

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

**CARLA CORRADI PERINI**

**COTRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS XENOGÊNICAS NA  
PREVENÇÃO DA REJEIÇÃO NO TRANSPLANTE DE ILHOTAS**

**CURITIBA**

**2013**

**CARLA CORRADI PERINI**

**COTRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS XENOGÊNICAS NA  
PREVENÇÃO DA REJEIÇÃO NO TRANSPLANTE DE ILHOTAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Área de concentração: Engenharia e Transplante Celular, da Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Carlos Riella  
Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita; Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Camara.

**CURITIBA**

**2013**

*Dedico este trabalho aos meus pais Enzo e*

*Amelia, verdadeiros mestres de vida.*

*Ao meu esposo Ronald, pelo apoio e amor*

*incondicionais fundamentais nesta trajetória.*

*Aos meus filhos, Carolina e Enzo, que são*

*a razão do meu viver.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Miguel Carlos Riella, obrigada pela confiança, por ter acreditado e valorizado o meu trabalho desde o início.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita, que com sua paciência e constante presença ao longo de todos esses anos, me conduziu nesta trajetória. Suas orientações foram fundamentais para a conclusão deste trabalho e para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, pela acolhida em São Paulo dispondo de seu tempo para meu aprendizado, pelas valiosas contribuições sobre imunologia, e principalmente pela doação dos camundongos NOD, fundamentais para esta pesquisa.

Ao Dr. Fernando Henrique Lojudice da Silva por sua disponibilidade em ensinar as técnicas do transplante de ilhotas e pelas valiosas sugestões que enriqueceram este trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Santos Sotomaior, por compartilhar de forma atenciosa seu rico conhecimento em biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman, por ter cedido seu laboratório para meus experimentos, assim como a toda sua equipe, Alexandra, Carmem, Paula e principalmente, Fabiane, pelos inúmeros favores.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Novais Moreno e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene Elifio Esposito, que a partir das inúmeras sugestões na banca de qualificação, contribuíram para a redação final deste trabalho.

À minha querida amiga Thatiana Mara dos Santos, obrigada pela indescritível ajuda no desenvolvimento deste trabalho, abdicando de sua família e noivo, nos finais de semana, para me auxiliar nos transplantes. Mas, sobretudo, obrigada pelo otimismo e força, nos momentos de insucesso nos experimentos.

À minha querida amiga Patricia Eugênia González Jara, não apenas por compartilhar seu conhecimento, mas também tornar o ambiente do laboratório agradável e divertido.

À Irenice Cairo da Silva, que faz os maiores problemas se transformarem em pequenos detalhes. Obrigada por todo o apoio técnico e emocional, que facilitaram o desenvolvimento desta pesquisa.

À Marisa Inês Corradi, por compartilhar seu conhecimento em qualidade de processos e esterilização.

À Elaine Doff Sotta, por compartilhar seu conhecimento em transplante de ilhotas.

À Mariana Lopes, pelo auxílio nos experimentos e principalmente, pela ajuda no cuidado aos animais pré e pós transplante.

Ao Julio Francisco, pelo auxílio em vários momentos do desenvolvimento dos experimentos, compartilhando seu conhecimento sobre técnica operatória.

Ao Raphael Zotz, por compartilhar comigo seu conhecimento sobre o manejo dos animais.

Às colegas Geovana Brotto Ramos, Laire Schidlowski Ferreira, Wilian Macedo e Mônica Sauer pelo importante auxílio nos experimentos de PCR em tempo real.

Aos colegas de laboratório, Aline, Ana Luiza, Karina, Kharol, Daniel, João, Marizete, por fazerem parte dos melhores momentos desta jornada.

Ao CNPq (Processo N<sup>o</sup> 473473/2007-0), à Fundação Araucária (Convênio n<sup>o</sup>. 297/2007; Protocolo n<sup>o</sup>. 9209) e à Fundação Pró-Renal, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho.

Meu agradecimento especial a Deus, fonte de toda força e luz, importantes nesta longa jornada.

*O futuro pertence àqueles que acreditam na  
beleza de seus sonhos*

*Eleanor Roosevelt*

## RESUMO

**Introdução:** Células-tronco mesenquimais (CTM) têm gerado uma grande perspectiva no campo da medicina regenerativa, e também no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes na última década, devido às suas propriedades imunomodulatórias e anti-inflamatórias. **Objetivo:** Avaliar o efeito do cotransplante de ilhotas e CTM xenogênicas na prevenção da rejeição ou tolerância ao transplante de ilhotas em camundongos diabéticos (*non-obese diabetic*, NOD). **Métodos:** As CTM da medula de ratos Wistar foram isoladas e expandidas em culturas *in vitro*. Para comprovar a origem mesenquimal, as células foram caracterizadas quanto ao fenótipo de antígenos de superfície e capacidade de diferenciação em linhagens mesenquimais. As ilhotas de ratos Wistar foram isoladas e purificadas em gradiente de ficol. Dezesesseis camundongos NOD, com diabetes confirmado (glicemia >200 mg/dl), foram divididos em três grupos: (1) NOD que receberam o cotransplante de ilhotas e células-tronco mesenquimais (IP+CTM) isoladas de ratos; (2) NOD transplantados com ilhotas (IP); e (3) NOD que não foram submetidos ao transplante (controle). As células foram transplantadas sob a cápsula renal e os animais não foram submetidos à imunossupressão. A glicemia foi monitorada e no 4º dia pós transplante, os animais foram submetidos à nefrectomia. A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para avaliar a expressão de marcadores da capacidade funcional das ilhotas, e marcadores inflamatórios, de rejeição e tolerância ao transplante, no tecido renal, utilizando os primers para detectar insulina, glucagon, fator de transcrição nuclear Foxp3, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucinas (IL) 1, 4, 6 e 10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). **Resultados:** O fenótipo de CTM foi confirmado por sua diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos, e por sua expressão de CD29 (96,6 $\pm$ 2,3%) e CD73 (82,4 $\pm$ 3,6%), e baixa expressão do marcador de célula hematopoiética CD 45 (10,2 $\pm$ 1,8%). Não houve diferença na glicemia entre os grupos 'IP' (n=5) e 'IP+CTM' (n=5), no período pré-transplante (472,4 $\pm$ 138,3 e 434,7 $\pm$ 126,1 mg/dl; respectivamente) e 24 horas após (398,8 $\pm$ 125,2 e 323,4 $\pm$ 112,6 mg/dl; respectivamente). Entretanto, após 6 horas do transplante, o grupo 'IP+CTM' apresentou uma redução significativa da glicemia quando comparado ao pré-transplante ( $p=0,0009$ ), além disso, apresentou níveis glicêmicos significativamente menores que o grupo 'IP' ( $p=0,002$ ) no mesmo período (140,5 $\pm$ 38,2 e 369,2 $\pm$ 89,9 mg/dl, respectivamente). Os resultados de PCR em tempo real demonstraram expressão relativa de insulina e glucagon semelhante nos grupos 'IP+CTM' e 'IP'. Foi observada uma menor expressão pelo grupo 'IP+CTM' quando comparado ao 'IP' para os marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$  (9,90 $\pm$ 0,12 vs. 13,40 $\pm$ 0,57;  $p=0,01$ ), MCP-1 (9,00 $\pm$ 1,80 vs. 51,30 $\pm$ 6,80;  $p=0,01$ ) e IL-1 $\beta$  (6,80 $\pm$ 1,00 vs. 16,25 $\pm$ 1,65;  $p=0,04$ ). Quando comparados os valores de expressão dos marcadores de tolerância imunológica, observa-se que os animais que receberam o cotransplante apresentaram uma expressão significativamente maior que o grupo 'IP' de IL-4 (25,60 $\pm$ 1,96 vs. 2,80 $\pm$ 0,20,  $p=0,004$ ), IL-10 (188,40 $\pm$ 4,60 vs. 4,55 $\pm$ 0,12,  $p=0,0001$ ) e Foxp3 (34, 20 $\pm$ 1,3 vs. 1,30 $\pm$ 0,2,  $p=0,004$ ). **Conclusão:** Esses resultados sugerem uma ação imunomoduladora das CTM no xenotransplante de ilhotas sugerindo que essas células-tronco têm potencial para amenizar as perdas de enxertos, nas primeiras horas, devido à regulação do processo inflamatório do transplante.

**Palavras-chave:** Imunomodulação. Célula-tronco mesenquimal. Transplante de ilhotas. Tolerância imunológica.

## ABSTRACT

**Introduction:** Mesenchymal stem cells (MSC) have generated a great perspective in the field of regenerative medicine, and also in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases in the past decade due to their immunomodulatory and anti-inflammatory properties. **Objective:** To evaluate the effect of xenogeneic MSC and islets co-transplantation in preventing rejection or tolerance to islet transplantation in non-obese diabetic (NOD) mice. **Methods:** MSC obtained from Wistar rats were isolated and expanded in vitro. Mesenchymal cells were characterized by surface antigens expression, and ability to differentiate into mesenchymal lineages. Wistar rat islets were isolated and purified on ficoll gradient. The NOD mice with confirmed diabetes (blood glucose > 200 mg/dl) were divided into three groups: (1) NOD receiving co-transplantation of pancreatic islet and mesenchymal stem cells (PI + MSC), (2) NOD transplanted with islets (PI), and (3) NOD that were not undergoing transplantation (control). The cells were transplanted under the kidney capsule and the animals were not subjected to immunosuppression. Blood glucose was monitored for 3 days, and on the 4th day after transplantation, the animals underwent nephrectomy. The real time PCR technique was used to assess the expression of markers of the islets functional capacity, and inflammatory, rejection and tolerance markers to the transplantation on the renal tissue. It was using primers to detect insulin, glucagon, nuclear transcription factor Foxp3, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukins (IL) 1, 4, 6 and 10, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1). **Results:** The phenotype of MSC was confirmed by the differentiation into osteocytes, adipocytes and chondrocytes, and by their expression of CD29 (96.6 $\pm$ 2.3%) and CD73 (82.4 $\pm$ 3.6%), and low expression of hematopoietic cell marker CD 45 (10.2 $\pm$ 1.8%). There was no difference in blood glucose between groups 'IP' and 'IP + MSC' in the pre-transplant period (472.4 $\pm$ 138.3 and 434.7 $\pm$ 126.1 mg/dl, respectively) and 24 hours (398.8 $\pm$ 140.5 and 323.4 $\pm$ 112.6 mg/dl, respectively). However, after 6 hours from the transplantation, group 'IP + MSC' showed a significant ( $p=0.0009$ ) reduction in blood glucose compared to pre-transplantation, and also showed blood glucose levels significantly lower ( $p=0.002$ ) than the groups 'IP' in the same period (140.5 $\pm$ 38.2 e 369.2 $\pm$ 89.9 mg/dl, respectively). The real-time PCR results demonstrated a similar expression of insulin and glucagon in 'IP + MSC' and 'IP' groups. We observed a lower expression by the group 'IP + MSC' compared to 'IP' for the inflammatory markers, such as, TNF- $\alpha$  (9.90 $\pm$ 0.12 vs. 13.40 $\pm$ 0.57,  $p=0.01$ ), MCP-1 (9.00 $\pm$ 1.80 vs. 51.30 $\pm$ 6.80,  $p=0.01$ ) and IL-1 $\beta$  (6.80 $\pm$ 1.00 vs. 16.2 $\pm$ 1.65,  $p=0.04$ ). Comparing the values of immune tolerance markers expression between groups 'IP+CTM' and 'IP' it is noted that animals receiving the cotransplante showed a significantly higher expression than the group 'IP' of IL-4 (25.60 $\pm$ 1.96 vs. 2.80 $\pm$ 0.20,  $p=0.004$ ), IL-10 (188.40 $\pm$ 4.60 vs. 4.55 $\pm$ 0.12,  $p=0.0001$ ) and Foxp3 (34.20 $\pm$ 1.3 vs. 1.30 $\pm$ 0.2, respectively,  $p=0.004$ ). **Conclusion:** These results suggest an immunomodulatory action of mesenchymal stem cells in islet xenotransplantation suggesting that these stem cells have the potential to mitigate the early losses of grafts, due to the regulation of the inflammatory process of transplantation.

