura 9 - Imunofluorescência indireta para insulina em CTM diferenciadas do tecido adiposo	36
Figura 10 - Imunofluorescência indireta para glucagon em CTM diferenciadas do tecido adiposo	37

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, no mundo há cerca de 180 milhões de pessoas portadoras de Diabetes Melito (DM). No Brasil, segundo estimativas de 1996, o DM atingia aproximadamente 5,5 milhões de pessoas. A enfermidade apresenta incidência crescente e é responsável por 15% dos investimentos nacionais em saúde. Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), o DM tipo 1 cresce cerca de 3% ao ano em crianças na fase pré-escolar. Já o DM tipo 2, tem uma prevalência 10 vezes maior e está em constante crescimento a taxas alarmantes em crianças e adolescentes, como consequência da epidemia mundial de sedentarismo, da obesidade e de maus hábitos de consumo alimentar.

Embora o DM tipo 1 corresponda a apenas entre 5% a 10% de todos os casos da síndrome de DM, esta é uma doença muito complexa, com risco de vida, que está associada a várias outras doenças crônicas não transmissíveis como hipertensão arterial, doença coronariana e cerebrovascular, dislipidemias, retinopatia diabética, neuropatias periféricas e autonômica, lesões renais, levando até a insuficiência renal crônica terminal. A sobrevida tem aumentado significativamente, o que favorece o surgimento das complicações crônicas, com custos econômicos e sociais elevados.

No caso do DM tipo 1, a destruição das células β das ilhotas pancreáticas desencadeia uma redução absoluta da massa destas células. O DM tipo 1 ocorre quando o sistema imunológico do indivíduo ataca e destrói as células β do pâncreas que produzem insulina, o hormônio necessário para regular os níveis de glicose no sangue. Em geral, quando pacientes são diagnosticados com a doença, entre 60% e 80% de suas células β já foram destruídas.

Ainda que os resultados obtidos nos últimos anos tenham estabelecido com certeza que o controle metabólico adequado no DM tipo 1 (com injeções múltiplas de insulina) permite retardar e até mesmo interromper o desenvolvimento das complicações crônicas do diabetes, a maioria dos pacientes não atinge o grau de controle necessário para evitar estas complicações crônicas. Além disso, o tratamento impõe elevadas demandas ao paciente, tem riscos importantes como a hipoglicemia grave, e reduz a qualidade de vida. As limitações do tratamento atual têm estimulado a busca de terapêuticas que permitam restaurar ou evitar a perda da massa de células β . Para conseguir este objetivo, pode-se utilizar diferentes

estratégias, como estimular a renovação das células β *in situ* ou repor a massa de tecido endócrino. Atualmente, o transplante de pâncreas é o único tratamento que consegue restaurar a normoglicemia a longo prazo, mas pode ser oferecido só a um número limitado de pacientes, e apresenta uma morbidade significativa. Como alternativa, o transplante celular, seja de ilhotas ou de células produtoras de insulina (CPI) oferece numerosas vantagens potenciais que fazem esta terapia particularmente atrativa.

Na atualidade, contemplam-se distintas possibilidades de obtenção de CPI, entre as quais estão ilhotas humanas de doador cadáver, expansão *in vitro* das ilhotas, CPI geradas por bioengenharia e as células-tronco (CT), que podem ser embrionárias ou adultas, pancreáticas ou extra-pancreáticas. De todas elas, o transplante de ilhotas é a única que tem aplicação clínica atualmente. O transplante celular oferece vantagens comprovadas como o baixo risco do procedimento por ser minimamente invasivo e uma intervenção quase ambulatorial, o que permite a realização de múltiplos transplantes. O transplante celular pretende evitar a necessidade do tratamento imunossupressor, investigando estratégias baseadas no uso de métodos para separar fisicamente as ilhotas do sistema imunológico (encapsulamento) ou na modificação das características imunogênicas do enxerto. Ao minimizar o risco associado ao tratamento imunossupressor, seria clinicamente e eticamente aceitável realizar o transplante nas fases iniciais da doença para restaurar a normoglicemia desde o diagnóstico da DM tipo 1 e muito antes do aparecimento das complicações crônicas.

Atualmente, existe uma enorme demanda que é impossível satisfazer. Considerando que parte da doação dos pâncreas estará destinada ao transplante do órgão inteiro, o baixo rendimento do processo de isolamento diminui a disponibilidade enormemente. Somado a isso, a desproporção é ainda mais grave se considerarmos que, nas condições atuais, são necessários vários pâncreas para conseguir a quantidade suficiente para transplantar a um único paciente. Por esta razão, se faz imprescindível dispor de fontes alternativas de CPI.

Este enfrenta um duplo desafio, a geração de uma massa suficiente de células produzindo quantidades adequadas de insulina e liberando-a em resposta aos sinais fisiológicos, e protegendo-as da recorrência da auto-imunidade. Além de

tudo, para ser clinicamente útil, a terapia celular tem que representar uma vantagem significativa e ser mais eficaz que o tratamento de administração de insulina exógena.

A diferenciação celular para obter CPI a partir de CT como substituto biológico para restaurar a massa de células β perdida no DM tipo 1 implica aprofundar o conhecimento dos seus mecanismos moleculares e, inclusive, na interação entre as distintas populações que compõem as ilhotas pancreáticas. A viabilidade desta estratégia depende principalmente de três requisitos: a disponibilidade de células pluripotenciais com capacidade de auto-replicação e de gerar células diferenciadas; a caracterização dos sinais proliferativos que permitam expandir estes progenitores; e a identificação dos sinais que induzam a diferenciação destas células pluripotenciais em células funcionais que secretem insulina de maneira regulada em resposta às variações da glicemia.

2. LITERATURA

2.1. DIABETES MELITO

O DM é uma síndrome crônica que compreende um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por hiperglicemia e intolerância à glicose; com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, conseqüente a uma produção e/ou ação deficiente da insulina pelo organismo. A hiperglicemia manifesta-se por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva, ou por complicações agudas que podem levar a risco de vida: a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica(1).

O DM é um grave problema de saúde tanto pela prevalência quanto pelas graves complicações crônicas que desenvolvem nos pacientes. A previsão para os próximos anos são pessimistas, já que segundo a Organização Mundial de Saúde, no ano de 2000 o número estimado de pacientes diabéticos no mundo era de 171 milhões de habitantes, com projeções de aumentar a 366 milhões no ano 2030. No Brasil foram diagnosticados, no ano de 2000, cinco milhões de pacientes diabéticos, mas este número poderá triplicar até o ano de 2030. Aproximadamente 5% das causas de mortes a cada ano a nível mundial são atribuídas ao DM(2). A classificação do DM pode ser dividida em quatro grupos segundo o “*The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*”: a) DM do tipo 1; b) DM do tipo 2; c) Outros tipos específicos de Diabetes, incluindo Diabetes secundário ou associado a outras patologias e d) DM gestacional(3).

2.1.1. Diabetes Melito Tipo 1

O Diabetes Melito tipo 1 (DM1), também conhecido como Diabetes insulino-dependente ou Diabetes juvenil, é uma doença crônica que acomete entre 5 -10% dos diabéticos e caracteriza-se pela falta de produção de insulina como conseqüência da destruição das células β das ilhotas pancreáticas, resultando em hiperglicemia persistente. Tem uma prevalência estimada de 0,2% na população mundial e tem manifestação inicial geralmente entre os 10 e 15 anos de idade.

Apesar de a etiologia ser pouco documentada, vários estudos mostram que uma predisposição genética em conjunto com fatores ambientais desencadeiam, na maioria destes pacientes, um processo auto-imune contra as células β , resultando na sua destruição(4, 5).

Várias tentativas estão sendo feitas para promover o diagnóstico precoce e orientar sobre formas de tratamento adequado, o que ajuda na redução de complicações crônicas da doença. A importância do diagnóstico precoce é fundamental para reduzir as complicações crônicas e para salvar vidas.

2.1.2. Tratamento do DM1

O tratamento convencional do DM1 baseia-se na reposição de insulina, geralmente realizada por meio de injeções subcutâneas. Os protocolos mais modernos vêm introduzindo esquemas intensivos de reposição seja através de múltiplas aplicações diárias ou através de bombas de infusão contínua de insulina via subcutânea, com o objetivo de melhorar o controle glicêmico dos pacientes. Mesmo assim, como este tipo de terapia não consegue reproduzir fielmente o padrão fisiológico de secreção de insulina do pâncreas, os pacientes ficam expostos a descompensações metabólicas agudas como a hipoglicemia, com risco vital, e também até complicações crônicas graves como a nefropatia, retinopatia e neuropatia, entre outras(6, 7). Portanto, terapêuticas alternativas à insulinoterapia que se mostrem mais eficientes para a regulação normal da glicemia são de extrema importância.

Dentre as alternativas terapêuticas à insulinoterapia disponíveis atualmente, somente o transplante de pâncreas (órgão total) e o de ilhotas pancreáticas possibilitam a reconstituição do padrão fisiológico de secreção de insulina e do controle glicêmico(8).

Transplantes de pâncreas alogênicos vêm sendo realizados freqüentemente, na maioria das vezes associado ao transplante renal. O maior inconveniente desta técnica, além da necessidade de utilização de imunossupressores, é o fato de

envolver um procedimento cirúrgico extenso. É uma cirurgia de grande porte, não isenta de complicações potencialmente sérias(8).

2.1.3. Terapia celular no DM1

Como uma alternativa para o tratamento de casos selecionados de DM1, o transplante de ilhotas isoladas de doadores cadavéricos vem se firmando, graças aos resultados do estudo de Shapiro *et al* (2000)(9). Este estudo, que ficou conhecido como “Protocolo de Edmonton”, entre outras alterações aos protocolos anteriores, visava uma melhoria na qualidade e quantidade das ilhotas a serem implantadas, assim como um regime imunossupressor sem a presença de corticóides, reconhecidamente diabetogênicos(10).

A principal vantagem do transplante de ilhotas consiste no fato de envolver um procedimento cirúrgico pouco invasivo e bastante seguro, que praticamente não apresenta riscos, pois somente o tecido endócrino (que corresponde a aproximadamente 1-2% do pâncreas) é infundido na veia porta, via cateter, e as ilhotas são alojadas no fígado(11).

Entretanto, pelo fato de necessitar de terapia imunossupressora para evitar a rejeição do enxerto, as indicações atuais do transplante de ilhotas (e também do transplante de pâncreas) limitam-se a pacientes com DM1 que apresentam controle metabólico extremamente difícil, com episódios freqüentes de hipoglicemias assintomáticas graves, ou que necessitem de um transplante renal conjunto para tratamento de insuficiência renal crônica decorrente do diabetes. Devido aos riscos associados à imunossupressão, é importante que a seleção dos candidatos e o seguimento pós-transplante sejam realizados de maneira rigorosa, garantindo que sejam submetidos ao procedimento somente àqueles pacientes com maiores probabilidades de se beneficiarem com o transplante(12).

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 ainda são necessários de 2 a 3 isolamentos/transplantes por paciente.

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 haveria um equilíbrio entre o número de órgãos disponíveis e o de pacientes candidatos ao transplante. O número de doadores de pâncreas para transplante de ilhotas permaneceria aquém do necessário para o tratamento de milhões de indivíduos portadores de diabetes insulino-dependente(10).

Por isto, é de grande interesse a identificação de novas fontes renováveis de células para a geração de enxertos tanto morfológica como funcionalmente semelhantes às ilhotas, além de uma melhora na habilidade de induzir a proliferação das células *in vitro* e a sua permanência *in vivo*. Várias tentativas estão sendo feitas neste sentido. Dentre estas pode-se mencionar a expansão de células β *ex vivo*, pois existem evidências do dinamismo da massa de células β para compensar aumentos de demanda de insulina frente a certas condições fisiológicas e patológicas(13). Esta expansão *ex vivo* consiste em que as células β de cultivos de ilhotas pancreáticas podem proliferar até atingir uma massa adequada para o transplante.

Outra alternativa consiste na diferenciação celular a partir de diferentes progenitores, como células embrionárias (CE) e CT progenitoras pancreáticas e não-pancreáticas. Na diferenciação de CT adultas, o seu potencial é mais limitado que o das CE, o que representa uma vantagem em termos de segurança em relação a um menor risco de proliferação descontrolada. Particularmente, para a terapia de substituição das células β se requer que estas exibam algumas propriedades funcionais, como a expressão do gene da insulina, sua modificação e processamento pós-transcricional, a produção e liberação da insulina em resposta à glicose dentro dos limites fisiológicos, e uma fonte disponível ou com capacidade replicativa *in vitro*(14).