**Key-words:** Immunomodulation. Mesenchymal stem cell. Islet transplantation. Immunological tolerance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas do transplante de ilhotas com propostas que estão sendo exploradas em todo o mundo para otimização do procedimento, objetivando melhorar o regime de imunossupressão, a sobrevida do enxerto e a tolerância imunológica às ilhotas implantadas.....	20
Figura 2 – Vias de apoptose das ilhotas pancreáticas transplantadas.....	22
Figura 3 – Mecanismos de ação das células-tronco mesenquimais (CTM) .....	28
Figura 4 – Mecanismos de imunomodulação das células-tronco mesenquimais (CTM) em várias células do sistema imunológico .....	29
Figura 5 – Roteiro das etapas de isolamento, cultivo e caracterização das células-tronco mesenquimais. ....	40
Figura 6 – Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos Wistar no 4º. subcultivo .....	53
Figura 7 – Diferenciação das células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea de rato em adipócitos, osteócitos e condrócitos.....	54
Figura 8 – Níveis glicêmicos (mg/dl) dos camundongos diabéticos não-obesos (NOD) pré e pós-transplante .....	55
Figura 9 – Expressão dos genes de insulina e glucagon. ....	58
Figura 10 – Expressão dos genes de marcadores pró-inflamatórios. ....	59
Figura 11 – Expressão do gene da Interleucina-6.....	60
Figura 12 – Expressão dos genes das citocinas anti-inflamatórias e do fator de transcrição nuclear Foxp3 .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais (anti-rato) utilizados nos experimentos de fenotipagem das CTM por citometria de fluxo .....	41
Tabela 2 - Genes analisados por PCR em tempo real nas amostras das secções renais e suas respectivas seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) utilizados. ....	48
Tabela 3 - Expressão do gene GAPDH nas diferentes amostras pela técnica de PCR em tempo real.. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Grupos de Diferenciação Celular
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CMRL	Meio basal para cultivo de ilhotas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
CTM	Célula-tronco Mesenquimal
DM	Diabetes mellitus
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DM1	Diabetes mellitus do tipo 1
DMEM	Meio Dulbecco modificado Eagle
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
FACS	Separação de células ativadas por fluorescência
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Foxp3	Fator nuclear de transcrição <i>fork head box p3</i>
H-DMEM	Meio Dulbecco modificado – alta glicose
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HLA	Antígenos de Histocompatibilidade Humano
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenase
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
NO	Óxido nítrico
LADA	Diabetes autoimune latente em adultos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PD-1	Proteína 1 de morte celular programada
PD-L1	Proteína 1 ligante de morte celular programada
PE	Ficoeritrina

PGE-2	Prostaglandina E2
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundos
SFB	Soro Fetal Bovino
TA	Temperatura Ambiente
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TGF	Fator de transformação do crescimento
TNF- $\alpha$ .	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Linfócito T regulador
x g	Força centrífuga relativa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 1 (DM1).....	16
1.1.1 <b>Terapia celular no DM1</b> .....	<b>18</b>
1.1.2 <b>Inflamação, rejeição imunológica e apoptose das ilhotas transplantadas</b> .....	<b>21</b>
1.1.3 <b>Células-tronco (CT)</b> .....	<b>23</b>
1.1.4 <b>Células-tronco mesenquimais (CTM)</b> .....	<b>24</b>
1.1.5 <b>Propriedades imunorregulatórias das CTM</b> .....	<b>27</b>
2.1 OBJETIVOS.....	36
2.1.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	<b>36</b>
2.1.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>36</b>
<b>3 MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 ANIMAIS .....	38
3.2 ISOLAMENTO, CULTIVO E EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS.....	39
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS .....	40
3.3.1 <b>Análise de marcadores de superfície</b> .....	<b>40</b>
3.3.2 <b>Ensaio de diferenciação <i>in vitro</i></b> .....	<b>42</b>
3.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS.....	43
3.5 COTRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E ILHOTAS PANCREÁTICAS .....	44
3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL .....	45
3.6.1 <b>Extração e Purificação de RNA</b> .....	<b>46</b>
3.6.2 <b>Síntese de cDNA</b> .....	<b>46</b>
3.6.3 <b>PCR em Tempo Real</b> .....	<b>47</b>
3.6.4 <b>Análise dos resultados da PCR em Tempo Real</b> .....	<b>49</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS .....	52
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	52
4.2.1 <b>Imunofenotipagem</b> .....	<b>52</b>
4.2.2 <b>Citoquímica</b> .....	<b>53</b>
4.3 EFEITO DO COTRANSPLANTE DE ILHOTAS E CTM NA GLICEMIA.....	54

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE INSULINA E GLUCAGON E DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, REJEIÇÃO E TOLERÂNCIA AO TRANSPLANTE DE ILHOTAS.....	56
<b>4.4.1 Expressão do GAPDH como controle endógeno.....</b>	<b>56</b>
<b>4.4.2 Expressão de insulina e glucagon .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4.3 Expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas .....</b>	<b>58</b>
<b>4.4.4 Expressão de Interleucina-6 .....</b>	<b>60</b>
<b>4.4.5 Expressão de citocinas anti-inflamatórias e do fator nuclear Foxp3.....</b>	<b>61</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

# *Introdução.*

---

## 1 INTRODUÇÃO

*Diabetes mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009). A classificação atual do DM baseia-se na etiologia, sendo proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (1) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) (2) a utilização de quatro classes clínicas: a) DM tipo 1 (DM1), b) DM tipo 2 (DM2), c) outros tipos específicos de DM, e d) diabetes gestacional.

O DM é um grave problema de saúde pública tanto pela prevalência quanto pelas complicações crônicas que se desenvolvem nos pacientes. Essa prevalência vem aumentando devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como à maior sobrevivência de pacientes com DM (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009), estimando-se que em 2030 existam 300 milhões de diabéticos no mundo. Nos países em desenvolvimento, a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (3). No Brasil, segundo estimativas de 1996, o DM atingia aproximadamente 5,5 milhões de pessoas (4).

Aproximadamente 5% das causas de mortes a cada ano em nível mundial são atribuídas ao DM. Dados brasileiros de 2010 mostram que as taxas de mortalidade por DM (por 100 mil habitantes) apresentam acentuado aumento com a idade, variando de 0,5 para a faixa etária de 0 a 29 anos a 213,4 para a de 60 anos ou mais (BRASIL, 2010).

Embora o DM1 corresponda a apenas 5% a 10% de todos os casos 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 periférica e autonômica e doença renal crônica. A sobrevivência tem aumentado significativamente o que favorece o surgimento das complicações crônicas, com custos econômicos e sociais elevados.

## 1.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1)

DM1 resulta da destruição de células  $\beta$  pancreáticas com consequente deficiência de insulina, na maioria dos casos mediada por autoimunidade. Apesar de a etiologia ser pouco documentada, vários estudos mostram que uma predisposição genética, em conjunto com fatores ambientais, desencadeiam esse processo autoimune (5, 6). Entretanto, em alguns casos não há evidências de processo autoimune, sendo, então considerada uma forma idiopática de DM1 (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

Os marcadores de autoimunidade são os autoanticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65) e antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2B), que podem estar presentes na fase pré-clínica da doença ou quando já se detecta a hiperglicemia (7-10).

A destruição das células  $\beta$  é geralmente mais rápida nas crianças, ocorrendo nos adultos a forma lentamente progressiva, referida como diabetes autoimune latente em adultos (LADA, do inglês *latent autoimmune diabetes in adults*), que apresenta características semelhantes aos pacientes diabéticos tipo 2, mas é positivo para marcadores de autoimunidade (11, 12).

Em geral, quando pacientes são diagnosticados com a doença, entre 60% e 80% de suas células  $\beta$  já foram destruídas. Nessa fase, os sinais e sintomas que antes eram praticamente ausentes ou intermitentes se manifestam de maneira constante, tais como poliúria, polidipsia, polifagia, astenia e perda de peso, fazendo com que o indivíduo necessite de injeções subcutâneas diárias de insulina para um bom controle metabólico, caracterizando o tratamento convencional (13).

Os protocolos mais modernos vêm introduzindo esquemas intensivos de reposição insulínica, 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. O estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) mostrou que o tratamento intensivo de DM1, que compreende três ou mais doses de insulina, é eficaz em reduzir a frequência de complicações crônicas do DM1 quando comparado ao tratamento convencional (14). 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 complicações crônicas graves como a nefropatia, retinopatia e neuropatia (15, 16).

As quantidades de insulina devem ser proporcionais à quantidade de glicose presente no sangue a cada momento, para que episódios agudos de hipoglicemia ou complicações crônicas resultantes de hiperglicemia sejam evitados. Ainda que os resultados obtidos nos últimos anos tenham estabelecido com certeza que o controle metabólico adequado no DM1 (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  $\beta$ . Até o presente, sabe-se que as únicas células capazes de perceber a quantidade de glicose sanguínea e de converter esta informação em uma adequada secreção de insulina são as células  $\beta$  encontradas nas intactas ilhotas de Langerhans.

Neste contexto, o transplante de pâncreas é o único tratamento que consegue restaurar a normoglicemia em longo prazo. Transplantes de pâncreas alogênicos vêm sendo realizados frequentemente, 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 (17), e pode ser oferecido apenas a um número limitado de pacientes. 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, se contemplam 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 alogênico é a única que tem aplicação clínica atualmente, e possibilita a reconstituição do padrão fisiológico de secreção de insulina e do controle glicêmico (17). 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. Entretanto, esse tratamento ainda tem alguns obstáculos, como as baixas taxas de ilhotas isoladas, dificuldade em se obter independência insulínica por longo prazo, e também efeitos adversos relacionados ao uso de imunossupressores (18).

### 1.1.1 Terapia celular no DM1

A reposição das células  $\beta$  através do transplante de ilhotas foi originalmente proposto por Paul Lacy (19) e apesar dos vários avanços na técnica de transplante no que diz respeito à obtenção de células viáveis e funcionalmente intactas através do aprimoramento no isolamento de ilhotas, este procedimento é ainda limitado devido ao pequeno número de doadores e ao risco de rejeição (20).

O transplante de ilhotas isoladas de doadores cadavéricos vem se firmando, graças aos resultados do estudo de Shapiro e colaboradores (21). 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 (22).

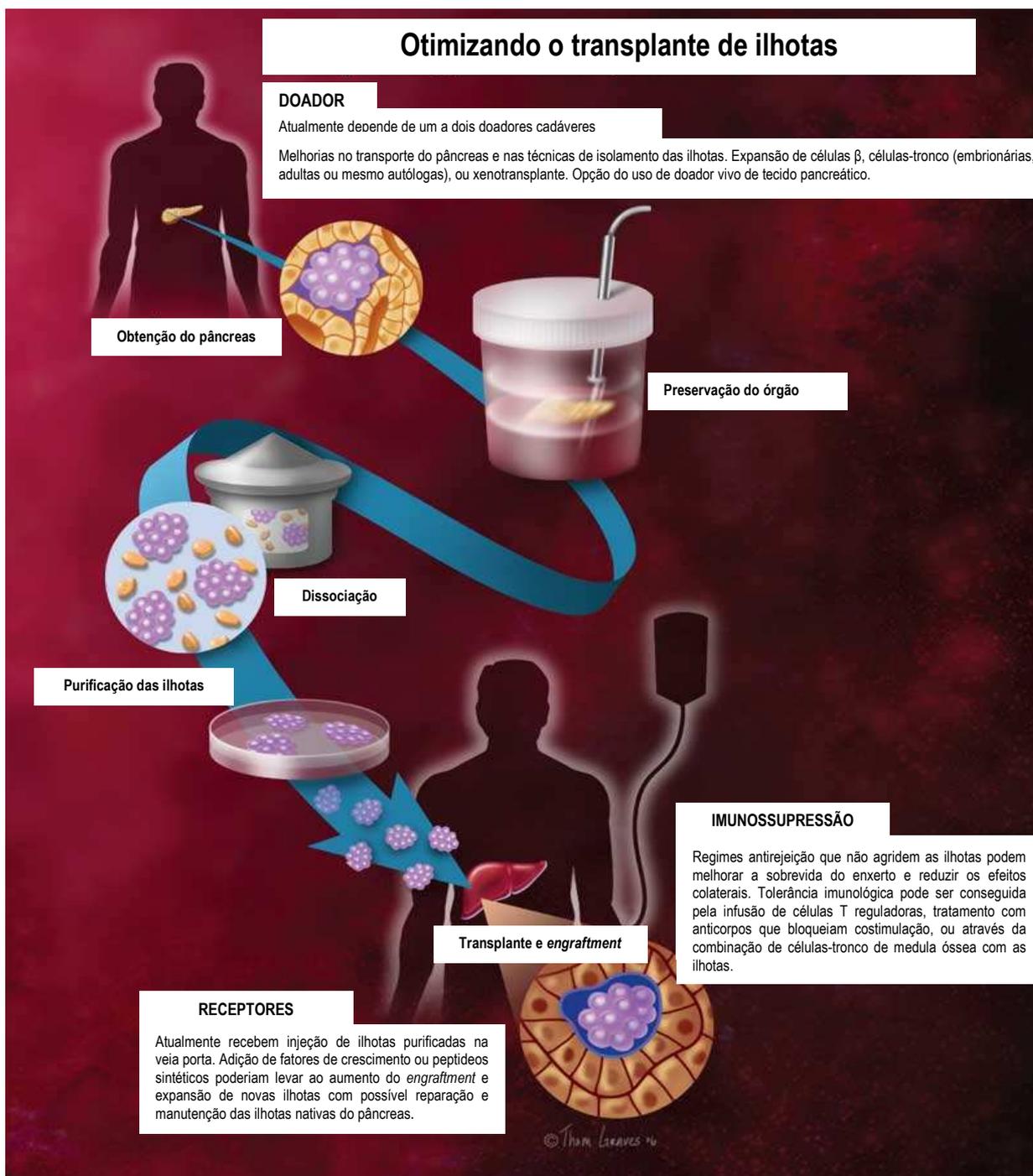
Na América do Norte, o número de centros que realizam transplantes clínicos de ilhotas e o número total de transplantes de ilhotas diminuiu em 2006-2007, com um ressurgimento em 2008. As razões para o declínio provavelmente estejam relacionadas às mudanças na produção e disponibilidade das enzimas utilizadas para a digestão das ilhotas; à motivação em relação aos resultados clínicos de independência insulínica a longo prazo (21, 23, 24); à preocupação com efeitos de imunossupressão sobre a função renal de receptores do transplante de ilhotas isolado (25, 26); e à preocupação com o risco de sensibilização ao HLA do doador (27-29). No entanto, com o início de novos protocolos CIT (do inglês *Clinical Islet Transplantation Consortium*), em 2008, associado aos promissores resultados com protocolos inovadores utilizando depleção de células T associados a inibidores de citocinas para a indução da imunossupressão (30, 31), o número de receptores do transplante de ilhotas tem aumentado anualmente.

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 (32).

Entretanto, além do limitado número de doadores e o risco de rejeição citados anteriormente, é constatado que nem todos os pacientes atingem a independência insulínica, o que pode ser resultado de um baixo número de ilhotas implantadas ou ainda, uma grande perda durante o processo de isolamento e purificação devido às técnicas utilizadas, e fatores como hipóxia e inflamação durante o período de “pega” do enxerto (ou *engraftment*, em inglês) que resultam em perda da função das ilhotas (33-36).

Atualmente, têm sido propostas várias estratégias para melhorar o resultado final do transplante, garantindo uma sobrevida maior das ilhotas transplantadas e independência insulínica por tempo prolongado. Essas estratégias devem envolver todos os processos do transplante, desde a adequada captação e manutenção de órgãos até os protocolos que visem minimizar a inflamação sistêmica e no local do transplante, e ainda estratégias para induzir tolerância ao enxerto (Figura 1) (37).

Entretanto, pelo fato de ainda 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 frequentes 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.



O regime de drogas imunossupressoras necessário para proteger as ilhotas de uma resposta imune recorrente e alorrejeição podem causar efeitos adversos comuns, mesmo com as doses mínimas utilizadas no período de manutenção. Condições clínicas agudas comumente observadas tais como anemia e diarreia, e mais tardiamente hipertensão, hiperlipidemia, alterações do sistema nervoso central e dano irreversível da função renal são documentados (38). Além disso, alguns agentes imunossupressores ainda utilizados em transplantes estão relacionados

diretamente com resistência à insulina e/ou diminuição da função das células  $\beta$ , podendo então contribuir para a perda da função do enxerto (39).

### **1.1.2 Inflamação, rejeição imunológica e apoptose das ilhotas transplantadas**

A rejeição imunológica, assim como a perda da função do enxerto a curto e longo prazo são obstáculos para o sucesso do transplante de ilhotas (40). Esses obstáculos podem ser acentuados por características peculiares a esse transplante, pois trata-se de um enxerto de células não vascularizadas e que são colocadas em um local heterotópico (41), cujos pacientes receptores são pré-sensibilizados por possuírem autoanticorpos que deram origem ao DM1 (42).

Apesar da imunossupressão, que combina daclizumab, sirolimus, e tacrolimus (43), um significativo número de ilhotas transplantadas são perdidas nos primeiros 10-14 dias após o transplante (44, 45). Os principais fatores que influenciam essa perda são a resposta imunológica inata e o estresse oxidativo a que as ilhotas são expostas desde a manutenção do pâncreas do doador, passando pelo processamento do órgão e cultivo das células, até o transplante (46).

Diferentes vias de sinalização podem ser desencadeadas durante estes processos, o que pode levar a lesão e morte das células  $\beta$  mediadas por citocinas. Muitas das citocinas, produzidas e secretadas pelas células inflamatórias que migram para o local do enxerto, são capazes de desencadear a perda de ilhotas tanto por necrose celular quanto por apoptose (47).

Uma citocina bastante conhecida por sua toxicidade sobre as ilhotas transplantadas é o Fator de Necrose Tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ). Além desta, a apoptose das células  $\beta$  pode ser induzida por Interleucina 1 beta ( $\text{IL-1}\beta$ ), como resultado de uma rede complexa de eventos de sinalização. Após a ligação do receptor,  $\text{IL-1}\beta$  inicia a sinalização intracelular dentro de segundos através da ativação de uma série de complexos protéicos, que por sua vez, ativam uma cascata de proteínas quinases levando à ativação de duas vias principais: fator nuclear  $\text{kB}$  ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ) e  $\text{MAPK}$  / c-jun N-terminal quinase ( $\text{JNK}$ ). A transdução de sinal por Interferon gama ( $\text{IFN-}\gamma$ ) é mais linear e envolve a ativação da quinase de Janus ( $\text{JAK}$ ), e membros da família de

transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT), induzindo a expressão de alguns genes que produzem mediadores inflamatórios, incluindo a óxido nítrico sintase induzida (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*), levando à produção intracelular e acúmulo de óxido nítrico, o que eventualmente leva a ativação do programa apoptótico (48) (Figura 2).

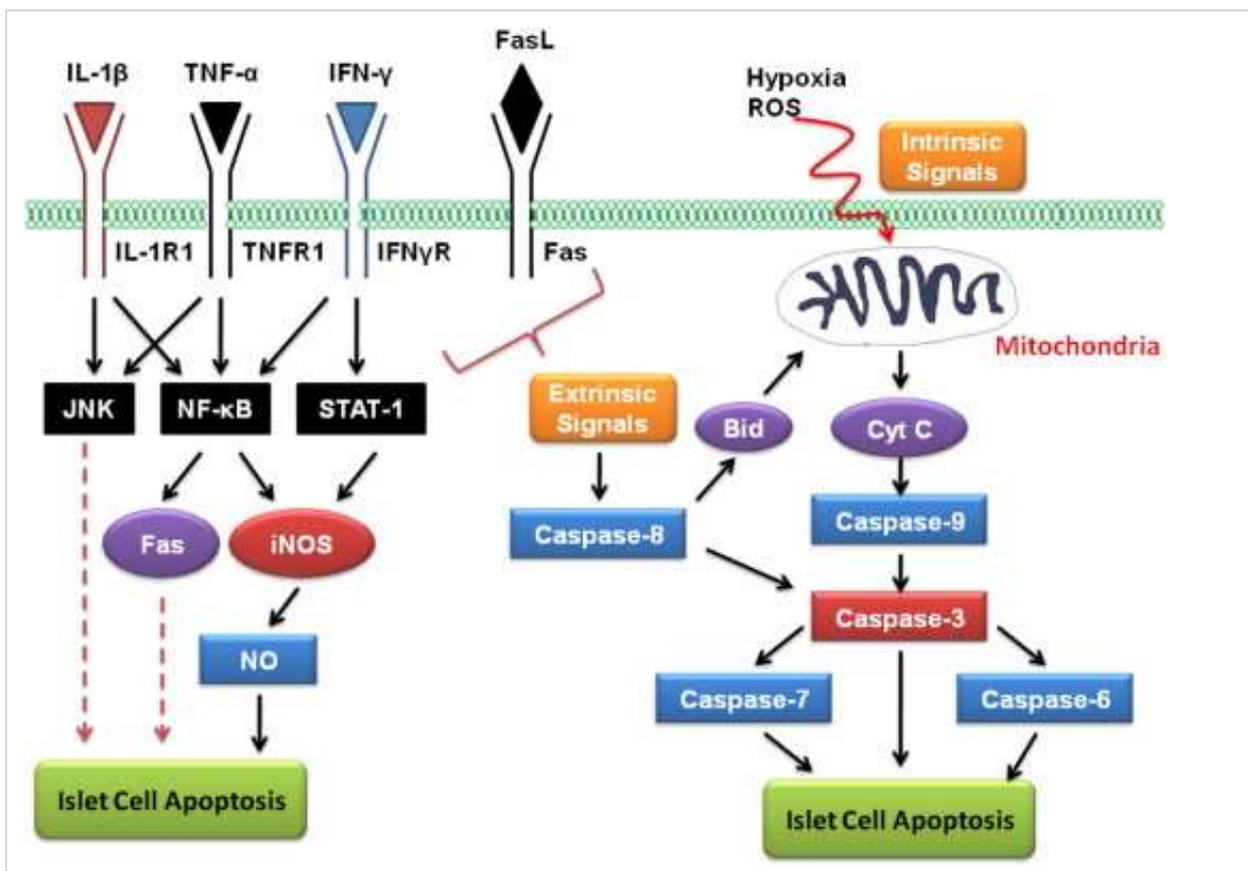


Figura 2. Vias de apoptose das ilhotas pancreáticas transplantadas (49).