O conhecimento dos fatores e dos mecanismos de sinalização implicados no processo de diferenciação pancreática pode ser útil para o desenho de protocolos de geração de CPI a partir de fontes celulares renováveis como as CT.

2.2. ORGANOGÊNESE DO PÂNCREAS ENDÓCRINO

2.2.1. Organogênese do pâncreas

As três linhagens celulares (exócrina, endócrina e dutal) que formam o pâncreas adulto procedem de um grupo comum de células precursoras de origem endodérmica. A formação do pâncreas começa numa fase precoce durante o desenvolvimento embrionário. Em camundongos, o pâncreas inicialmente surge no dia embrionário 9.5 (e9.5) como dois brotos desde os sítios ventral e dorsal do tubo anterior e médio do intestino primitivo a partir do endoderme, e que vai dar lugar ao duodeno. Neste estágio, as células α aparecem como as primeiras células diferenciadas enquanto as células β aparecem em seguida. Indo ao dia 10.5 começa o crescimento e ramificação do epitélio dos dois primórdios pancreáticos. Conforme o intestino vai rodando, o broto ventral gira junto e começa a se fundir ao broto dorsal, dando origem a um órgão bipolar (Fig. 1)(15).

As células endócrinas continuam se formando como estruturas tipo ductos até o e14, quando começa a formação de ácinos e a diferenciação das células exócrinas. Ao mesmo tempo, há uma elevação dramática no nível de insulina e no número de células β a partir de precursores (neogênese), e pela primeira vez se observam células bastante diferenciadas com grânulos de insulina detectáveis. Estas mudanças na célula β são denominadas de “transição secundária”(15).

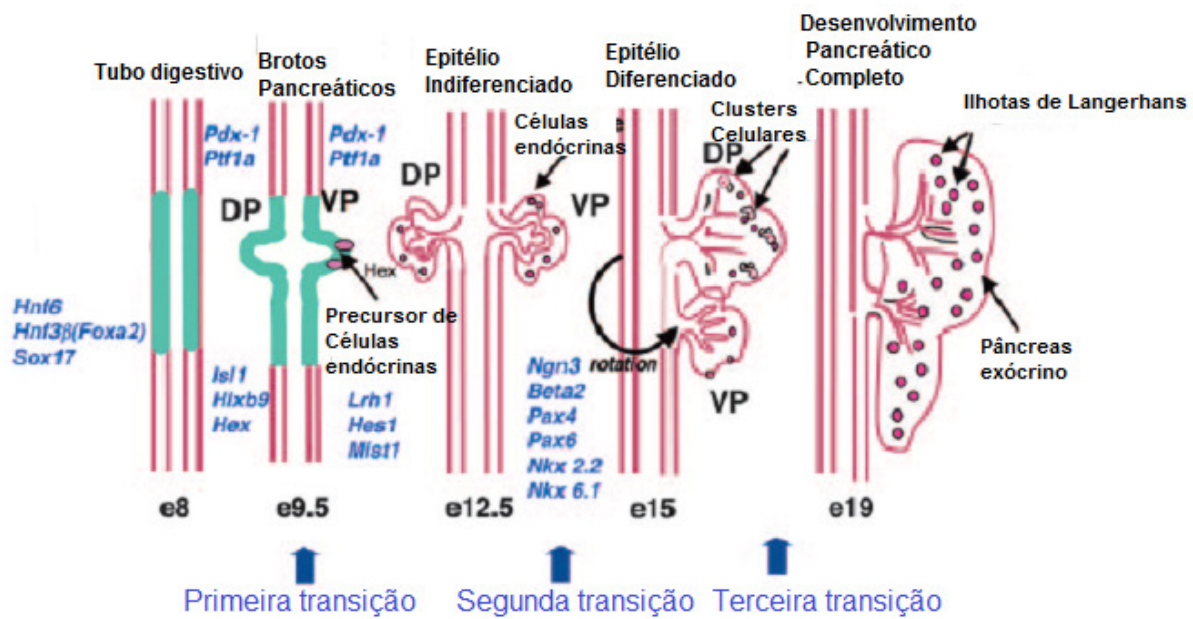


Fig. 1 - Diagrama do desenvolvimento embrionário do pâncreas de camundongo.

Adaptado de Habener *et al* (2005)(15).

No 16º dia, as células endócrinas começam a formar grupos, mas as ilhotas não estão plenamente formadas até pouco antes do nascimento (e18-e19). A maturação final da ilhota acontece durante as primeiras semanas depois do nascimento. O pâncreas exócrino começa a diferenciar-se a partir do dia e14.5 e no dia e15.5 os ácinos são claramente distinguíveis dos ductos. Sabe-se muito pouco sobre a diferenciação das células ductais, com exceção de que a maioria dos precursores ductais se distinguem dos progenitores das linhagens endócrina/exócrina antes do e12.5(15).

Em humanos, os primórdios pancreáticos são evidentes na quarta semana da gestação e a sua fusão se produz no final da sexta semana. Na décima semana observa-se células endócrinas positivas para os quatro hormônios insulares(15).

Existem poucos estudos moleculares sobre a organogênese pancreática em humanos, e os modelos vigentes baseiam-se principalmente em informação obtida em ratos e camundongos.

2.2.2. Controle transcricional do desenvolvimento pancreático

A expansão e diferenciação dos precursores endodérmicos para as diferentes linhagens pancreáticas são o resultado de uma sequência altamente regulada de sinais extracelulares e mudanças nos programas de expressão gênica. Estas mudanças são dirigidas por cascatas de fatores de transcrição cujas ativações-inativações permitem a progressão da diferenciação. A identificação destes fatores é indispensável para compreender os processos que culminam na formação das ilhotas. Muitos dos fatores enumerados atuam em mais de uma etapa do desenvolvimento e com diferentes funções de cada vez. Por exemplo, fatores reguladores do gene da insulina como PDX-1 ou NeuroD1/BETA2 são chave para o desenvolvimento endócrino e pancreático(16).

A informação obtida mediante técnicas de biologia molecular e em modelos genéticos em roedores tem permitido elaborar uma sequência de fatores de transcrição. Porém, trata-se de um modelo ainda incompleto e possivelmente muito mais simples do que acontece na realidade. Como era de esperar, a presença e ausência destes fatores determinam muitos fenômenos que conduzem à progressão do desenvolvimento. Os primeiros fatores expressos na endoderme pré-pancreático antes da formação dos primórdios são PDX-1 e Hb9. Na ausência de Hb9 não se forma o primórdio dorsal, apenas o ventral. Na ausência de PDX-1 se inicia a formação de ambos os primórdios, mas seu crescimento e morfogênese ficam interrompidos nas primeiras etapas do desenvolvimento, tanto em roedores quanto em humanos. A importância de PDX-1 no desenvolvimento pancreático tem sido confirmada em estudos recentes onde se demonstra que todas as células pancreáticas derivam de células positivas para PDX-1. A expressão de PDX-1 e Hb9 cai após o e10.5 mas volta a reaparecer nas células β já diferenciadas(17).

A especificação da linhagem endócrina em precursores pré-pancreáticos é determinada pela expressão de fatores de transcrição pró-endócrinos. Neurogenina3 (Ngn3) é o fator pró-endócrino chave no pâncreas. Camundongos mutantes para o gene Ngn3 não possuem células endócrinas no pâncreas e morrem pouco após o nascimento. Ngn3 atua como interruptor da cascata transcricional. A sua expressão

é transitória e depois de alcançar um ponto máximo aproximadamente no e15.5, cai a níveis indetectáveis no pâncreas do neonato. Os fatores ativados direta ou indiretamente por Ngn3 devem continuar e finalizar o processo de diferenciação endócrina iniciado por Ngn3(18, 19). Um destes fatores diretos é NeuroD1/BETA2, o qual compartilha com o seu ativador a capacidade de promover o destino endócrino. Outros fatores de relevância regulados diretamente por Ngn3 são Pax4, Nkx2.2 e IA-1(20). O modelo vigente estabelece que a ação conjunta dos distintos fatores de transcrição que funcionam antes ou em paralelo com Ngn3, são os responsáveis na determinação da linhagem endócrina específica (α , β , δ e PP). Assim, Pax4 e Arx são necessários para a especificação das linhagens β e α , respectivamente. A ausência simultânea destes dois fatores resulta na perda total destas células e no aumento das células δ . Também os fatores Nkx2.2 e Nkx6.1 tem um papel relevante na determinação da linhagem β . Animais mutantes para Nkx2.2 não tem células positivas para insulina, mas tem células endócrinas com outros marcadores de célula β e expressam o hormônio grelina. A ausência de Nkx6.1 impede a neogênese das células β durante a transição secundária(21).

2.3. CÉLULAS-TRONCO

2.3.1. Células-tronco

As CT possuem capacidade única de auto-renovação e originar tipos celulares especializados. Elas são encontradas em vários tecidos do corpo e funcionam como reservas. Toda vez que um órgão ou tecido sofre uma lesão, os sinais gerados induzem parte destes progenitores latentes para se desenvolver em uma célula especializada, cumprindo papel na manutenção, reparo e reconstituição de tecidos. De um modo geral podemos classificá-las em dois tipos: as células-tronco embrionárias (CTE) e as células-tronco adultas (CTA)(22).

As CT podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes. As totipotentes podem originar um novo organismo completo, como

por exemplo o zigoto. As pluripotentes podem originar células da ectoderme, endoderme e mesoderme como por exemplo as CTE. As multipotentes podem gerar células de um único folheto germinativo como as CTM. As unipotentes ou progenitoras podem originar um único tipo celular que mantêm a capacidade de auto-replicação como as CTA residentes em órgãos(23).

O zigoto fertilizado constitui a primeira célula-tronco totipotente, ou seja, uma célula com capacidade de formar qualquer célula existente no ser completamente formado e desenvolvido. Essa célula-tronco inicial se divide em duas, que se dividem em quatro, que se dividem em oito e assim sucessivamente até formar um conjunto de células que constitui o blastocisto. As células dos blastocistos são as células-tronco embrionárias pluripotentes. Uma célula-tronco pluripotente, tem a capacidade de desenvolver-se em qualquer tipo celular necessário ao desenvolvimento do feto(22).

As CT adultas são encontradas em diversos tecidos, como a medula óssea, sangue, fígado, cordão umbilical, placenta, e outros. Estudos recentes mostram que estas células têm limitação na sua capacidade de diferenciação, quando comparadas com as embrionárias. Estas se enquadram na classificação das CT multipotentes, que são capazes de se diferenciar em apenas alguns tipos de tecidos.

As CT são candidatas ideais na medicina regenerativa porque são as únicas populações celulares precursoras, não-especializadas, com habilidade de se expandir por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, mas podendo diferenciar-se em células especializadas de um tecido particular em resposta a sinais apropriados(24).

Estudos têm demonstrado a possibilidade de gerar CPI a partir de precursores de várias fontes incluindo pâncreas(25-27), fígado(28-30), epitélio intestinal(31), como também de CTE murinas e de origem humana(32-35).

Recentemente tem sido observado que as CTM são capazes de suprimir a resposta do sistema imune pela inibição da maturação das células dendríticas e inibir a ação dos linfócitos T, linfócitos B e células NK (*natural killer*)(36).

No ano de 2007 um grande avanço nas pesquisas envolvendo CT foi alcançado pela geração das células-tronco pluripotentes induzidas, as denominadas iPSCs. Pesquisadores conseguiram reprogramar uma célula adulta humana (fibroblastos da pele) por meio da inserção e expressão de quatro fatores de transcrição: Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc, utilizando vetores retrovirais. As células tornaram-se então pluripotentes podendo ser cultivadas *in vitro*, sendo muito semelhantes às CTE quanto à morfologia, expressão de marcadores de superfície, perfil de expressão gênica e potencial de diferenciação *in vitro* e *in vivo* para diversos tipos celulares. Em experimentos envolvendo transplante de iPSCs, estas células foram capazes de originar células provenientes dos três folhetos germinativos, evidenciando a sua pluripotencialidade(23).

Apesar dos avanços destas descobertas, ainda persistem limitações como a dificuldade de obtenção, rejeição do enxerto, diferenciação de apenas uma porcentagem pequena da população em cultura, e secreção insuficiente de insulina frente ao estímulo da glicose.