Outro mecanismo de destruição dessas células é a partir da hipóxia, criando um ambiente de estresse oxidativo, com ativação de uma cascata enzimática levando à apoptose das ilhotas (50).

Apoptose é uma forma de morte celular programada classicamente descrita por alterações morfológicas que incluem o arredondamento das células, alterações da membrana e da estrutura do citoesqueleto, e fragmentação do DNA. Essas alterações ocorrem através das ações bioquímicas de uma família de proteases denominadas caspases, que estão geralmente presentes como zimogênios inativos que requerem processamento proteolítico para tornarem-se ativas. Ativação de

caspases executoras, tais como caspase-3, resulta do processamento de caspases iniciadoras (por exemplo, caspase 8 e 9), em resposta a um sinal, tal como danos no DNA (51), ou sinais extrínsecos, como a ativação do receptor de Fas a partir de seu ligante (Fas-L) na superfície celular (49). Parte deste processo de ativação das caspases baseia-se na liberação do citocromo c para o citoplasma, através de permeabilização de membranas mitocondriais (52). Uma vez que a cascata apoptótica foi iniciada, múltiplos alvos celulares são clivados por caspases executoras em uma forma altamente organizada, dependente de ATP (51) (Figura 2).

Muitos estudos relacionados ao transplante celular pretendem evitar a necessidade do tratamento imunossupressor, investigando estratégias baseadas no uso de métodos para separar fisicamente as ilhotas do sistema imunológico, por exemplo, o encapsulamento de ilhotas (53-55), técnica utilizada também no xenotransplante pré-clínico (56). Além disso, estratégias relacionadas à modificação das características imunogênicas do enxerto, envolvendo por exemplo, a indução de quimerismo alogênico usando células hematopoiéticas, como revisado por Balamurugan e colaboradores (42).

Ao minimizar o risco associado ao tratamento imunossupressor, seria clínica e eticamente aceitável realizar o transplante nas fases iniciais da doença para restaurar a normoglicemia desde o diagnóstico do DM1 e muito antes do aparecimento das complicações crônicas. Desta forma, faz-se necessário a identificação de fatores que modulem a resposta imunológica e induzam tolerância às ilhotas transplantadas nesses pacientes.

### **1.1.3 Células-tronco (CT)**

CT são células indiferenciadas, capazes de se autorrenovar, e quando estimuladas podem se diferenciar em tipos celulares especializados. De acordo com seu potencial de diferenciação, as CT podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes e multipotentes. CT totipotentes são o único tipo celular capaz de se diferenciar em todas as células especializadas e tecidos do organismo. Neste

sentido, os únicos exemplos de CT totipotentes são o zigoto e as células do estágio bem precoce do desenvolvimento embrionário, antes do estágio de blastocisto (57).

As células da massa interna do blastocisto, chamadas de CT embrionárias são o principal exemplo de células pluripotentes. Estas podem ser isoladas e expandidas indefinidamente *in vitro* em um estado indiferenciado, mantendo sua capacidade de diferenciar-se em células dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma ou endoderma) ou em qualquer dos 200 tipos de células adultas (57, 58).

As CT multipotentes têm a capacidade de se diferenciar em um número limitado de células especializadas, e estão presentes em diferentes tecidos do corpo, sendo capazes de gerar células dos tecidos de que são provenientes. São exemplos de CT multipotentes, as células-tronco mesenquimais (CTM) provenientes da medula óssea e do sangue de cordão umbilical (59).

#### **1.1.4 Células-tronco mesenquimais (CTM)**

Um papel imunomodulador das células do estroma medular tem sido descrito por vários autores. Conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTM), são células progenitoras não hematopoiéticas encontradas em alguns tecidos adultos e estão sendo utilizadas como um interessante alvo na terapia celular e genética (60-62)

As CTM são capazes de se diferenciar em diferentes tecidos de origem mesenquimal (63, 64). São conhecidas também como células estromais da medula óssea (64, 65), e mais recentemente, como células estromais mesenquimais multipotentes (66). Foram inicialmente identificadas por Friedenstein e colaboradores, que definiram que são células aderentes, clonogênicas, não fagocíticas e as chamavam de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (67, 68).

CTM da medula óssea humana foram inicialmente isoladas pelo grupo de Caplan, e o mesmo grupo identificou os primeiros anticorpos monoclonais capazes de reconhecer os antígenos CD105 (do inglês *cluster of differentiation* 105) e CD73,

expressos na superfície das CTM (69). Desde então, CTM tem sido isoladas de várias outras fontes, incluindo sangue de cordão umbilical (70), tecido adiposo (71), cérebro (72), pele (73), cartilagem (74), músculo esquelético (75), músculo cardíaco (76), fígado (77) e rins (78), entretanto, a medula óssea é mais frequentemente utilizada.

Esta variedade de fontes de tecidos e de metodologias de preparo de células levanta a questão se as células resultantes são suficientemente similares para permitir uma comparação direta de propriedades biológicas relatadas e resultados de experimentos, especialmente no contexto de terapia celular. Portanto, o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cell Therapy*, estabeleceu critérios mínimos para definir CTM humanas, que são: (a) as células devem ter a capacidade de aderência a plástico quando em condições de cultivo padrão; (b) as células devem ser positivas para as moléculas de superfície CD105, CD73 and CD90, e negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR; e (c) elas devem ter capacidade funcional para se diferenciar *in vitro* em osteócitos, adipócitos e condrócitos (79).

CTM podem ser facilmente isoladas de aspirados de medula óssea usando centrifugação por gradiente de densidade, dos quais são retiradas as células de densidade mais baixa e se colocadas à baixa concentração, CTM aderem rapidamente ao plástico e podem ser separadas das células não aderentes e hematopoiéticas por lavagens repetidas (80).

CTM estão presentes em uma baixa frequência (uma célula mesenquimal em cada 100000 células da medula óssea adulta), e aproximadamente um terço das primeiras colônias estromais aderentes derivadas da medula óssea são multipotentes e capazes de se diferenciar sob condições de indução apropriadas (81).

Estudos têm demonstrado que CTM podem diferenciar-se em linhagens mesodermal como adipócitos, condrócitos, osteócitos (81), tecidos que dão suporte à hematopoiese (82, 83), miócitos (84, 85) e tenócitos (86). Além destas, podem também gerar células da linhagem ectodermal como célula epitelial (87), glial e neural (88), e da linhagem endodermal, como hepatócito (89) e ilhotas pancreáticas (90). Esta diferenciação *in vitro* das CTM em células de linhagens ectodermal e endodermal poderia, também, ser uma consequência do potencial intrínseco de diferenciação *in vivo* das CTM.

As condições para a diferenciação das células são de alguma forma dependentes da espécie e são influenciadas por variáveis não muito bem definidas, como, por exemplo, a quantidade de soro bovino fetal utilizada (64). Nutrientes basais, densidade celular, organização espacial, forças mecânicas, e fatores de crescimento e citocinas tem uma grande influência na diferenciação de CTM. Estas células cultivadas em cada condição de diferenciação podem também produzir fatores autócrinos ou parácrinos que são essenciais para a progressão da linhagem (81).

CTM podem ser expandidas até 40 gerações enquanto ainda mantém sua capacidade multipotente de linhagem mesenquimal, apesar das taxas de crescimento reduzidas com o aumento cumulativo de duplicações (do inglês *doublings*) (80, 91).

Essas células têm um espectro de receptores de superfície e integrinas, e secretam uma variedade de fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e proteínas de matriz extracelular (92). Sobretudo, mesmo que sejam criadas condições de cultivo semelhantes ao que é encontrado *in vivo*, isso não é suficiente para suprir todos os fatores extrínsecos providos pelo nicho de células-tronco na medula óssea. Portanto, um melhor entendimento da origem das CTM *in vivo* tem sido largamente desejado desde que se sabe que as CTM possuem um significativo potencial reparador e modulador imunológico.

CTM têm gerado uma grande perspectiva no campo da medicina regenerativa, e também no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes na última década. As propriedades imunomodulatórias e antiinflamatórias das CTM têm sido testadas em uma variedade de modelos animais e tem sido aplicada em situações clínicas específicas como na doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (93) e na insuficiência cardíaca (94). Adicionalmente, o papel das CTM tem sido estudado na esclerose múltipla e na esclerose lateral amiotrófica (95), no reparo de cartilagem (96), na lesão de medula espinhal (97), em doenças hepáticas (98), na sepse (99), nas doenças pulmonares (100), no diabetes tipo 1 (101-103), e na insuficiência renal aguda (104).

Da Silva Meirelles e colaboradores (105) correlacionaram as propriedades imunomodulatórias das CTM com sua localização perivascular. Eles correlacionam essas células com os pericitos, e apresentam um modelo onde as CTM estabilizam os vasos sanguíneos e contribuem para homeostasia de tecidos e do sistema

imunológico sob condições fisiológicas e assumem um papel mais ativo no reparo da lesão tecidual focal (105). Em resposta à lesão tecidual, CTM se direcionam ao local de lesão e estimulam o reparo através da produção de fatores tróficos, incluindo fatores de crescimento, citocinas e antioxidantes (106, 107), alguns dos quais proporcionam a base para sua capacidade de modular a resposta imunológica.

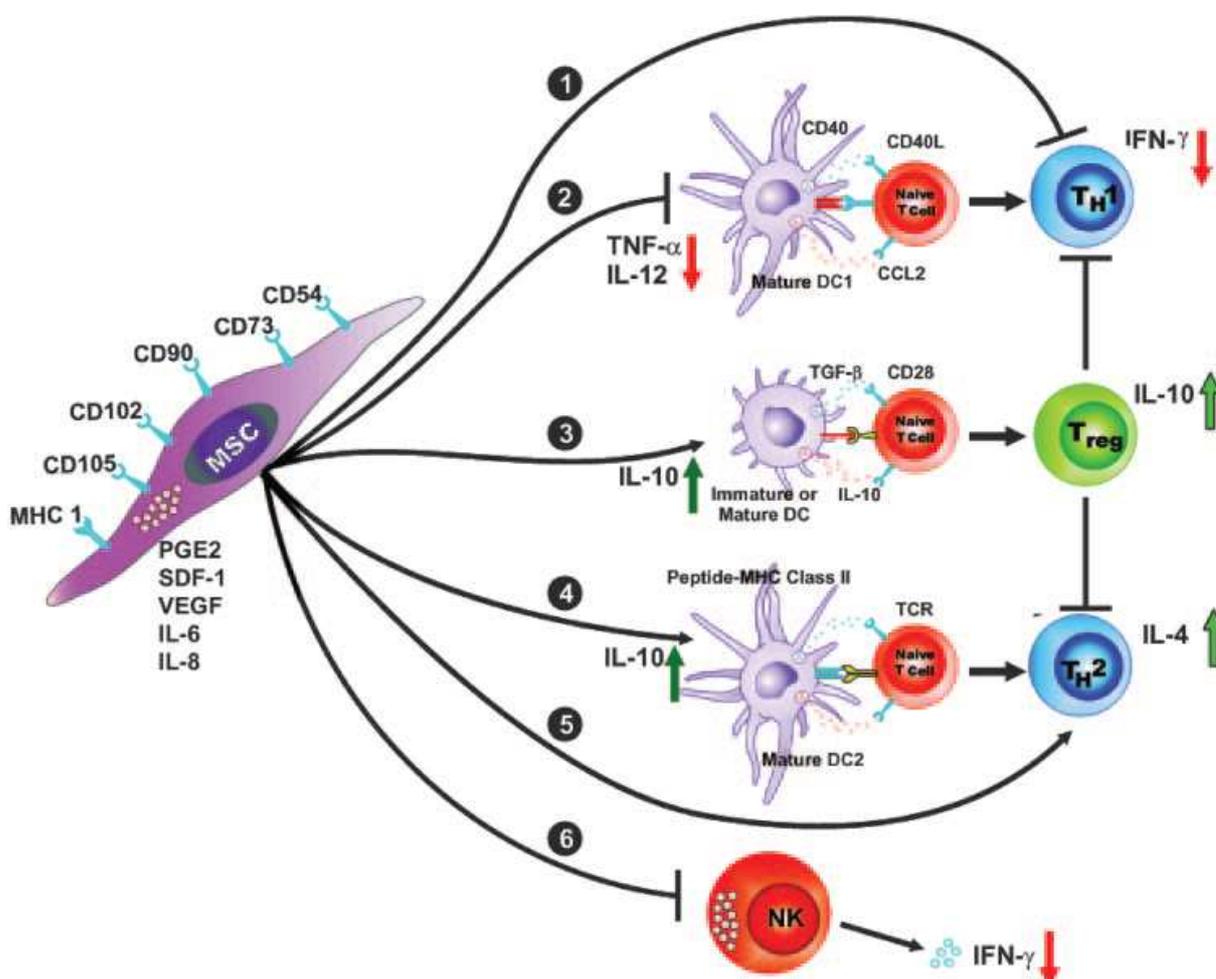
### 1.1.5 Propriedades imunorregulatórias das CTM

A natureza imunossupressora de CTM (108-110) é relevante para os transplantes alogênicos porque elas podem teoricamente reduzir a incidência da DECH e reduzir a rejeição pelo receptor. Alguns trabalhos de cotransplante de CTM e células hematopoiéticas mostraram resultados promissores em relação ao tratamento e prevenção da DECH (111).

Esta característica imunorregulatória parece estar relacionada com a inibição da proliferação linfocitária e da secreção de citocinas (112-114). Isso implica que CTM podem ter uma potente aplicação nos alotransplantes, podendo então melhorar a tolerância dos pacientes diabéticos aos alotransplantes de ilhotas pancreáticas, na expectativa de reduzir ou evitar o uso de imunossupressão.

As primeiras evidências das CTM na prevenção da rejeição imunológica foram observadas nos anos 90 a partir de pesquisas de transplante de CTM para pacientes com transplante de medula óssea. Desde então, as propriedades imunológicas das CTM tem sido demonstradas por vários grupos, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*, e em modelos animais e humanos.

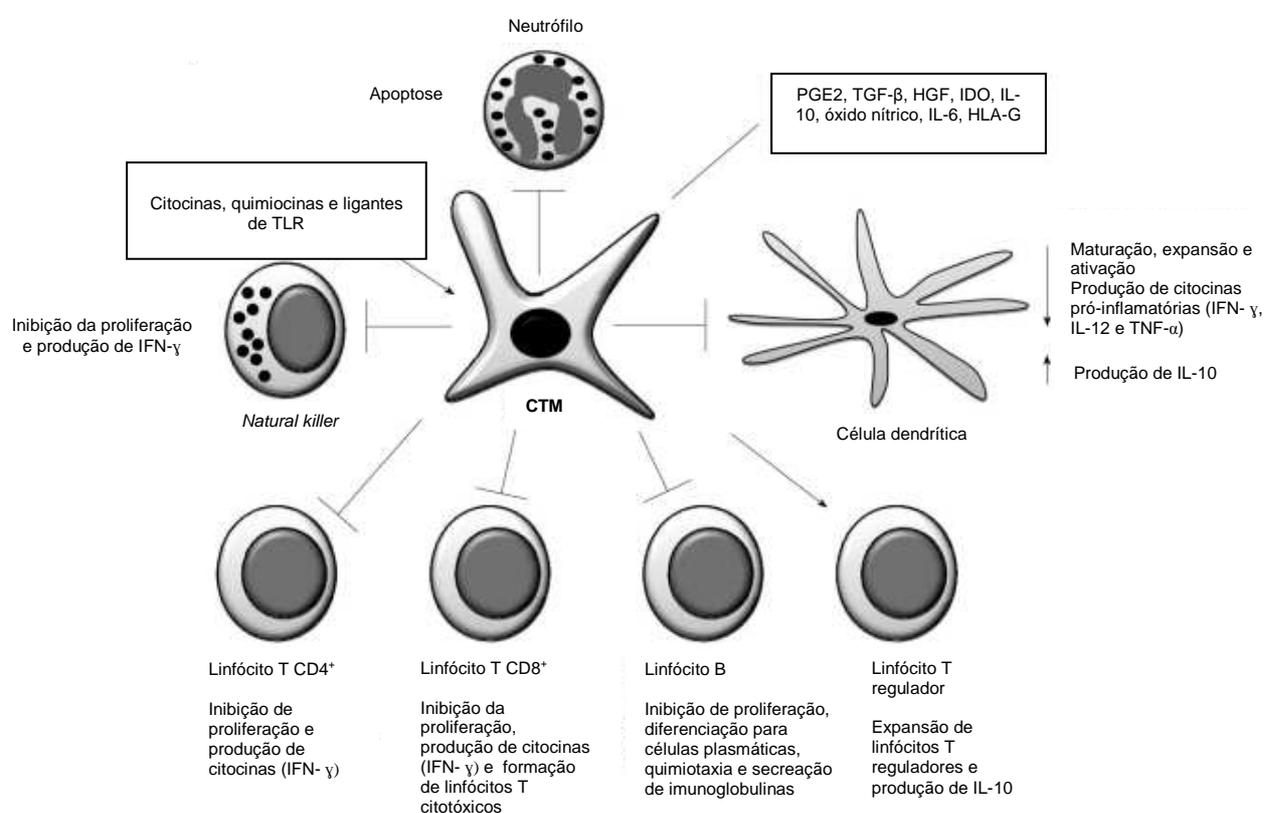
Os efeitos imunorregulatórios são atribuídos à interação de CTM com células de ambos os sistemas imunológicos inato e adaptativo. Tem sido demonstrado que as CTM são capazes de inibir a proliferação de linfócitos T e B, suprimir a atividade lítica de linfócitos T citotóxicos e células *natural killer* (NK), inibir a maturação e função da células dendríticas apresentadoras de antígenos e modular a função de macrófagos. Essas funções podem ser tanto dependentes de contato das CTM com essas células assim como pela ação de fatores secretados pelas CTM (Figura 3).



**Figura 3. Mecanismos de ação das células-tronco mesenquimais (CTM) proposto por Aggarwal e Pittenger (114).** CTM medeiam os seus efeitos imunomoduladores, interagindo com as células de ambos sistemas, inato (célula dendrítica, vias 2-4, sistemas de células *natural killer*, via 6) e adaptativo (imunidade de células T, as vias 1 e 5). Inibição de  $\text{TNF-}\alpha$ , secreção e estímulo da secreção de IL-10 pode afetar o estado de maturação de célula dendrítica e suas propriedades funcionais, resultando em um desvio da resposta imunológica para um fenótipo anti-inflamatório/tolerante. Como alternativa, quando CTM estão presentes em um microambiente inflamatório, elas inibem a secreção de  $\text{IFN-}\gamma$  pelas células  $\text{Th1}$  e células *natural killer* e ocorre um aumento da secreção de IL-4 a partir de células  $\text{Th2}$ , promovendo assim uma mudança no perfil de resposta imunológica  $\text{Th1}$  para  $\text{Th2}$ . É provável que as CTM também medeiam as respectivas ações imunomoduladoras por contato direto célula-célula, assim como por fatores solúveis secretados. Várias moléculas secretadas e de superfície celular das CTM estão descritas. CCL indica ligante de quimiocina; TCR, receptor de célula T.

Mais recentemente, Bassi e colaboradores (115) descreveram com um maior detalhamento os mecanismos imunomoduladores da CTM derivadas de medula óssea humana e murina (Figura 4), referindo que as mesmas expressam constitutivamente a ciclooxigenase 2 (COX-2), prostaglandina E2 (PGE-2), fator de

transformação do crescimento (TGF, do inglês *transforming growth factor*)  $\beta$ 1 e fator de crescimento de hepatócitos (HGF, do inglês *hepatocyte growth factor*) (115). Quando estimulado pelas citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , a expressão de COX-2 e PGE-2 pelas CTM é aumentada. CTM expressa dois outros fatores, proteína ligante de morte celular programada 1 (PD-L1) e Indoleamina (2,3) dioxigenase, os quais são induzidos por IFN- $\gamma$ , mas não por TNF- $\alpha$  (116). Esses fatores solúveis, ou produtos derivados das CTM, modulam a resposta imunológica e permitem que as CTM criem um microambiente capaz de modular a resposta alôgena mesmo na presença de IFN- $\gamma$  (117).



**Figura 4. Mecanismos de imunomodulação das células-tronco mesenquimais (CTM) em várias células do sistema imunológico, descritos por Bassi e colaboradores (2011).** Alguns fatores solúveis estão associados aos efeitos imunossupressores das CTM, incluindo prostaglandina E2 (PGE2), fator transformador do crescimento (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento do hepatócito (HGF), indoleamina (2,3)-dioxigenase (IDO), interleucina-10 (IL-10), óxido nítrico, IL-6 and antígeno de histocompatibilidade do humano-G (HLA-G). Além disso, citocinas (por ex. IFN- $\gamma$ ), quimiocinas e receptores Toll-like (TLR) tem demonstrado modular/ativar a supressão imunológica pelas CTM (115).

### 1.1.5.1 Efeito das CTM nos linfócitos

A resposta imunológica a um aloenxerto depende de mecanismos de alorreconhecimento e subsequente ativação de linfócitos T. Uma vez ativadas, estas células podem, primeiramente, secretar certas moléculas (citocinas e fatores de crescimento) responsáveis por recrutar outros fatores envolvidos no processo inflamatório (macrófagos, moléculas de adesão e linfócitos B) e, além disso, mediar ações citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) que culminam na apoptose da célula do aloenxerto (118).

CTM tem sido proposta como uma ótima alternativa terapêutica para os alotransplantes primariamente por sua atividade imunossupressora sobre os linfócitos, suprimindo a ativação e a proliferação de linfócitos T, processo esse mediado por citocinas ou outros fatores solúveis (119).

CTM não tem um alvo preferencial, podendo agir sobre qualquer célula T, seja ela CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, células NK e linfócitos B (120-122). A tolerância induzida pelas CTM foi associada com a expansão de linfócitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3, resultando em uma diminuída resposta Th1 contra enxertos (123).

Bartholomew e colaboradores (124) demonstraram em um modelo de transplante de pele alogênico de primatas (não humanos), o efeito imunossupressor *in vivo* das CTM, assim como a inibição *in vitro* da proliferação de linfócitos estimulada por mitógenos (124). Outros grupos mostraram o papel imunossupressor das CTM murinas e humanas, via supressão da proliferação dos linfócitos T (82, 108, 114, 120, 125, 126) ou através da alteração da ação e do fenótipo das células apresentadoras de antígeno (121, 127). Desde então, alguns grupos vêm tentando explicar os mecanismos pelos quais as CTM agem.