2.3.2. Células-Tronco Mesenquimais

As principais fontes de CT adultas são a medula óssea, o sangue periférico, o sangue do cordão umbilical e órgãos e tecidos de indivíduos adultos. Na medula óssea, residem ao menos dois tipos de CT. Dentre elas, a chamada célula-tronco hematopoiética (CTH), responsável pela geração de todos os tipos celulares de tecidos hematopoiéticos(37). No estroma, existe um conjunto de células não-hematopoiéticas referidas como células progenitoras mesenquimais ou célula-tronco mesenquimal (CTM), que podem ser expandidas *ex vivo* e induzidas a diferenciar se tanto *in vivo* quanto *in vitro* em pelo menos sete tipos celulares: osteócitos, condrócitos, adipócitos, tenócitos, miotubos, astrócitos e células estromais de suporte(38-41). CTM com características biológicas similares aquelas derivadas da medula óssea têm sido isoladas de vários outros órgãos e tecidos como sangue periférico(42), sangue de cordão umbilical(43) e membranas sinoviais(44), o que

sugere a existência de uma extensa rede de CTM no organismo, que é abastecida quando necessário.

Os cultivos de CTM da medula óssea contêm uma população homogênea de células similares a fibroblastos, que formam colônias, duplicam-se em um período de 33 horas e exibem um grande potencial de expansão que varia com as condições de cultivo(38). O fenótipo antigênico das CTM não é único, compartilhando características de células mesenquimais, endoteliais, epiteliais e musculares (38, 45, 46). Elas são negativas para marcadores de linhagens hematopoiéticas e endoteliais como CD34, CD45, CD14, CD31, CD133, e são positivas para CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166(47, 48).

As CTM têm grande potencial para ser empregado em terapias celulares, visto sua facilidade de obtenção, expansão e diferenciação, além de relativa aceitação do ponto de vista ético(24, 49-52).

Quando as CTM são cultivadas *in vitro* em condições definidas, elas podem se diferenciar em células com capacidade de produzir insulina; este fato sugere que a medula óssea contém CT capazes de serem programadas em CPI. Alguns dos protocolos de diferenciação de CTM conseguem síntese *de novo* em resposta ao estímulo de glicose e até o restabelecimento da glicemia por implantação destas células em animais diabéticos, mas os níveis de insulina secretados pelas células diferenciadas estão abaixo dos níveis fisiológicos, quando comparados com a secreção de ilhotas isoladas(53-56).

O conhecimento dos fatores de transcrição, que são chaves nas principais vias do desenvolvimento das células β , é fundamental para gerar estratégias de diferenciação. Muitas pesquisas têm estabelecido hormônios e fatores responsáveis pelo desenvolvimento embrionário do pâncreas, que ajudarão a esclarecer as maneiras de controlar a proliferação e diferenciação.

2.3.3. Células-Tronco Mesenquimais do tecido adiposo humano

O tecido adiposo pode representar uma fonte alternativa de CTM para terapia celular. Originalmente identificada como fonte de células osteoprogenitoras, CTM diferenciam-se em adipócito, condrócito, osteoblasto e mioblasto *in vitro*, tornando essas células candidatas promissoras para o reparo de defeitos mesodérmicos e suas doenças. Dificuldades para obter CTM de outros tecidos como, por exemplo, a medula óssea, conduziu novas pesquisas em busca de diferentes fontes de CTM.

O tecido adiposo, assim como a medula óssea, é derivado do mesênquima e possui um estroma que pode ser facilmente isolado. Baseado nisto, o tecido adiposo pode representar uma fonte de células-tronco com efeitos abrangentes em diversos aspectos(57).

Nos últimos anos a medula óssea ainda permanece como a principal fonte de CT. Contudo, comparado com a medula óssea, o tecido adiposo pode ser obtido em maior volume, com menos riscos, menos doloroso, e facilmente obtido como resíduos de lipoaspiração. Ainda mais, na medula óssea as CTM são escassas, e essa quantidade diminui com a idade. O número de CTM na medula óssea em relação ao total de células nucleadas é de $1:10^4$, $1:10^5$ e $1:10^6$ em recém-natos, adolescentes e indivíduos adultos, respectivamente. Em aspirados de medula óssea humana a frequência é de $1-20:10^5$. Além disso, o número de CTM obtidas por grama de tecido adiposo é superior a obtida com a mesma quantidade de medula óssea (5.000 vs 100-1.000). Por este motivo, o tecido adiposo tem potencial para ser a fonte de escolha de CTM para uso clínico no futuro(58).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Isolar as células-tronco mesenquimais (CTM) do tecido adiposo humano e induzir sua diferenciação endócrina pancreática.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar CTM do tecido adiposo humano;
- Expandir as CTM do tecido adiposo humano;
- Caracterizar as CTM pela imunofenotipagem por citometria de fluxo e pela sua capacidade de diferenciação em osteócito e adipócito;
- Induzir a diferenciação endócrina das CTM;
- Analisar a expressão de marcadores de diferenciação endócrina através da imunofluorescência indireta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo para extração das células-tronco foi obtido de pacientes submetidos a dermolipectomia abdominal. A utilização do material para o estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, conforme o parecer 1437/08. Antes da cirurgia os pacientes (doadores do tecido adiposo) receberam um termo de consentimento informado, autorizando o uso do seu material biológico na pesquisa.

Através da cirurgia bariátrica associado a dermolipectomia abdominal, eram retirados cerca de 500 g do tecido adiposo em cada procedimento, o qual era coletado e armazenados em recipiente estéril pelo cirurgião, e imediatamente encaminhado para o laboratório. Pacientes doadores do tecido não foram separados por grupo de idade ou sexo.

4.2. ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CTM DO TECIDO ADIPOSEO

Os isolamentos foram realizados com tecido proveniente de 5 pacientes. O tecido foi lavado com PBS até a completa retirada do sangue em volta do tecido. Com o auxílio de pinça e bisturi, a parte interna do tecido foi retirada e separada em uma placa contendo PBS (Fig. 2 A). A digestão enzimática foi realizada utilizando-se colagenase do tipo I na concentração de 1mg/mL (Fig. 2 B), com agitação constante por 30 minutos a 37 °C. As células foram lavadas e ressuspensas inicialmente com tampão hemolítico e, logo após, lavadas com PBS (Fig. 2 C) e ressuspensas em meio de cultura DMEM/F-12 com 10% SFB e 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina. As células foram cultivadas na densidade de 1×10^5 células/cm², em placas para cultivo aderente (Fig. 2 D), em estufa a 37 °C contendo 5% CO₂. O meio de cultivo foi trocado dois dias após o plaqueamento inicial e, posteriormente, duas vezes por semana. Ao atingir aproximadamente 80% de confluência, os cultivos eram repicados para novas garrafas, numa proporção de 1/3. Nos

experimentos de diferenciação, foram utilizadas células de cultivos até a 5ª passagem.

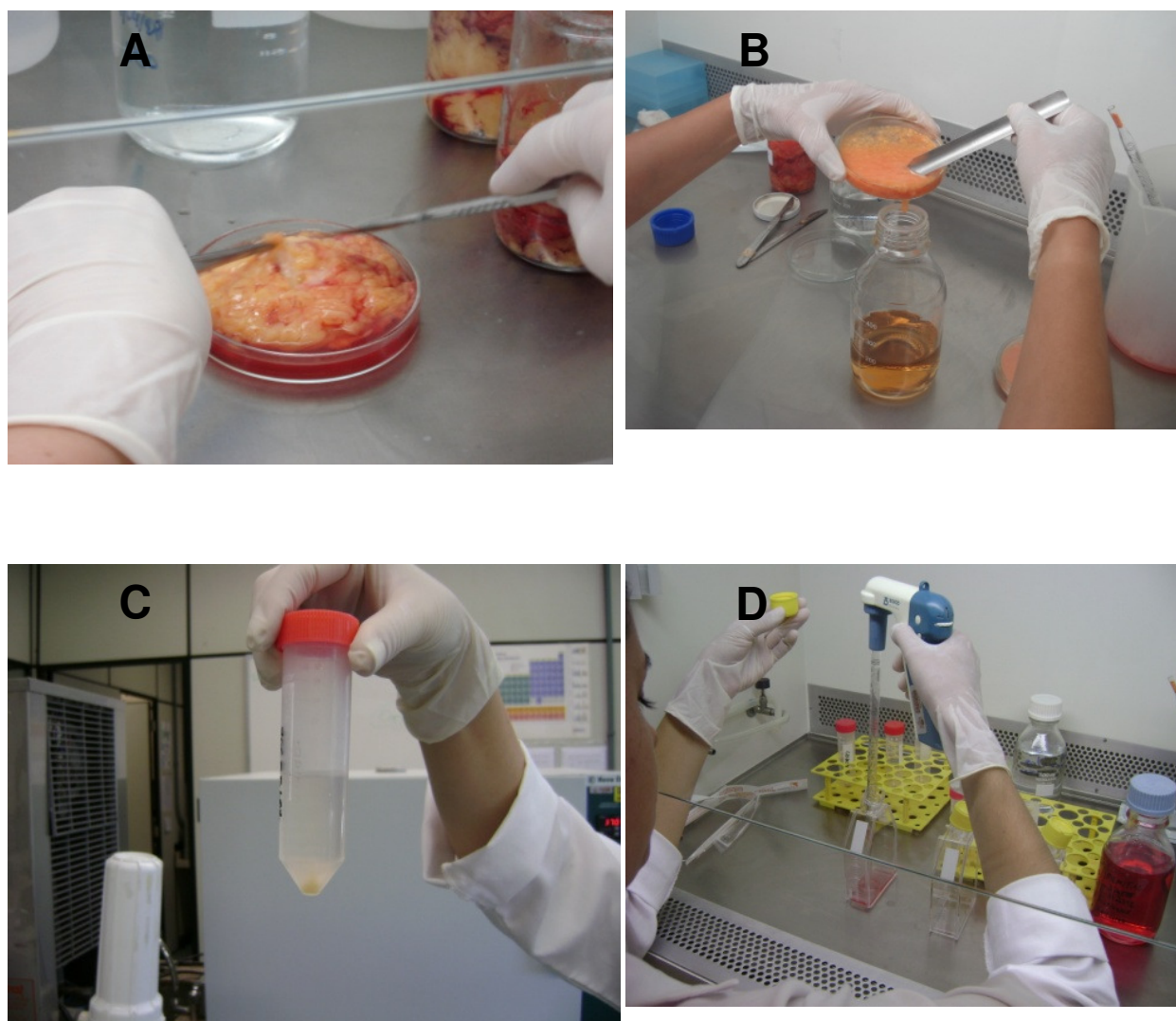


Fig. 2 - Isolamento de CTM do tecido adiposo humano
(A) Preparo do tecido; (B) Digestão enzimática

(C) Lavagem com PBS; (D) Plaqueamento das células

4.3. ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO EM LINHAGENS MESENQUIMAIS

Para confirmar o potencial de diferenciação em linhagens mesenquimais (adipócito e osteócito), as células (4^o subcultivo) de 3 cultivos diferentes foram cultivadas em microplacas de 24 poços, os quais foram previamente recobertos com lamínulas de vidro redondas (Sarstedt). As células foram plaqueadas nos poços contendo as lamínulas, numa concentração de 1×10^4 células/mL, e permaneceram até atingirem a confluência adequada para o início do tratamento de diferenciação. Foram utilizados meios especiais de diferenciação, segundo o protocolo descrito por Pittenger *et al* (1999) (46), seguido de análise citoquímica para confirmação da diferenciação.

Para a diferenciação osteogênica, as células foram semeadas em meio DMEM contendo 10% SFB, 0,1 μ M dexametasona, 10 mM β -glicerolfosfato e 0,2 mM ácido ascórbico 2-fosfato, durante 21 dias. As amostras controle receberam apenas meio DMEM 10% SFB. No final do tratamento, as lamínulas contendo as células diferenciadas e os controles foram fixadas com Bouin, coradas com Alizarin Red S e Light Green Yellowish para tingir a deposição de cálcio, e montadas com Entellan.

Para a diferenciação adipogênica, as células foram semeadas em meio DMEM contendo 10% SFB, 1 μ M dexametasona, 10 μ g/mL insulina e 100 μ M indometacina, durante 21 dias, trocando o meio de 2 a 3 vezes por semana. Os controles receberam apenas DMEM 10% SFB. As lamínulas diferenciadas e o controle foram fixadas com Bouin e coradas com Oil Red O, que tingem em vermelho os vacúolos lipídicos. As lâminas foram montadas em glicerol e seladas com esmalte.

4.4. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Ao final do 4^o subcultivo, alíquotas das CT isoladas foram utilizadas para caracterização por citometria de fluxo. As células foram retiradas da placa com solução de tripsina/EDTA 0,25% a 37^oC por 3 minutos, lavadas com PBS 1% de SFB e contadas em câmara de Neubauer. Em microtubos de centrifuga, foram distribuídas 3×10^5 células/tubo e procedeu-se à centrifugação a 400 xg por 5 min a 4^oC. O sedimento celular foi ressuspensão em 50 µL de PBS contendo 1% SFB.

A imunofenotipagem foi realizada com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos de superfície da membrana da célula. Para correta identificação dos antígenos, os anticorpos monoclonais foram conjugados a diferentes fluorocromos: PE (*phycoeritrin*), FITC (*fluorescein isothiocyanate*), PerCP (*Peridinin Chlorophyll Protein Complex*) ou APC (*allophycocyanin*), incubados com as células e analisados em citômetro de fluxo.

Em cada tubo foi adicionado um dos seguintes anticorpos monoclonais anti-humano, numa diluição final 1:10 de acordo com as instruções do fabricante (todos da BD-Pharmingen): anti-CD166 PE, CD105 FITC, CD90 PE, CD73 FITC, CD14 APC, CD31 FITC, CD34 PE, CD44 FITC, CD45 PerCP e CD29 APC. Como controles nestes experimentos foram utilizados anticorpos monoclonais isotípicos conjugados aos marcadores FITC, PE, PerCP e APC. A Tabela 1 apresenta a expressão de alguns destes marcadores pelas CTM.

Após 30 min de incubação a 4^oC foram adicionados em cada tubo 500 µL de PBS 1% SFB, e as células foram centrifugadas por 5 min. a 400 xg. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas e fixadas em 500 µL de PBS com 2% de formaldeído (Merck), e transferidas para tubos próprios para citometria de fluxo.

A análise das células foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD). O equipamento foi ajustado para as condições de análise de tamanho e complexidade

celular, e o ajuste de fluorescência foi realizado com auxílio dos controles isotípicos FITC, PerCP, APC e PE. Os dados foram analisados com auxílio do *software* CellQuest Pro (BD).

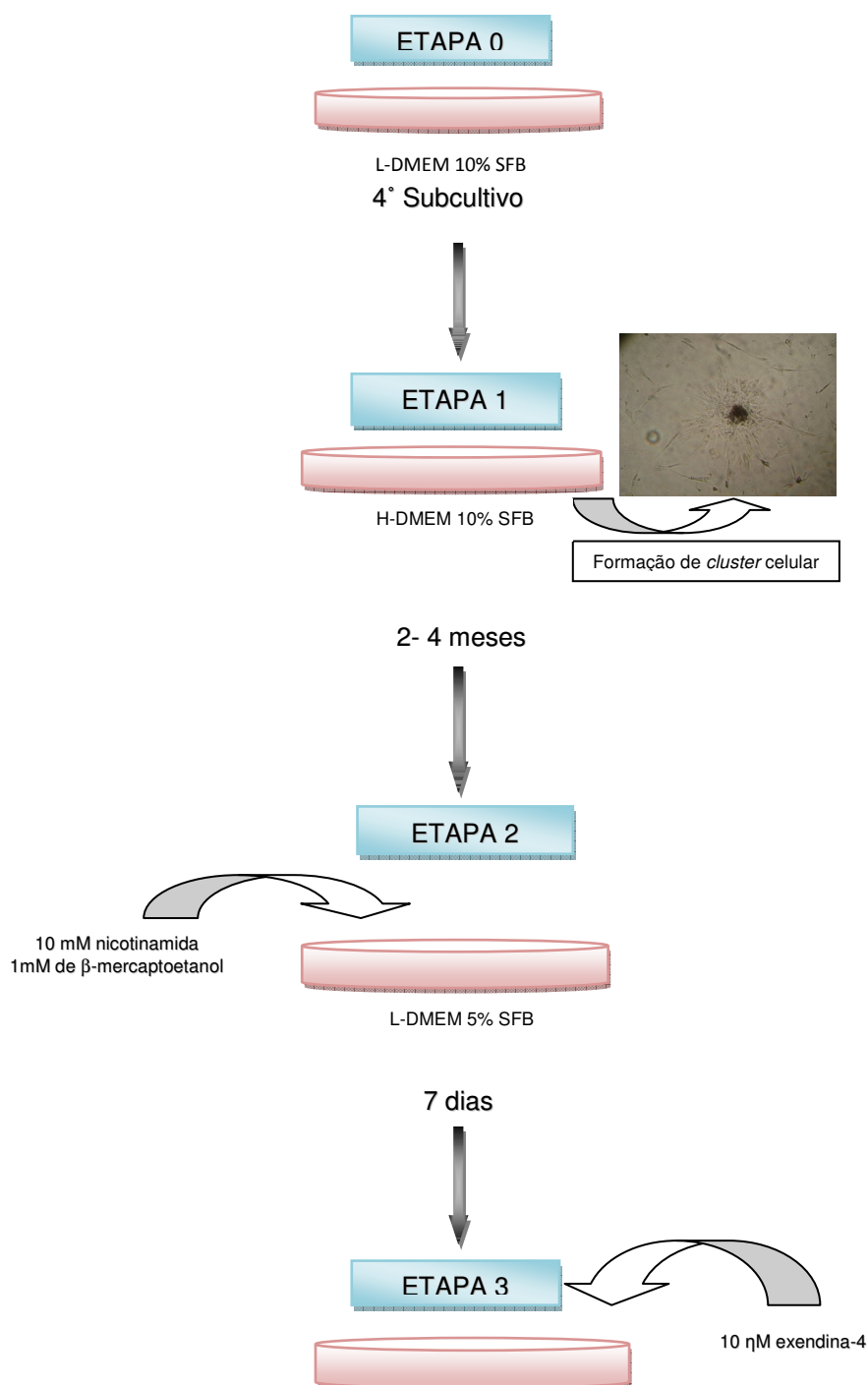
Tabela 1 - Marcadores utilizados para a caracterização imunofenotípica dos cultivos e sua expressão em diversos tipos celulares

Antígeno	Expressão Celular	Expressão em CTM
CD14 (LPS-R)	Monócitos e Macrófagos	-
CD29 (ITGB1)	Fibroblastos, Células epiteliais, Plaquetas, Timócitos, Eosinófilos	+++
CD31 (PECAM1)	Monócitos, Plaquetas, Neutrófilos, Linfócitos T <i>naïve</i> , Células NK e Células endoteliais	-
CD34	Progenitores Hematopoiéticos	-
CD44	Macrófagos, Linfócitos, Granulócitos, Fibroblastos, Células endoteliais e Epiteliais	+
CD45	Células Hematopoiéticas	-
CD73	Linfócitos B e T, Células Epiteliais	+++
CD90 (Thy-1)	Progenitores Hematopoiéticos e Neurônios	+++
CD105 (Endoglina)	Células Endoteliais, Células de Medula e Macrófagos Ativados	+++
CD166 (ALCAM)	Monócitos ativados, Linfócitos T Ativados, Neurônios, Células epiteliais e Fibroblastos	+

4.5. DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA DAS CTM

As CTMs do tecido adiposo humano expandidas *in vitro*, foram utilizadas ao final do quarto subcultivo (Etapa 0), para o protocolo de diferenciação para células produtoras de insulina, conforme descrito em Tang e colaboradores (49). As células

foram cultivadas em meio H-DMEM contendo 25 mM glicose e 10% SFB, durante aproximadamente 2-4 meses, até a aparição de clusters celulares (Etapa 1). A seguir, as células foram pré-incubadas no meio L-DMEM contendo 5,5 mM glicose, 5% SFB e 10 mM nicotinamida (Sigma) e 1 mM de β -mercaptoetanol, durante 7 dias (Etapa 2). Nos 7 dias seguintes, os *clusters* foram reinduzidos com as condições anteriores, apenas adicionando-se 10 η M exendina-4 (Etapa 3). A Figura 3 ilustra as etapas do processo de diferenciação.



7 dias

Fig. 3 – Etapas do processo de diferenciação de CTM para células endócrinas pancreáticas.

4.6. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

As células da etapa final da diferenciação foram analisadas por imunofluorescência indireta para verificar a expressão de fatores de transcrição e hormônios típicos de ilhotas pancreáticas. Os *clusters* foram desagregados com tripsina 0,25% por 5 min e as células foram ressuspensas a uma concentração de 3×10^4 células/mL para serem aderidas em lâminas, por técnica de *cytospin* em centrifuga Cytopro 7620 (Wescor) a 1000 rpm por 5 min (59). A seguir, foram fixadas em 4% PFA por 10 min e permeabilizadas em PBS/Triton- X100 0,5% durante 30 min a TA.

As lâminas foram então incubadas por 1 h a TA em solução de TBS/BSA 5%, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio de acordo com as instruções do fabricante foram adicionados às lâminas e incubados por 1 h a 37°C. As lâminas foram lavadas três vezes com TBS, sob suave agitação, por 5 minutos a TA e incubadas por 1 h a 37°C com anticorpo secundário conjugado com FITC (Abcam) ou Texas Red (Abcam), diluído 1:1000 em solução de bloqueio. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes com TBS, sob suave agitação, por 5 minutos a TA. Após este processo, as lâminas foram incubadas com DAPI diluído em TBS para marcação dos núcleos celulares, durante 5 minutos à TA.

O processo de lavagem foi repetido por mais três vezes e as lâminas foram montadas com glicerina P.A. Os controles para estes experimentos foram realizados em lâminas onde omitiram-se as incubações com os anticorpos primários, mantendo-se inalteradas as demais etapas do protocolo.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600, com registro de imagens digitais em câmara CoolSnap (Media Cybernetics).

Os anticorpos primários (todos anti-humano) e secundários utilizados nestes experimentos, bem como as respectivas diluições e a procedência, estão descritos a seguir:

- anti-Glucagon, diluição 1/200, policlonal de coelho (Abcam);
- anti-Insulina, diluição 1/200, policlonal de cobaia (Abcam);
- Anticorpo secundário policlonal de ovelha anti-IgG de coelho conjugado a FITC, diluição 1/1000 (Abcam);
- Anticorpo secundário policlonal de cabra anti-IgG de cobaia conjugado a Texas Red, diluição 1/1000 (Abcam).

5. RESULTADOS

5.1. ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO

O isolamento e cultivo foram realizados conforme descrito em Materiais e Métodos. As células foram cultivadas na concentração de 100 cel/cm², em garrafas com meio L-DMEM contendo 10% SFB e mantidas a 37°C por 24h. Após este período, o sobrenadante do cultivo era retirado para remoção das células não aderentes.

As células aderentes eram mantidas até atingir 80% de confluência, o que acontecia geralmente em 2 semanas (Figura 4 A). Quando atingiam a confluência as células eram tripsinizadas e transferidas para novas placas.

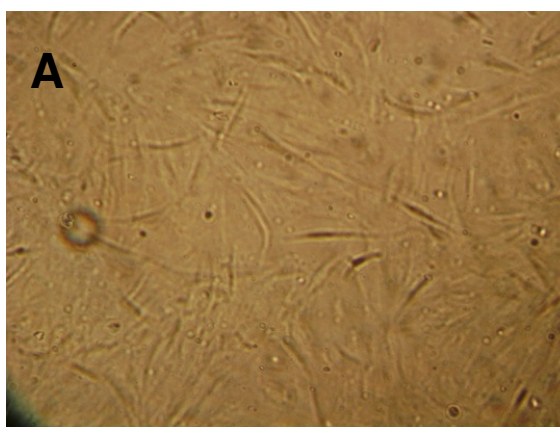


Fig. 4 - (A) Células-tronco do tecido adiposo humano em cultivo.

5.2. ANÁLISE DE DIFERENCIAÇÃO PARA LINHAGENS MESENQUIMAIS

Para confirmação da origem mesenquimal e do potencial de diferenciação, as células isolados do tecido adiposo foram induzidas à diferenciar em osteócitos e adipócitos. As células foram submetidas ao protocolo de diferenciação como descrito em Material e Métodos.