No estudo de Glennie e colaboradores (120), na presença de CTM, a expressão de marcadores precoces de ativação das células T (CD25 e CD69), não foi afetada, mas a produção de IFN- $\gamma$  foi reduzida. Isto demonstra que as CTM podem não inibir a ativação de células T alorreativas, mas estas não proliferam devido a mecanismos supressores (82, 120).

Di Nicola e colaboradores (119) demonstraram que os efeitos imunossupressores das CTM não acontecem apenas via contato célula-célula, mas também via secreção de fatores incluindo o HGF e TGF- $\beta$ 1. Tem sido demonstrado

que as CTM suprimem a proliferação de célula T e a produção de citocinas, envolvendo outros mediadores como, por exemplo, a PGE2, que representa um mediador chave da inibição da diferenciação e maturação das células dendríticas, e conseqüentemente, da ativação diminuída de linfócitos T (128). Spaggiare e colaboradores (129) mostraram que CTM apresentam um efeito supressor local, em particular através da secreção de PGE2 dependente de IL-6, e exercem um efeito supressor sistêmico, mediando uma polarização da resposta imunológica do hospedeiro para um perfil Th2 (129). Adicionalmente, Ghannam e colaboradores (130) propuseram que as CTM previnem, *in vitro*, a diferenciação de linfócitos imaturos T CD4<sup>+</sup> em linfócitos Th17 e inibem a produção de IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$  pelos linfócitos Th17 completamente diferenciados; sendo mediado, em parte, via PGE2, cuja produção foi aumentada em cocultivo com linfócitos Th17. CTM medeiam a adesão de linfócitos Th17 via CCR6 e exercem efeitos anti-inflamatórios através da indução do fator de transcrição nuclear Foxp3 (do inglês *fork head box p3*), que é um fenótipo de linfócito T regulador (Treg).

TGF- $\beta$ 1, uma citocina anti-inflamatória, é constitutivamente expressa pelas CTM e está envolvida com a indução das Tregs. TGF- $\beta$ 1 derivado das CTM tem um papel na indução dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Trenado e colaboradores (131) demonstraram que estas células foram hábeis para suprimir a resposta proliferativa a um aloantígeno em uma reação linfocitária mista (do inglês *mixed lymphocyte reaction*). Foxp3 é considerado um marcador específico para as células Treg (131), tendo sua expressão induzida a partir da ação de CTM alogênicas (132). Outros autores comprovaram a indução de tolerância das CTM a partir da indução à produção aumentada de Treg, e estas células, por sua vez, são capazes de prevenir a DECH em modelos animais (131, 133).

Outros fatores de transcrição relacionados também com a capacidade imunomoduladora das CTM tem sido estudados. A indoleamina (2,3) dioxigenase (IDO) tem sido relacionada com a redução da proliferação linfocitária. Existem alguns relatos de que as CTM expressam funcionalmente a IDO a partir da estimulação por IFN- $\gamma$ . IDO parece suprimir a atividade do linfócito T tanto pelo acúmulo de metabólitos de triptofano como, por exemplo, a quinurenina, quanto pela depleção de triptofano, o qual é um fator essencial para a proliferação de linfócitos (134). Por outro lado, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  produzidos pelos linfócitos T ativados foram

correlacionados com a indução da expressão de IDO pelas CTM. As células mesenquimais, por sua vez, suprimiram a proliferação de células T (135).

O mecanismo da imunossupressão mediada por CTM varia entre as diferentes espécies. CTM murinas não possuem atividade de IDO, enquanto que CTM humanas são isentas de iNOS. Portanto, a imunossupressão pelas CTM derivadas de humanos ou macacos é mediada por IDO, enquanto que as CTM de camundongos utilizam óxido nítrico (NO), sob as mesmas condições de cultivo (136)

O NO é uma molécula bioativa envolvida com a imunossupressão mediada pelas CTM, tendo sua secreção estimulada por citocinas pro-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , ou IL-1 $\beta$ ). As citocinas induzem um aumento da iNOS e de algumas quimiocinas secretadas por leucócitos que direcionam as células do sistema imunológico, incluindo os linfócitos T e B, para perto das CTM, onde altos níveis de NO podem suprimir a função da célula do sistema imunológico (137).

Essa atividade supressora do NO sobre o sistema imunológico pode estar relacionado com a supressão da fosforilação da STAT5 (138). As proteínas STAT estão envolvidas com o desenvolvimento e função do sistema imunológico e tem um papel na manutenção da tolerância imunológica. STAT5 tem sido implicada nas funções celulares de proliferação, diferenciação e apoptose, sendo crítico para a indução e manutenção da expressão de Foxp3 em linfócitos Treg.

A proteína-1 de morte celular programada (PD-1, do inglês *programmed death-1*) é outra molécula secretada pela CTM e que está envolvida com os seus efeitos imunossupressores. A PD-1 é uma proteína de superfície celular que regula a resposta imunológica adaptativa. A partir da ligação de PD-1 com seus ligantes PD-L1 ou PD-L2, ocorre a transdução de sinal que inibe a proliferação de linfócitos T, a produção de citocina e, sua função citolítica (139).

Não apenas os linfócitos T, mas também os linfócitos B são afetados pelas propriedades imunossupressoras das CTM, que mostraram suprimir a proliferação e diferenciação dos linfócitos B, bem como inibir a secreção de imunoglobulinas (140, 141).

### 1.1.5.2 Efeito das CTM nas células dendríticas

Células dendríticas do doador e do receptor de um alotransplante têm importante papel na resposta imunológica ao enxerto, pois essas células demonstram uma extraordinária capacidade de induzir resposta dos linfócitos T e exercem crítica função na patogênese da DECH ou tolerância (142).

Os mecanismos de alorreconhecimento e subsequente ativação das células T e B, dependem da apresentação de antígenos pelas células dendríticas, as quais capturam e processam antígenos nos tecidos periféricos e os transportam para os órgãos linfóides secundários. A migração das células dendríticas está associada com sua maturação funcional e fenotípica. Células imaturas tem alta capacidade de internalizar antígenos, mas possuem baixa atividade estimulatória para o linfócito T. Durante o processo de maturação, as células dendríticas perdem a capacidade de capturar e processar antígenos, mas elas exibem aumentada expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) de classe II e moléculas coestimulatórias, assim como uma aumentada secreção de citocinas (143).

Neste contexto, as células dendríticas de ambos, doador e receptor, podem provocar a rejeição após o transplante. As células dendríticas do doador, após processar sinais inflamatórios, expressam altos níveis de moléculas MHC de classe II que podem exibir aloantígeno intacto às células T do receptor, iniciando assim a via direta do alorreconhecimento. A via indireta ocorre quando as células apresentadoras de antígenos do receptor, incluindo as células dendríticas, processam e apresentam os aloantígenos do doador (144).

Em um ambiente inflamatório, as CTM, a partir de um efeito imunossupressor correlacionado à PGE-2, inibem a geração de células dendríticas a partir de monócitos de sangue periférico. Essas células não adquirem nem o fenótipo de superfície típico de célula dendrítica imatura (CD14<sup>-</sup>, CD1a<sup>+</sup>) e nem de célula madura (CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>), além disso, elas não produzem IL-12, e não induzem a ativação ou proliferação de célula T (129). Mesmo quando células maduras foram tratadas com CTM, elas reduziram significativamente a expressão de CD83, regredindo para seu estado imaturo, diminuindo a expressão de moléculas de reconhecimento (HLA-DR e CD1a) e de moléculas coestimulatórias (CD80 and CD86), e diminuindo a secreção de IL-12. Ou seja, pode-se afirmar que o

aloestímulo das células dendríticas tratadas com CTM sobre os linfócitos alogênicos foi reduzido (145). Essas evidências científicas sugerem uma indução de tolerância por parte das CTM.

Neste contexto, estabeleceu-se o objetivo deste estudo, que consiste em utilizar as CTM para amenizar a resposta inflamatória e a rejeição, e induzir a tolerância ao enxerto. Mas diferentemente da maioria dos estudos descritos, o modelo utilizado neste trabalho será o xenotransplante concordante, ou seja, o transplante entre animais próximos na escala evolutiva (por ex. chimpanzé-homem, camundongo-rato) que rejeitam o enxerto alguns dias após o transplante, em um padrão histológico mediado por células, de forma similar ao que ocorre no alotransplante humano. Entretanto, a resposta imunológica ao xenoenxerto é um pouco mais intensa que a resposta alogênica. A rejeição hiperaguda ocorre minutos ou horas após o transplante, sendo que a xenorreatividade mediada por células ocorre de forma mais vigorosa em xenotransplante quando comparada ao alotransplante, mesmo quando se trata de um xenotransplante concordante (146).

Estudos pré-clínicos de xenotransplante de ilhotas, vem sendo realizados, utilizando modelo de doador suíno e receptor primata não humano (147-150). As pesquisas justificam-se principalmente pela escassez de órgãos necessários para conseguir atender uma população de pacientes diabéticos que vem aumentando consideravelmente. Esses autores acreditam que o xenotransplante possa ser a resposta para essa limitada disponibilidade de doadores, e entre os tecidos com potencial para o xenotransplante estão as ilhotas de suínos que, até há alguns anos atrás, eram a única fonte de obtenção de insulina exógena para os pacientes diabéticos. Os estudos mais atuais sobre o tema estão sendo realizados para investigar estratégias terapêuticas para diminuir a resposta imunológica ao xenoenxerto.

Neste estudo, o xenotransplante envolveu os ratos da linhagem Wistar como doadores de ilhotas e de CTM e, como receptores foram utilizados os camundongos diabéticos não obesos (NOD), que apresentam um modelo de diabetes autoimune, semelhante ao diabetes tipo 1 do humano.

*Objetivos.*

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do cotransplante de ilhotas e células mesenquimais xenogênicas na prevenção da rejeição ou tolerância ao transplante de ilhotas em camundongos não obesos e diabéticos (*non-obese diabetic*, NOD).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e cultivar células-tronco da medula óssea de rato;
- b) Expandir CTM da medula óssea de rato;
- c) Confirmar a identidade das CTM pela imunofenotipagem por citometria de fluxo e por diferenciação em osteócito, adipócito e condrócito;
- d) Avaliar a capacidade funcional das ilhotas das secções renais dos receptores a partir da análise de expressão de insulina e glucagon;
- e) Avaliar a influência do cotransplante de ilhotas e células mesenquimais xenogênicas nos marcadores inflamatórios e de rejeição do transplante em camundongos NOD;
- f) Avaliar se o cotransplante influencia a expressão de marcadores de tolerância ao xenotransplante de ilhotas em camundongos NOD.

## *Métodos.*

---

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Toda metodologia utilizada no presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, parecer 111/2006.

Para o presente estudo foram utilizados 62 ratos machos da linhagem Wistar e 16 camundongos diabéticos não-obesos (NOD).

Os ratos da linhagem Wistar, com aproximadamente dois meses de idade, pesando entre 270-300 g, foram obtidos do biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), os quais foram os doadores das ilhotas pancreáticas e das CTM.

Os camundongos NOD foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), os quais constituíram a matriz inicial desta linhagem no biotério da PUCPR. Foram utilizadas as fêmeas, com aproximadamente 10 semanas de vida, pesando entre 25-30g, que desenvolveram diabetes.