Para a diferenciação osteogênica, as culturas foram mantidas durante 21 dias com meio DMEM 10% SFB, contendo 0,1 μM dexametasona, 10 mM β -glicerolfosfato e 0,2 mM ácido ascórbico 2-fosfato, enquanto os controles continham apenas DMEM 10% SFB. Para a detecção da diferenciação, as culturas foram coradas pelo método da Alizarin Red, que cora exclusivamente os cristais de fosfato de cálcio na matriz (Figura 5 A e B). A diferenciação foi observada nas culturas induzidas, a matriz celular apresentou uma coloração vermelha indicado pela seta na figura 5 A, evidenciando os cristais de fosfato de cálcio.

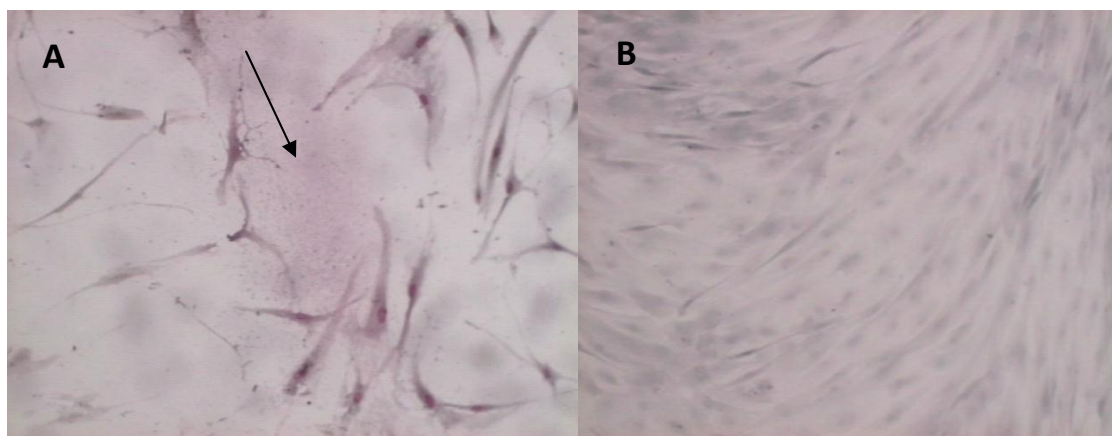


Fig. 5 - Diferenciação osteogênica. (A) cultivo diferenciado, (B) controle, 100X. Coloração com Alizarin red, pH 4,2 e light Green Yellowish. Seta: coloração dos cristais de fosfato de cálcio.

Para confirmar a diferenciação adipogênica, a presença de vacúolos lipídicos foi evidenciada por coloração com Oil red O, indicado pela seta na figura 6 A. Uma fração significativa do cultivo apresentou células com múltiplos vacúolos lipídicos corados. (Fig. 6 A). Os vacúolos não foram observados nos cultivos controle (Fig 6 B).

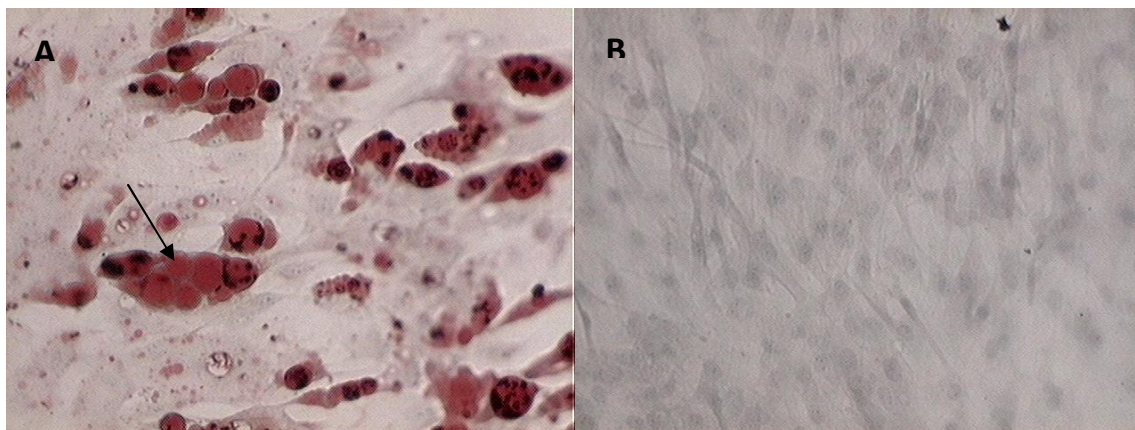


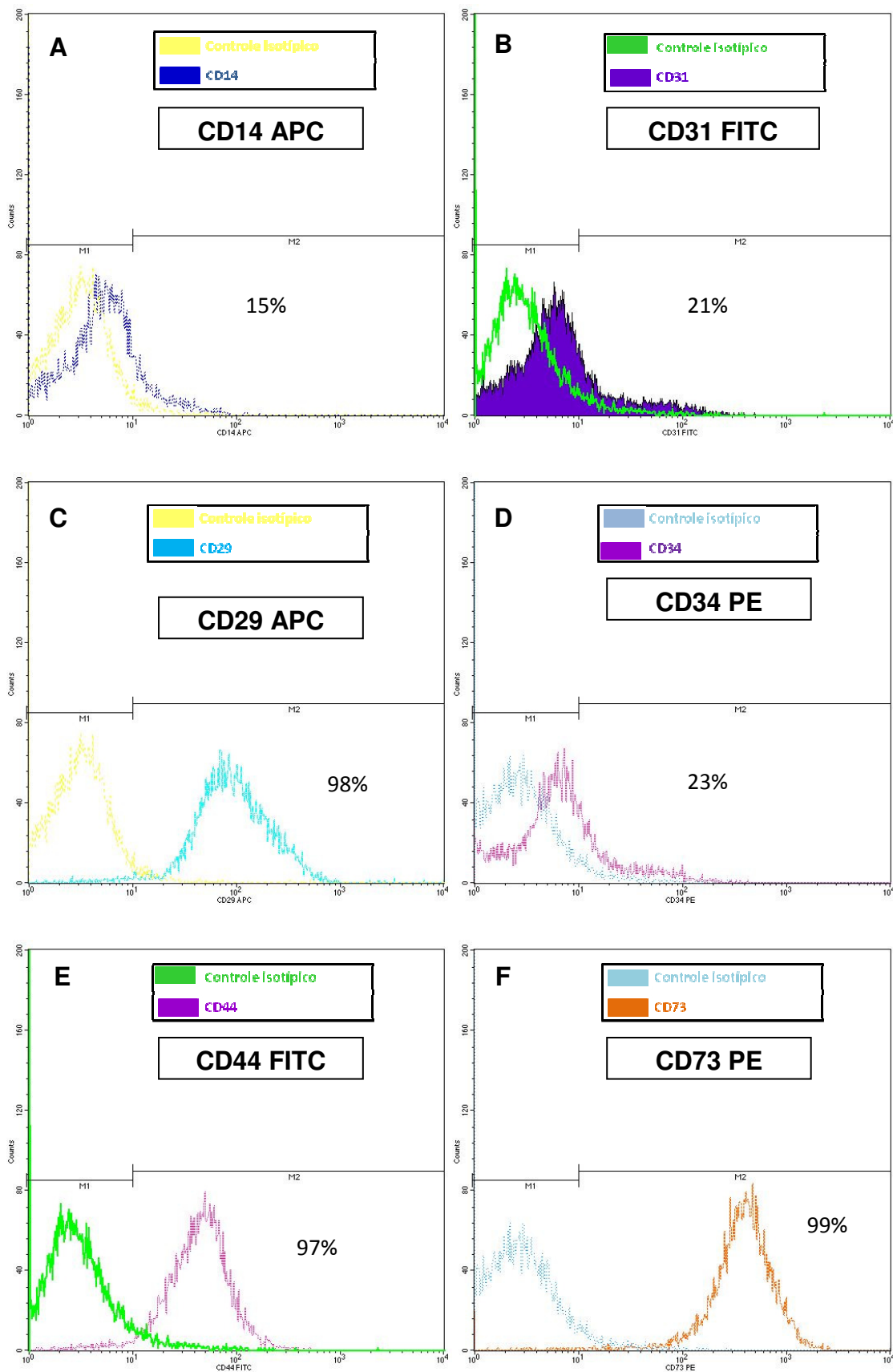
Fig. 6 - Diferenciação adipogênica. (A) cultivo diferenciado, (B) controle, 200X. Coloração dos vacúolos com Oil red O e dos núcleos com Hematoxilina. Seta: vacúolos lipídicos.

5.3. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Diferente das células progenitoras hematopoiéticas, que expressam na superfície de sua membrana a proteína CD34, até hoje ainda não se conhece um marcador fenotípico exclusivo de CTM, por isso para caracterizá-las utiliza-se um conjunto de anticorpos contra diversos marcadores presentes nessas células. A expressão típica destes marcadores pelas CTM encontra-se na Tabela 1.

As CT cultivadas foram marcadas diretamente com anticorpos anti-CD29 APC, CD73 PE, CD90 FITC, CD44 FITC, CD105 FITC, CD166 PE, CD14 APC, CD31 FITC, CD34 PE e CD45 PerCP. Como controle do experimento, amostras das células foram incubadas com os anticorpos isotípicos conjugados a FITC, PE, PerCP e APC. Em seguida, foram submetidas à citometria de fluxo em aparelho FACSCalibur e analisadas pelo software BD CellQuest Pro.

A Figura 7 mostra o resultado deste ensaio. Pode-se observar que a maioria das células foi positiva para os marcadores CD105, CD166, CD29, CD73, CD44 e CD90, confirmando a origem mesenquimal. Os marcadores CD45, CD14, CD34 e CD31 não apresentaram marcação significativa, como esperado.



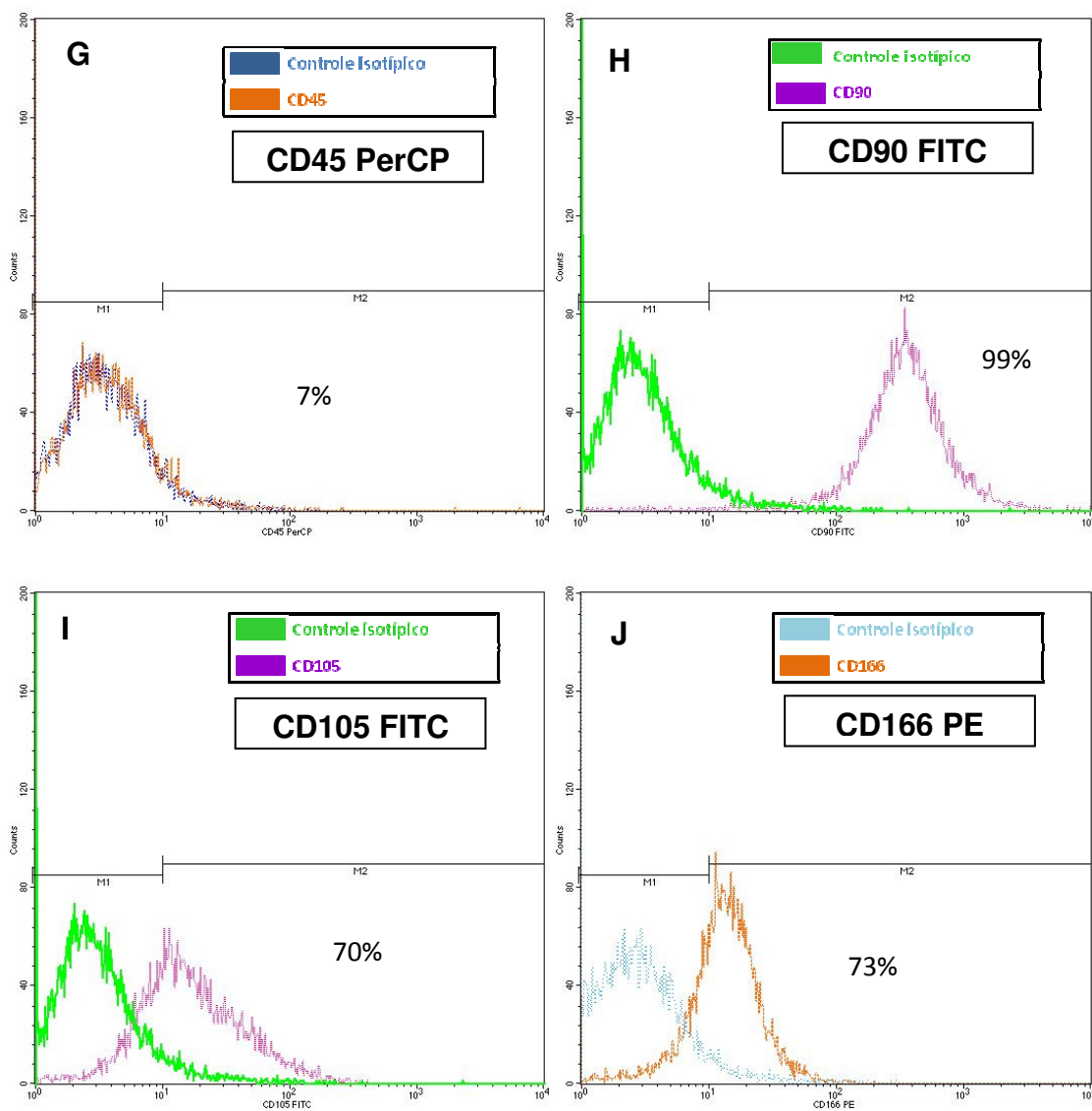


Fig. 7 - Imunofenotipagem de CTM do tecido adiposo humano. Os histogramas apresentam a porcentagem de células reativas com os anticorpos testados. (A) CD14; (B) CD31; (C) CD29; (D) CD34; (E) CD44; (F) CD73; (G) CD45; (H) CD90; (I) CD105; (J) CD166

5.4. DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA PANCREÁTICA DAS CTM

Após a caracterização da origem mesenquimal dos cultivos (na 4ª passagem), estes foram mantidos e expandidos em L-DMEM 10% SFB, evitando confluência para mantê-las em estado indiferenciado. Estas células exibiam morfologia similar a fibroblastos, expandiam facilmente *in vitro* e tendiam a formar colônias (Fig. 8A).

Quando os cultivos eram induzidos com meio contendo 10% SFB e alta concentração de glicose (H-DMEM; 25 mM glicose), as células atingiam confluência e começava a evidenciar o aparecimento de *clusters* celulares (Fig 8B). Conforme o avanço do tempo de incubação em alta glicose, o cultivo se tornava cada vez mais confluyente e menos refringente. A partir do segundo mês de cultivo em alta glicose, observou-se o aparecimento de vários *clusters* celulares os quais cresciam até formar esferas. Estes *clusters* aumentavam em tamanho e número com o passar do tempo. Nesta etapa, os *clusters* eram então induzidos em meio com baixa glicose com 10 µM de nicotinamida, 1 mM de β-mercaptoetanol e reinduzidos na segunda semana com exendina-4.

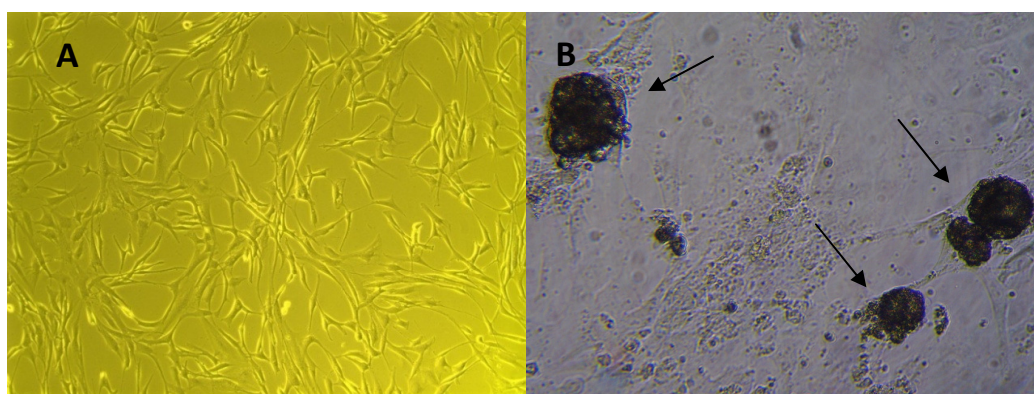


Fig. 8 - Diferentes estágios de cultivo e diferenciação de CTM. (A) cultivo primário (B) formação de clusters após um mês de cultivo em alta glicose; 100X. Seta: *clusters* celulares.

5.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Os *clusters* obtidos dos cultivos diferenciados foram desagregados por tripsinização e as células aderidas em lâminas de vidro através de *cytospin*. As células fixadas nas lâminas foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta para insulina e glucagon, que são os hormônios característicos das células β e α das ilhotas pancreáticas, respectivamente.

A reação com os anticorpos primários foi evidenciada por meio do anticorpo secundário conjugado ao FITC (coloração em verde) e Texas Red (coloração vermelha). O núcleo das células foi corado com DAPI. Os controles negativos foram realizados pela omissão do anticorpo primário. Os resultados obtidos na marcação destas células estão apresentados nas Figuras 9 (insulina) e 10 (glucagon).

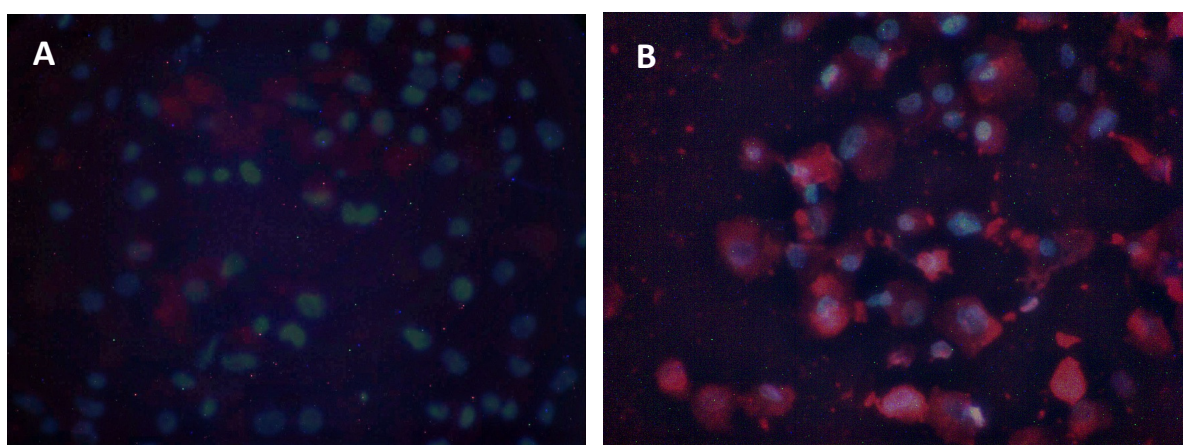


Fig. 9 - Imunofluorescência indireta para insulina em CTM diferenciadas do tecido adiposo. (A) Controle negativo. (B) Anticorpo primário anti-insulina com anticorpo secundário conjugado TR; coloração dos núcleos com DAPI. Aumento 400X.

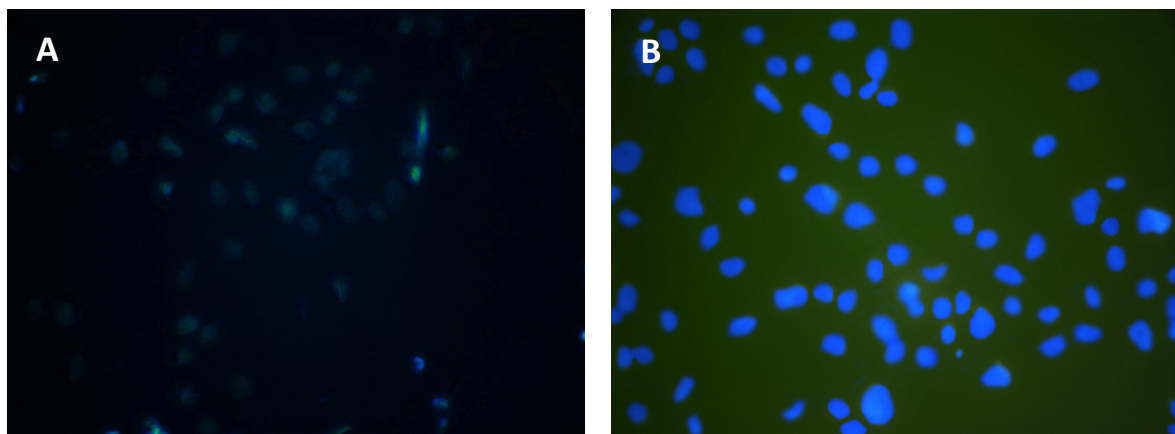


Fig. 10 - Imunofluorescência indireta para glucagon em CTM diferenciadas do tecido adiposo. (A) Controle negativo. (B) Anticorpo primário anti-glucagon com anticorpo secundário conjugado FITC; coloração dos núcleos com DAPI. Aumento 400X.

Nestes experimentos foi possível observar que a maioria das CTM diferenciadas passaram a expressar insulina. Entretanto, a marcação para glucagon aparentemente não foi detectada.

6. DISCUSSÃO

A busca de uma fonte renovável e de fácil obtenção, de células com capacidade de produção de insulina (CPI) de modo regulado, para reposição das células β perdidas no DM1, é um tema de enorme interesse e uma alternativa promissora para o tratamento desta doença. Diversos estudos vêm sendo realizados nos últimos anos com este objetivo. Porém, uma fonte que apresente todas estas características ainda não está disponível, requerendo estudos adicionais. A diferenciação de precursores pancreáticos humanos a CPI resolveria muitas limitações atuais, como a expansão e obtenção de uma massa de células adequada para proporcionar um estado de normoglicemia após o transplante.

Embora grandes avanços tenham sido alcançados com o “Protocolo de Edmonton” e modificações da técnica original, diversos aspectos ainda necessitam aperfeiçoamento para possibilitar a indicação do transplante de ilhotas a uma parcela mais ampla de pacientes com DM1. Para lidar com as principais dificuldades ainda enfrentadas (a técnica de isolamento de ilhotas, a disponibilidade de tecido produtor de insulina, a rejeição e o uso de drogas imunossupressoras), diversas linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos. O principal obstáculo a ser vencido é a necessidade do uso crônico de imunossupressores para evitar a rejeição do enxerto. Portanto, atualmente, ao se considerar a realização deste tipo de transplante, deve-se pesar os possíveis benefícios (estabilização metabólica, diminuição das complicações crônicas, abolição das injeções de insulina) em relação aos potenciais efeitos colaterais destas drogas (maior susceptibilidade a infecções, maior incidência de tumores malignos e toxicidade em órgãos como os rins e as próprias células das ilhotas). Estudos visando a imunoproteção das ilhotas, a indução de tolerância ao transplante e o desenvolvimento de novos imunossupressores são fundamentais nesta área (60, 61). Em relação à disponibilidade de ilhotas para transplante, diversos aspectos da técnica de isolamento de ilhotas vêm sendo trabalhados com o objetivo de melhorar sua eficiência, visto que ainda são necessários de 2 a 3 doadores de órgãos para obtenção de ilhotas suficientes para tratamento de 1 único paciente (62). Atualmente, a maior esperança concentra-se na possibilidade de geração de tecido produtor de insulina a partir de uma fonte renovável como as CT, tanto embrionárias quanto adultas (63).

A descoberta de métodos para isolar e cultivar CTE humanas em 1998, por Thomson *et al* (1998), renovou as esperanças de médicos, pesquisadores e pacientes diabéticos e suas famílias de uma cura para o DM1 e, possivelmente, até mesmo para o DM2 (64). Em teoria, CTE podem ser cultivadas e tratadas para se diferenciarem em qualquer tecido/célula do corpo, até mesmo em células β pancreáticas produtoras de insulina. Com um suprimento adequado de CPI, cultivadas *in vitro*, haveria massa suficiente para transplante, para que a terapia celular pudesse ser aplicada amplamente em pacientes diabéticos.

Estudos realizados com camundongos mostraram que CTE podem ser induzidas a se diferenciarem em células β produtoras de insulina e outros trabalhos indicam que esta estratégia também pode ser possível utilizando-se CTE humanas(65-68). Deste modo, estas células seriam boas candidatas para eliminar o transplante de pâncreas/ilhotas alogênicas em pacientes diabéticos, utilizando-as como fontes alternativas de células produtoras de insulina. No entanto, um protocolo detalhado para obter populações puras e funcionais de células secretoras de insulina a partir de CTE ainda não foi propriamente estabelecido.