A glicemia dos animais foi monitorada com glicosímetro portátil Accu-Chek (Roche, EUA) e os animais detectados com diabetes (glicemia maior ou igual a 200 mg/dl) foram tratados com insulina até um dia antes do transplante.

Os camundongos NOD foram divididos em três grupos:

- a) NOD receptores de cotransplante de ilhotas e células mesenquimais xenogênicas (denominado grupo 'IP + CTM'; n=5).
- b) NOD receptores de transplante de ilhotas xenogênicas (denominado grupo 'IP'; n=5).
- c) NOD não submetidos ao transplante (denominado grupo 'controle'; n=6).

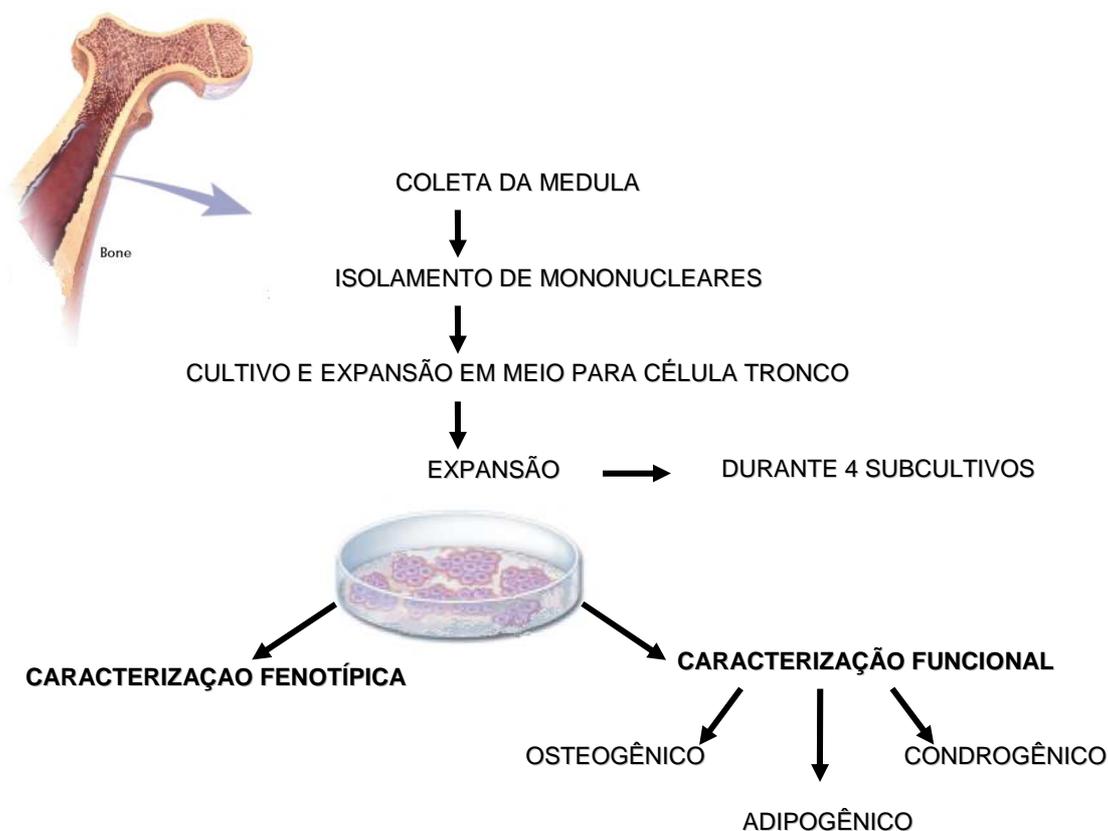
### 3.2 ISOLAMENTO, CULTIVO E EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS

Para este procedimento, utilizou-se o protocolo descrito por Meirelles e Nardi (151). As medulas foram obtidas de ossos femorais de ratos Wistar com idade de aproximadamente dois meses. A medula foi exposta cortando-se as extremidades dos ossos e seu conteúdo interno foi retirado por lavagem (*flushing*) em PBS (Tampão fosfato salina, KCl 2,7mM, K<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> 1,8mM, NaCl 137mM, Na<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> 10,1mM), com o auxílio de uma seringa e agulha 16G. O material foi recolhido em meio DMEM (Invitrogen, EUA) centrifugado a 400 x g por 5 minutos a 24°C e ressuspensionado em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100 µg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina, Gibco, EUA). Este procedimento foi repetido mais duas vezes para retirar todo o resquício de osso, cartilagem e músculo. Durante a última lavagem, as células foram pipetadas vigorosamente para separar qualquer grumo remanescente.

As células foram semeadas em garrafas de cultura a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, em incubadora a 37°C, em atmosfera úmida com tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. Foi utilizado meio de cultura DMEM suplementado com 100 µg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina e 10% SFB (Hyclone, EUA). Após 24-48 horas, as culturas foram lavadas 2 vezes em PBS 1 x para remoção das células não aderentes. O meio foi trocado a cada 2-3 dias, e as células foram rotineiramente observadas em microscópio óptico invertido com relação à sua morfologia e proliferação. Quando as células alcançavam confluência de aproximadamente 80%, procedia-se à dissociação celular, utilizando TrypLE™ Express (Gibco, Dinamarca), sendo distribuídas em novas garrafas na proporção de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (passagem 1).

Os cultivos caracterizados como CTM foram utilizados para os experimentos de transplante.

As culturas foram expandidas até o quarto subcultivo, quando havia uma quantidade suficiente para serem utilizadas nos experimentos para caracterizar o seu fenótipo, conforme roteiro apresentado na Figura 5, para posteriormente, a realização dos transplantes.



**Figura 5** - Roteiro das etapas de isolamento, cultivo e caracterização das células-tronco mesenquimais.

Fonte: Gonzalez e Aita, 2009 (152).

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CULTURAS

#### 3.3.1 Análise de marcadores de superfície

Ao final do 4<sup>o</sup> subcultivo, alíquotas das culturas foram utilizadas para caracterização por citometria de fluxo. As células foram dissociadas da placa com solução de Tripsina/EDTA 0,25% a 37°C por 3 minutos, lavadas com PBS 1x e 1% SFB e contadas em câmara de Neubauer. Em microtubos de centrífuga, foram distribuídas aproximadamente  $3 \times 10^5$  células/tubo e procedeu-se à centrifugação a

400 xg por 5 minutos a 4°C. O sedimento celular foi ressuspensionado em 50 µL de PBS contendo 1% SFB. Em cada tubo foi adicionado um dos seguintes anticorpos monoclonais anti-rato, numa diluição final 1:10 de acordo com as instruções do fabricante (todos da BD-Pharmingen, EUA): anti-CD29 e anti-CD45 conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), e anti-CD73 conjugado à ficoeritrina (PE). Nos dois tubos restantes foram adicionados os controles isotípicos conjugados ao FITC e à PE (Tabela 1). Após 30 min de incubação a 4°C 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 foram ressuspensas e fixadas em 500 µL de PBS com 2% de formaldeído (Merck, Alemanha), e transferidas para tubos próprios para citometria de fluxo.

**Tabela 1.** Anticorpos monoclonais (anti-rato) utilizados nos experimentos de fenotipagem das CTM por citometria de fluxo

TUBO	ANTICORPOS
1	controle isotípico conjugado PE
2	controle isotípico conjugado FITC
3	anti-CD29 conjugado FITC
4	anti-CD45 conjugado FITC
5	anti-CD73 conjugado PE

A análise das células foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). 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 e PE. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra, e os dados foram analisados com auxílio do *software* CellQuest Pro (BD Biosciences, EUA).

### 3.3.2 Ensaio de diferenciação *in vitro*

Para confirmar o potencial de diferenciação em linhagens mesenquimais (adipócito, condrócito e osteócito), as células (4<sup>o</sup> subcultivo) foram cultivadas em microplacas de 24 poços, os quais foram previamente recobertos com lamínulas de vidro redondas (Sarstedt, Alemanha). As células foram plaqueadas nos poços contendo as lamínulas, numa concentração de  $1 \times 10^4$  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 e colaboradores (81), seguido de análise citoquímica para confirmação da diferenciação.

Para a diferenciação osteogênica, as células foram semeadas em meio DMEM 10% SFB contendo 0,1  $\mu$ M dexametasona, 10 mM  $\beta$ -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 contendo alta concentração de glicose (H-DMEM, 25mM) e 10% SFB, 1  $\mu$ M dexametasona, 10  $\mu$ g/mL insulina e 100  $\mu$ M indometacina, durante 21 dias, trocando o meio cada 3-4 dias. Os controles receberam apenas H-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.

A diferenciação condrogênica foi induzida pela técnica de micromassa. Aproximadamente 250.000 células foram centrifugadas a 500 x g por 10 min e a seguir incubadas em meio contendo alta glicose (25 mM) e 1% SFB, 0,01  $\mu$ M dexametasona, 10 ng/mL TGF- $\beta$ , 1% de ITS (Invitrogen, EUA), 4  $\mu$ g/mL ácido ascórbico 2P e 1 mM piruvato de sódio, durante 21 dias. No transcurso da diferenciação observou-se a formação de uma massa celular arredondada, a qual foi fixada com formalina 10%, submetida ao preparo de lâminas histológicas e coradas com Sirius red para detecção de colágeno.

Todos os experimentos de diferenciação foram realizados em triplicata.

### 3.4 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ILHOTAS PANCREATICAS

Para o isolamento de ilhotas foi seguido um protocolo já descrito por Sutton e colaboradores (153).

Os ratos Wistar machos foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (Syntec, Brasil) e submetidos à laparotomia. Após visualização do ducto biliar comum, a porção distal deste ducto foi bloqueada com pinça de Kelly e o ducto biliopancreático foi canulado (cânula 23G, BD, Brasil) para injeção e perfusão do pâncreas com 6 ml de solução de colagenase tipo V (Sigma, EUA) em uma concentração de 0,5 mg/ml. Ao final da perfusão, com o órgão totalmente preenchido pela colagenase, foi realizada a pancreatectomia, dissecando-se o pâncreas da grande curvatura gástrica, do duodeno, do retroperitônio, do intestino grosso, do intestino delgado e do baço, sem romper a cápsula pancreática.

Os pâncreas distendidos com colagenase foram colocados em tubo com solução de Hanks e a seguir em banho com água a 37°C e incubados por 18 minutos, para digestão enzimática do tecido. Para interromper a digestão, os tubos contendo os pâncreas digeridos foram colocados no gelo e adicionou-se 100 ml de meio CMRL (meio basal para cultivo de ilhotas, Mediatech, EUA) 10% SFB.

Para remoção das células exócrinas e debris, inicialmente, o tecido digerido foi aspirado em seringa de 20 cc (BD, Brasil) com agulha de 16G (BD, Brasil) e o conteúdo foi filtrado em filtro com poros de 400 µm de diâmetro, e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 400 xg a 4° C, sendo este procedimento de lavagem repetido por 3 vezes.

O sedimento celular foi ressuspenso em 40 ml de meio CMRL 10% SFB.

Para análise da digestão uma amostra de 50 µl foi acrescida de 5 µl de ditizona para coloração e observação em microscopia óptica. A solução foi preparada diluindo-se 100 mg de ditizona (Sigma, EUA) em 10 ml de DMSO (Merk, Alemanha), sendo então filtrada em filtro de 0,22 µm de diâmetro (TPP, Suíça).