Paralelamente ao estudo das CTE, uma nova classe de CT foi emergindo, visando seu uso clínico e terapêutico: as CTA. As CT provenientes da medula óssea são as CTA mais estudadas. Atualmente, são utilizadas clinicamente para restaurar vários componentes do sangue e do sistema imune. Parece haver dois tipos de CT na medula óssea: 1) as células progenitoras hematopoiéticas (CPH), que formam as células do sangue e do sistema imune e, 2) as células-tronco mesenquimais (CTM). Normalmente, estas células são recrutadas para a reposição tissular após dano e/ou angiogênese de vários órgãos.

As CTA são normalmente comprometidas com as células maduras do tecido no qual elas estão localizadas. Em condições específicas, elas apresentam certa plasticidade, de acordo com os sinais do ambiente extracelular, propriedade conhecida como transdiferenciação. Podem ser mantidas em cultura por longos períodos de tempo, embora esta capacidade seja mais restrita quando comparadas com CTE(22).

Para tornar viável a sua aplicação clínica, qualquer terapia celular deve representar uma vantagem significativa em segurança e eficácia em relação ao tratamento convencional de administração de insulina. Trabalhos recentes têm mostrado a possibilidade de diferenciar células provenientes de diversas fontes em CPI(69).

Pesquisadores descreveram que as CTM são capazes de suprimir a resposta do sistema imune pela inibição da maturação das células dendríticas e inibir a ação dos linfócitos T, linfócitos B e células NK, fazendo dessas células excelentes candidatas para o tratamento do diabetes(70).

A descoberta da subpopulação das CTMs em reservas de tecido adiposo de humanos adultos trouxe esperanças e possibilidades de avanços para os estudos com células-tronco adultas(71). O tecido adiposo humano é abundante e acessível e pode ser obtido por procedimentos pouco invasivos. A fração vascular do estroma do tecido adiposo possui até 2% de células com potencial para diferenciação em diferentes linhagens celulares como osteoblastos, condrócitos, adipócitos e células neurais, comparado com 0,002% para CTMs da medula óssea(72).

O estudo de Zulewski (2006), mostrou que CTM das ilhotas pancreáticas humanas assim como as CTM do tecido adiposo humano podem ser induzidas, sem modificações genéticas, a ativarem genes do desenvolvimento pancreático incluindo Isl-1, Ipf-1, Ngn-3, Pax-4, Pax-6, Nkx-2.2, Nkx-6.1, assim como os genes responsáveis pela produção dos hormônios das ilhotas, como insulina, glucagon e somatostatina(73).

No ano de 2006 um estudo demonstrou que as CTM do tecido adiposo humano são capazes de adotar um fenótipo endócrino *ex vivo* sem a modificação genética, apenas com as condições de cultivo pré-definidas(57).

O estudo de Chandra *et al* (2011) explorou o potencial das células-tronco do tecido adiposo humano na diferenciação em agregados similares a ilhotas(74). O protocolo utilizado permitiu a conversão das células mesodérmicas em endodérmicas (Hnf3b, TCF2 e Sox17) e para PDX1, Ngn3, NeuroD, Pax4, que posteriormente produziu insulina *in vitro*. Estas células, transplantadas em

camundongos diabéticos, foram capazes de praticamente restaurar a normoglicemia desses animais.

Células-tronco do tecido adiposo humano, transfectadas com PDX-1 e submetidas a um protocolo de diferenciação, mostraram-se capazes de produzir insulina, e transplantadas em camundongos diminuíram o nível sérico de glicose e o aumento da sobrevivência dos animais quando comparados com o grupo controle(75).

Okura *et al* (2010), através de um protocolo de diferenciação de 6 estágios, mostraram por imunofluorescência a produção de insulina e glucagon por estas células. Somatostatina também foi expressa por um pequeno número de células(76).

Atualmente existem estudos avaliando o potencial das CTM no tratamento do diabetes em humanos. No estudo de Trivedi *et al* (2008), células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano foram isoladas, expandidas e diferenciadas em células produtoras de insulina. Células-tronco hematopoiéticas da medula óssea foram isoladas e adicionadas no cultivo das CTM do tecido adiposo humano. Esta mistura foi infundida na veia porta dos respectivos pacientes. Efeitos colaterais da infusão não foram observados. Os pacientes apresentaram ganho de peso, ficaram fisicamente mais ativos e alertas. Foi observado o aumento do nível sérico de peptídeo-C, diminuição de unidades de insulina diárias e a diminuição da hemoglobina glicosilada(77).

Com base nos diversos estudos das CTM do tecido adiposo humano, concluímos que esta seria uma das melhores alternativas para obtenção de uma fonte renovável de CPI. Os objetivos iniciais do estudo, isolamento, cultivo e caracterização das células obtidas do tecido adiposo, foram alcançados com os resultados esperados. Estas células mostraram expressão dos antígenos CD105, CD166, CD29, CD90, CD44 e CD73, que são típicos de CTM, e a ausência de CD31, CD45, CD34 e CD14, que são marcadores endoteliais e hematopoiéticos. Nos testes funcionais, quando estimuladas, mostraram sua capacidade de diferenciação em osteócitos e adipócitos. Visto que os resultados foram claramente positivos para a presença dos marcadores de membrana e nos ensaios funcionais de diferenciação em linhagens mesenquimais, concluímos que estas células tratavam-se realmente de CTM.

Após esta etapa de caracterização inicial tentamos reproduzir um protocolo de diferenciação de CTM a CPI que fosse comumente usado, relativamente fácil e que estivesse ao nosso alcance. Dentre as alternativas existentes, escolhemos o protocolo descrito por Tang *et al*, que conseguiu diferenciar CTM da medula óssea de camundongo Balb/c em células que expressavam os genes *Ins 1*, *Ins 2*, *IAPP*, *GLUT-2*, glicocinase, *PDX-1*, *Pax6* e *nestina* (56).

Diferentes protocolos têm sido empregados para induzir CT de diferentes fontes a se diferenciar em CPI *in vitro*. Tratamento com meio contendo alta concentração de glicose é considerado um potente indutor para a diferenciação e expressão de genes típicos de células β (78, 79). A Nicotinamida tem sido usada para preservar a viabilidade e função das ilhotas pancreáticas em cultivo, possivelmente através da atividade da enzima *poly ADP-ribose polymerase* (PARP) (80, 81) e também para induzir a diferenciação em ilhotas pancreáticas e a secreção de insulina (82). Exendina-4 é um agonista do receptor de *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1), que estimula a proliferação, neogênese e sobrevivência das células β *in vivo* (25). Deste modo, optamos por utilizar no meio de cultivo em nosso modelo experimental uma combinação de glicose em baixa concentração (5,5 mM), exendina-4 e nicotinamida.

Assim, as CTM isoladas foram expandidas indiferenciadas e, a seguir, cultivadas por longos períodos em condições propícias à diferenciação em CPI conforme o protocolo de Tang (56). Após períodos variáveis entre dois a quatro meses de tratamento em alta concentração de glicose, os cultivos tomavam a forma de *clusters* celulares e o meio era acrescido dos fatores finais de diferenciação, primeiro a nicotinamida e, a seguir, a exendina-4. Ao final do experimento, o processo de diferenciação das CTM para CPI era analisado através de imunofluorescência indireta.

Encontramos algumas dificuldades na realização dos experimentos, como o descolamento das células em cultivo, provavelmente devido à qualidade do plástico das garrafas de cultivo celular(83). Estes autores encontraram um aumento de 3 a 4 vezes mais CT ao final da terceira passagem, dependendo do fabricante das garrafas de cultivo.

Nas primeiras tentativas de realizar a imunofluorescência encontramos dificuldade em observar as células diferenciadas, quando estas eram cultivadas em lamínulas e diretamente submetidas ao protocolo de imunofluorescência. Após o uso do *cytospin*, as células foram aderidas nas lâminas rapidamente, eliminando muitos interferentes na visualização das células.

A imunofluorescência indireta aparentemente mostrou a presença de insulina no citoplasma das células tratadas, mas não nos controles. A presença de glucagon não foi evidenciada. A comprovação da diferenciação deverá continuar e ser evidenciada por outras técnicas como, por exemplo, a análise por PCR em tempo real.

Embora ainda seja necessário aperfeiçoar todos os protocolos baseados em CTE e CTA, estas evidências sugerem fortemente que as CT são uma fonte potencial de tecidos para terapias regenerativas no futuro. A diferenciação de células β a partir de CT 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. O principal desafio é obter um produto celular capaz de mimetizar o mais próximo possível as características básicas de uma célula β 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.

De um 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.

7. CONCLUSÕES

- As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano foram isoladas, cultivadas e expandidas *in vitro* em estado indiferenciado;
- As células-tronco isoladas foram caracterizadas como CTM, tanto por citometria de fluxo quanto pelo seu potencial de diferenciação em adipócito e osteócito;
- As CTM isoladas aparentemente foram capazes de diferenciar para fenótipo endócrino pancreático, mostrando expressão intracelular do hormônio insulina, como demonstrado pela imunofluorescência indireta;
- Expressão de glucagon não foi detectada após a indução da diferenciação das CTM do tecido adiposo humano.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva: World Health Organization; 1999.
2. World Health Organization. Fact Sheet N^o 138; 2002.
3. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2000;23 Suppl 1:S4-19.
4. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001;358(9277):221-9.
5. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 2004 Mar 27;328(7442):750-4.
6. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
7. Ritz E, Schomig M. The diabetic patient with renal failure. *Nefrologia*. 2000;20 Suppl 3:16-24.
8. Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin Transplant*. 2005 Aug;19(4):433-55.
9. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000;343(4):230-8.

10. Robertson RP. Pancreatic islet transplantation for diabetes: successes, limitations, and challenges for the future. *Mol Genet Metab.* 2001;74(1-2):200-5.
11. Eliaschewitz FG, Aita CA, Genzini T, Noronha IL, Lojudice FH, Labriola L, et al. First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc.* 2004 May;36(4):1117-8.
12. Percegona LS, Aita CA, Pereira E, Sotta ED, Silva IC, Riella MC. [Clinical protocol for selection of the candidates for islet transplantation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008 Apr;52(3):506-14.
13. Bonner-Weir S, Weir GC. New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol.* 2005 Jul;23(7):857-61.
14. Limbert C, Path G, Jakob F, Seufert J. Beta-cell replacement and regeneration: Strategies of cell-based therapy for type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008 Mar;79(3):389-99.
15. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1025-34.
16. McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia.* 2001 Oct;44(10):1203-14.
17. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature.* 1994 Oct 13;371(6498):606-9.
18. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 15;97(4):1607-11.
19. Watada H. Neurogenin 3 is a key transcription factor for differentiation of the endocrine pancreas. *Endocr J.* 2004 Jun;51(3):255-64.

20. Babu DA, Chakrabarti SK, Garmey JC, Mirmira RG. Pdx1 and BETA2/NeuroD1 participate in a transcriptional complex that mediates short-range DNA looping at the insulin gene. *J Biol Chem*. 2008 Mar 28;283(13):8164-72.
21. Kim SK, MacDonald RJ. Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Oct;12(5):540-7.
22. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg*. 2004 Jan;139(1):93-9.
23. Câmara NOS, Bassi EJ, Schor N. Perspectivas do uso de células-tronco em Nefrologia. In: Borges DR, Rothschild HA, editors. *Atualização Terapêutica*. 10 ed. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda; 2010.
24. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004 Nov;95(5):209-14.
25. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 5;97(14):7999-8004.
26. Peck AB, Cornelius JG, Schatz D, Ramiya VK. Generation of islets of Langerhans from adult pancreatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002;9(6):704-9.
27. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med*. 2000;6(3):278-82.
28. Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, et al. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):31950-7.
29. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in

- liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med*. 2000 May;6(5):568-72.
30. Horb ME, Shen CN, Tosh D, Slack JM. Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr Biol*. 2003;13(2):105-15.
 31. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 29;100(9):5034-9.
 32. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):998-1003.
 33. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):16105-10.
 34. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 2001;292(5520):1389-94.
 35. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2000;49(2):157-62.
 36. Bassi EJ, Aita CA, Camara NO. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells*. 2011 Jan 26;3(1):1-8.
 37. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci*. 2006 Oct;31(10):589-95.
 38. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999 Oct;181(1):67-73.

39. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
40. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Aug;33(8):881-7.
41. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001 Jun;226(6):507-20.
42. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001 May 28;153(5):1133-40.
43. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int*. 2003 Feb;72(2):135-42.
44. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001 Aug;44(8):1928-42.
45. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 1993 Jul 1;82(1):66-76.
46. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
47. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med*. 2007;140:67-81.

48. Harting M, Jimenez F, Pati S, Baumgartner J, Cox C, Jr. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2008;10(3):243-53.
49. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol*. 2003 Aug;31(8):723-32.
50. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
51. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest*. 2004 Sep;114(6):795-804.
52. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol*. 2004 Dec;32(12):1212-25.
53. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*. 2004 Oct 15;10(20):3016-20.
54. Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 May 20;330(4):1299-305.
55. Shakhov VP, Popov SV, Kokarev OV, Afanas'ev SA. In vitro formation of mesenchymal bone marrow islets. *Bull Exp Biol Med*. 2004 Jun;137(6):625-7.
56. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*. 2004 Jul;53(7):1721-32.

57. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 24;341(4):1135-40.
58. Pawitan JA. Prospect of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Cell & Tissue Transplantation & Therapy*. 2009;2:7-9.
59. Gonzalez P. Análise da expressão de marcadores de diferenciação endócrina pancreática em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato tratadas com prolactina [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2009.
60. Aita CA, Sotta ED, Silva IC, Percegon L, Riella MC. Islet cell transplantation. *Port J Nephrol Hypert*. 2007;21(3):193-200.
61. Shapiro AM, Nanji SA, Lakey JR. Clinical islet transplant: current and future directions towards tolerance. *Immunol Rev*. 2003 Dec;196:219-36.
62. Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress. *N Engl J Med*. 2004 Feb 12;350(7):694-705.
63. Serup P, Madsen OD, Mandrup-Poulsen T. Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *Bmj*. 2001;322(7277):29-32.
64. Thomson JA, Marshall VS. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol*. 1998;38:133-65.
65. Chen C, Chai J, Singh L, Kuo CY, Jin L, Feng T, et al. Characterization of an in vitro differentiation assay for pancreatic-like cell development from murine embryonic stem cells: detailed gene expression analysis. *Assay Drug Dev Technol*. 2011 Aug;9(4):403-19.
66. Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, et al. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res*. 2007 Apr;17(4):333-44.

67. Li G, Luo R, Zhang J, Yeo KS, Lian Q, Xie F, et al. Generating mESC-derived insulin-producing cell lines through an intermediate lineage-restricted progenitor line. *Stem Cell Res.* 2009 Jan;2(1):41-55.
68. Shi Y. Generation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol.* 2010;636:79-85.
69. Furth ME, Atala A. Stem cell sources to treat diabetes. *J Cell Biochem.* 2009 Mar 1;106(4):507-11.
70. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes.* 2008 Jul;57(7):1759-67.
71. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7(2):211-28.
72. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005 Sep;54(3):132-41.
73. Zulewski H. Stem cells with potential to generate insulin producing cells in man. *Swiss Med Wkly.* 2006 Oct 14;136(41-42):647-54.
74. Chandra V, Swetha G, Muthyala S, Jaiswal AK, Bellare JR, Nair PD, et al. Islet-like cell aggregates generated from human adipose tissue derived stem cells ameliorate experimental diabetes in mice. *PLoS One.* 2011;6(6):e20615.
75. Kajiyama H, Hamazaki TS, Tokuhara M, Masui S, Okabayashi K, Ohnuma K, et al. Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice. *Int J Dev Biol.* 2010;54(4):699-705.

76. Okura H, Komoda H, Fumimoto Y, Lee CM, Nishida T, Sawa Y, et al. Transdifferentiation of human adipose tissue-derived stromal cells into insulin-producing clusters. *J Artif Organs*. 2009;12(2):123-30.
77. Trivedi HL, Vanikar AV, Thakker U, Firoze A, Dave SD, Patel CN, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells combined with hematopoietic stem cell transplantation synthesize insulin. *Transplant Proc*. 2008 May;40(4):1135-9.
78. Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thiery JP, Czernichow P, Bellusci S, et al. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development*. 2001;128(24):5109-17.
79. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, et al. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development*. 1998 Jun;125(12):2213-21.
80. Burkart V, Blaeser K, Kolb H. Potent beta-cell protection in vitro by an isoquinolinone-derived PARP inhibitor. *Horm Metab Res*. 1999 Dec;31(12):641-4.
81. Heller B, Burkle A, Radons J, Fengler E, Jalowy A, Muller M, et al. Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1994 Sep;375(9):597-602.
82. Vaca P, Berna G, Araujo R, Carneiro EM, Bedoya FJ, Soria B, et al. Nicotinamide induces differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells. *Exp Cell Res*. 2008 Mar 10;314(5):969-74.
83. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):462-71.

9. ANEXO

ANEXO:

Artigo aceito para publicação em 2012 na revista Transplantation Proceedings

**EXPRESSION OF PANCREATIC ENDOCRINE MARKERS BY MESENCHYMAL
STEM CELLS FROM HUMAN ADIPOSE TISSUE**

Authors:

Aline Calil Silva (1)	line.calil@gmail.com
Luciana Soares Percegoni (1)	percegoni@hotmail.com
Ana Luiza França (1)	aninha.fra@gmail.com
Thatiana Mara dos Santos (1)	thatimarabio@yahoo.com.br
Carla Corradi Perini (1)	carla.corradi@pucpr.br
Patricia González (1)	pgonzalez@innpulso.cl
Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto (1)	carmen.rebelatto@pucpr.br
Niels Olsen Saraiva Câmara (2)	niels@icb.usp.br
Carlos Alberto Mayora Aita (1)	c.aita@pucpr.br

Institutions:

(1) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

(2) Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo

Financial support:

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (research grant)

Correspondence and reprint requests should be directed to:

Carlos Alberto Mayora Aita

Tel/Fax +55 (41) 3271-6334 / 3271-1657 - * E-mail: c.aita@pucpr.br

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Rua Imaculada Conceição, 1155

Curitiba (PR) Brazil

80215-901

* The author agrees with his E-mail being published

The article contains 1 Figure.

*Abstract***Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal stem cells from human adipose tissue**

Mesenchymal stem cells (MSCs) from human adipose tissue have a great potential for use in cell therapy due to its ease of isolation, expansion and differentiation, besides relative acceptance of the ethical point of view. Our intention was to isolate and promote in vitro expansion and differentiation of MSCs from human adipose tissue into cells with a pancreatic endocrine phenotype. Human adipose tissue was obtained from patients undergoing abdominal dermolipectomy. Adipose tissue was digested with type I collagenase, MSCs were isolated by plastic adherence, characterized by cytochemistry and FACS and in vitro expanded. MSC differentiation into an endocrine phenotype was induced with high glucose (25 mmol/L) media during 2-4 months containing nicotinamide, exendin-4 and 2-mercaptoethanol. Insulin and glucagon expression was analyzed by immunofluorescence. Cells isolated from the human adipose tissue and expanded in vitro expressed MSC markers as confirmed by FACS and cytochemistry. Production of insulin by differentiated cells was demonstrated by immunofluorescence, although glucagon was not expressed. Conclusions: MSCs isolated from the human adipose tissue were induced to differentiate in vitro into an endocrine phenotype and expressed insulin.

Introduction

The search for a renewable source of cells with β -cell properties is a very interesting subject and a promising therapeutic alternative for diabetes mellitus.¹ Mesenchymal stem cells (MSC) from human adipose tissue have a great potential for use in cell therapy due to its ease of isolation, expansion and differentiation. Adipose tissue can be easily harvested in adult subjects and compared to the bone marrow, has a higher amount of MSC per gram of tissue.² Our intention was to isolate and promote in vitro expansion and differentiation of MSC from human adipose tissue into cells with a pancreatic endocrine phenotype.

Methods

Human adipose tissue were obtained from patients undergoing abdominal dermolipectomy. Each patient provided a written informed consent before participating. The study protocol was approved by the University's ethics committee (protocol number 1437/2008). *MSC isolation and culture:* Tissue fragments were dissected and the subcutaneous adipose tissue was collected and washed with PBS. Adipose tissue was minced into small fragments and digested with a 1 mg/mL type I collagenase solution (Invitrogen Co, Grand Island, USA) for 30 min at 37°C on a shaker. The digested tissue was passed through a 40 μ m mesh filter, washed with PBS and centrifuged. Cell pellet was resuspended in DMEM-F12 medium (Invitrogen Co, Grand Island, USA) supplemented with 10% FBS and plated onto culture flasks at a density of 1×10^5 cells/cm². Adherent cells were expanded in the same medium and then used for characterization and endocrine differentiation. Cell characterization was performed in a FACS Calibur equipment with anti-CD29, CD73, CD90, CD105, CD166, CD14, CD31, CD34 and CD45 antibodies (all Abcam PLC, Cambridge, UK). Cells were also induced to differentiate into adipocytic and osteocytic lineages using established protocols, followed by cytochemistry analysis.³ *MSC differentiation:* induction of MSCs into a pancreatic endocrine phenotype was carried out essentially as described by Tang et al (2004).⁴ Briefly, MSCs were cultured during 2 to 4 months in H-DMEM (23 mmol/L glucose) + 10% FCS until the appearance of cell clusters. Media was then changed to L-DMEM (5,5 mmol/L glucose) + 5% FCS + 10 mM nicotinamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) + 1 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen Co, Grand Island,

USA) for 7 days. In the last 7 days cells were cultured with the same media added of 10 nM exendin-4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). *Immunofluorescence*: cells from isolated clusters were disaggregated with trypsin, resuspended in PBS and deposited onto positively charged glass slides by cytospin centrifugation. Cells were fixed with 4% PFA, permeabilized with 1% Triton and incubated for 2h with primary antibodies against insulin and glucagon (Abcam PLC, Cambridge, UK), followed by secondary Texas Red (for anti-insulin) or FITC (for anti-glucagon) conjugated antibody (Abcam PLC, Cambridge, UK). Controls were performed under absence of the primary antibody incubation. Nuclei were stained with DAPI. Slides were examined on a Nikon Eclipse E600 microscope.

Results

Cells isolated from the human adipose tissue were mostly MSC as confirmed by FACS (CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD166+, CD14-, CD31-, CD34- and CD45-) and cytochemistry (differentiated into adipogenic and osteogenic lineages). After 2 months treatment with high glucose differentiation media, MSC in adherent cultures started to form cell clusters with an islet-like appearance, and generally after 4 months treatment only clusters remained in culture. Immunofluorescence microscopy with cells obtained from these clusters showed production of insulin although glucagon was not expressed (Figure 1).

Discussion

Mesenchymal stem cells from human adipose tissue are an interesting source for the generation of cells with β -cell properties, due to its ease of isolation, expansion and differentiation capacity. Adipose tissue can be obtained in large amounts from dermolipectomy and lipoaspiration procedures. MSCs from human adipose tissue have shown capacity to differentiate in vitro into insulin producing cells.⁵⁻⁷ In this work we intended to isolate MSC from the human adipose tissue and promote its in vitro expansion and differentiation into cells with a pancreatic endocrine phenotype. We used a very simple protocol that has already been employed with success to promote the differentiation of rat bone marrow MSC into insulin-producing cells. In our conditions, after 2 months treatment the MSC cultures began to form cell clusters and acquire an islet-like morphology. After 4 months treatment the cells were able to

produce the insulin hormone, as shown by immunofluorescence microscopy. Insulin expression will be confirmed by qPCR. However, differentiation into a β -cell phenotype was incomplete as glucagon was not produced, showing that the protocol employed with these cells still needs some improvements.

References

1. Di Gioacchino G, Di Campli C, Zocco MA, et al. Transdifferentiation of stem cells in pancreatic cells: state of the art. *Transplant Proc* 2005; 37(6):2662-3.
2. Pawitan JA. Prospect of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Cell & Tissue Transplantation & Therapy* 2009; 2:7-9.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-7.
4. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 2004; 53(7):1721-32.
5. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341(4):1135-40.
6. Trivedi HL, Vanikar AV, Thakker U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells combined with hematopoietic stem cell transplantation synthesize insulin. *Transplant Proc* 2008; 40(4):1135-9.
7. Okura H, Komoda H, Fumimoto Y, et al. Transdifferentiation of human adipose tissue-derived stromal cells into insulin-producing clusters. *J Artif Organs* 2009; 12(2):123-30.

Figure 1. Immunofluorescence microscopy of human adipose tissue MSCs induced to differentiate during 4 months into a pancreatic endocrine phenotype. Panel A: negative control. Panel B: anti-insulin antibody + TR conjugated antibody. Nuclei stained with DAPI. (400X)