A ditizona liga-se ao zinco presente nas ilhotas, ligado a moléculas de insulina, portanto, ilhotas viáveis são coradas em vermelho. A coloração também é importante para verificar se as ilhotas não estão mais embebidas no tecido acinar, como uma forma de análise da digestão.

Após a digestão, o método de purificação utilizado para separação das ilhotas do tecido acinar foi com gradiente descontínuo de Ficoll.

Inicialmente, foi realizada a montagem do gradiente utilizando Ficoll específico para purificação de ilhotas (CellGro, EUA) de diferentes densidades: 1.110 g/cm<sup>3</sup>, 1.096 g/cm<sup>3</sup>, 1.069 g/cm<sup>3</sup> e 1.037 g/cm<sup>3</sup>.

A densidade de 1.110 g/cm<sup>3</sup> foi conseguida a partir da diluição de 2 ml do Ficoll de densidade 1.132 g/cm<sup>3</sup> em 15 ml da solução de ficoll e 1.108 g/cm<sup>3</sup>.

O pellet contendo as ilhotas isoladas (não mais que 1,5 ml por gradiente) foi diluído em 15 ml da solução de ficoll com densidade de 1.110 g/cm<sup>3</sup>, formando a base do gradiente em um tubo de 50 ml.

A seguir foram adicionadas lentamente sobre a solução de base, as demais soluções de ficoll, respeitando-se a seguinte ordem: 12 ml da densidade 1.096 g/cm<sup>3</sup>, 10 ml da 1.069 g/cm<sup>3</sup> e 10 ml da 1.037 g/cm<sup>3</sup>.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 4° C por 15 minutos a 2000 rpm, sem freio, e as ilhotas pancreáticas foram coletadas das interfaces entre as soluções de Ficoll 1.096/1.069 g/cm<sup>3</sup>. As ilhotas recuperadas foram ressuspensas em meio de lavagem 10% SFB, centrifugadas a 4° C por 5 min a 1700 rpm. O pellet foi novamente ressuspense em meio 10% SFB e centrifugado a 4° C por 5 minutos a 1000 rpm.

Para a contagem do número das ilhotas isoladas, estas foram ressuspensas em 2 ml de meio CMRL 10% SFB e retiradas 10 aliquotas de 20 µl as quais foram colocadas em placa de Petri. As ilhotas foram contadas sob visão direta de microscópio com aumento de 100 vezes. A fórmula usada para calcular o número de ilhotas foi: média do nº total de ilhotas (10 gotas) x 100 = nº total de ilhotas em 2 ml. As ilhotas obtidas foram, então, utilizadas imediatamente para o transplante.

### 3.5 COTRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E ILHOTAS PANCREÁTICAS

O transplante foi realizado em 10 camundongos NOD com diabetes confirmado (glicemia maior ou igual 200 mg/dl avaliada por glicosímetro portátil), sendo que 5

NOD receberam o transplante de ilhotas pancreáticas (grupo denominado 'IP') e 5 receberam o cotransplante de ilhotas pancreáticas e CTM (grupo denominado 'IP+CTM'), tendo os ratos Wistar como doadores das ilhotas pancreáticas e das células-tronco mesenquimais. Camundongos NOD não submetidos ao transplante foram considerados o grupo controle (n=6). Os animais dos grupos 'IP' e 'IP+CTM' foram anestesiados com quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg (Syntec, Brasil). Foi realizada incisão cutânea para exposição do rim esquerdo e no grupo 'IP+CTM' as ilhotas foram cotransplantadas com as CTM (aproximadamente 500 ilhotas e  $1,5 \times 10^4$  CTM, em um volume máximo de 5  $\mu$ l), e na cápsula renal, utilizando-se seringa acoplada com cateter para infusão. Após, a cápsula renal foi cauterizada e a incisão cutânea foi suturada com fio de polipropileno 6,0 (Ethicon, Brasil).

A glicemia dos animais foi analisada diariamente pelo período de 4 dias, com glicosímetro portátil, para verificação da reversão do diabetes. Foi utilizado como grupo controle animais transplantados somente com ilhotas.

Após 4 dias do transplante, os animais foram submetidos à nefrectomia esquerda e um fragmento de aproximadamente 2 mm, compreendendo o pellet das células implantadas, foi retirado do tecido renal e armazenado em 1 ml de RNA $later$  (LifeTechnologies, EUA), que preserva o material genético (RNA). Essas amostras foram utilizadas para os ensaios de PCR em tempo real, nos quais foram avaliadas as expressões dos genes de insulina e glucagon e, de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo de rejeição e tolerância imunológica ao transplante.

### 3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

O tecido armazenado em RNA $later$  foi utilizado nos ensaios de PCR tempo real para avaliar o perfil de expressão de citocinas envolvidas no processo de rejeição e tolerância ao transplante. Além disso, a expressão de insulina e glucagon foi avaliada.

### 3.6.1 Extração e Purificação de RNA

Amostras de RNA foram isoladas dos tecidos contendo o implante celular, de ilhotas pancreáticas apenas ou de ilhotas e CTM, para avaliar por PCR em Tempo Real a expressão de marcadores inflamatórios, de rejeição ou de tolerância imunológica ao transplante.

Para a extração e purificação do RNA total foi utilizado o *InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit* (Invitex, Alemanha).

Amostras dos tecidos dos rins (aproximadamente 20 mg cada) que receberam os dois diferentes tipos de transplante (ilhotas pancreáticas ou ilhotas pancreáticas e CTM), e dos controles (tecidos dos rins direitos, não submetidos ao transplante) foram retiradas da solução RNA/*lateral*, fragmentadas e submetidas ao processo de lise, utilizando “Zirconia beads” e uma solução de lise com B-mercaptoetanol, conforme instruções do fabricante.

A solução de lise contém partículas que se ligam ao DNA, que por sua vez foi removido nos subseqüentes processos de centrifugação, sem a necessidade de digestão a partir de DNase.

Após a remoção do DNA genômico, outros contaminantes residuais foram também removidos utilizando-se as diferentes soluções tampão de lavagem que constituem o *kit*, finalizando o processo de purificação do RNA com a eluição do mesmo. A concentração do RNA obtido foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, EUA). Foram utilizadas apenas as amostras de RNA que apresentaram relação  $A_{260}/A_{280}$  em torno de 2,0. As amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o momento da análise.

### 3.6.2 Síntese de cDNA

O RNA total isolado dos tecidos foi utilizado como *template* para a síntese de cDNA em uma reação de transcrição reversa, utilizando-se o *kit ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis* (New England Biolabs, EUA). Para cada

amostra, a reação foi preparada com 1 µg de RNA total, 2 µl de oligonucleotídeos – d(T)<sub>23</sub>VN (50 µM) – e H<sub>2</sub>O livre de nucleases para um volume final de 8 µl. As amostras foram incubadas a 70°C por 5 minutos e centrifugadas brevemente. Em seguida, foram adicionados para cada amostra 10 µl do mix de reação (solução tampão e dNTPs) e 2 µl do mix de enzima (transcriptase reversa e inibidor de RNase murina), totalizando 20 µl por tubo. A reação foi incubada em termociclador por 1 hora a 42 °C. A seguir, a enzima foi inativada a 80 °C por 5 minutos, e a reação foi diluída para um total de 50 µl com água para PCR. O produto de cDNA foi aliqüotado e armazenado a -20 °C.

### 3.6.3 PCR em Tempo Real

Os cDNAs das diferentes amostras foram comparados em relação à expressão gênica de insulina, glucagon e de citocinas envolvidas no processo de rejeição e de tolerância imunológica ao transplante. Como controle foram utilizados cDNAs de tecido renal não transplantado.

O estudo da amplificação dos genes foi realizado pela técnica de PCR quantitativo, a qual é baseada no monitoramento da fluorescência da amplificação de DNA ciclo a ciclo. O número de cópia dos genes foi determinado utilizando-se o EvaGreen, um corante fluorescente intercalante de DNA que é captado pelo termociclador a cada novo ciclo da reação de PCR e permite que o aparelho desenhe uma curva de amplificação para cada amostra.

Foram realizadas diluições seriadas (1:5) das amostras para obter a curva de calibração. A concentração das amostras foi ajustada para 20 ng/µL. Todas as reações foram realizadas em triplicata, contendo 1 µL do cDNA, 1 µL do *primer Forward* (10 µM) e 1 µL do *primer Reverse* (10 µM) e 10 µL de EvaGreen® (Biotium, EUA), e compostas de um controle de contaminação da reação ausente de material genético. As reações de amplificação e quantificação dos produtos formados foram realizadas no termociclador *7500 Real Time PCR* (Applied Biosystems). Os genes avaliados nesta análise de expressão diferencial e os respectivos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2.** Genes analisados por PCR em tempo real nas amostras das secções renais e suas respectivas seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados.

<b>Gene</b>		<b>Sequencia</b>
<b>Insulina (rato)</b>	senso	5' GGTTCCTTCTACACACCCAGTCCC 3'
	antissenso	5' TCCACAATGCCACGCTTCTGC 3'
<b>Glucagon (rato)</b>	senso	5' CAAACGCCATTACAGGGCAC 3'
	antissenso	5' CGGTTCTCTTGGTGTTCATCAAC 3'
<b>Foxp3 (camundongo)</b>	senso	5' CCCAGGAAAGACAGCAACCTT 3'
	antissenso	5' TTCTCACAAACCAGGCCACTTG 3'
<b>Interferon gama (camundongo)</b>	senso	5' ACTCTAACATGCCACAAAACCATAG 3'
	antissenso	5' CTTCCAGTTTTATACCTGATCGAAG 3'
<b>Interleucina 4 (camundongo)</b>	senso	5' GAGTTAAAGTTGCTGAAACCAAGG 3'
	antissenso	5' ATTTTCCAATTGGTCTGATTTTAC 3'
<b>Interleucina 1<math>\beta</math> (camundongo)</b>	senso	5' TCTTCCTAAAGTATGGGCTGGA 3'
	antissenso	5' AAAGGGAGCTCCTTAACATGC 3'
<b>Interleucina 6 (camundongo)</b>	senso	5' CGCTATGAAGTTCCTCTCTGC 3'
	antissenso	5' TTGGGAGTGGTATCCTCTGTG 3'
<b>Interleucina 10 (camundongo)</b>	senso	5' TGAATTCCCTGGGTGAGAAGCTGA 3'
	antissenso	5' TGGCCTTGTAGACACCTTGGTCTT 3'
<b>TNF alfa (camundongo)</b>	senso	5' GATTATGGCTCAGGGTCCAA 3'
	antissenso	5' CCCAGCATCTTGTGTTTCTG 3'
<b>MCP-1 (camundongo)</b>	senso	5' GCCCTAAGGTCTTCAGCACCTT 3'
	antissenso	5' TGCTTGAGGTGGTTGTGGAA 3'
<b>GAPDH (camundongo)</b>	senso	5' GACAATGAATACGGCTACAGCAACAGG 3'
	antissenso	5' GTTGGGATAGGGCCTCTCTTGCTCA 3'

As condições da PCR foram ajustadas para cada *primer* utilizando um protocolo de amplificação constituído de 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por um minuto. O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados durante a amplificação foram realizados pelo programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems).

### 3.6.4 Análise dos resultados da PCR em Tempo Real

Os resultados dos experimentos de PCR em Tempo Real foram analisados através do programa *7500 System SDS Software*. Foi definido manualmente um *threshold* que estivesse na fase exponencial de amplificação do gene, sendo que a intersecção da curva de amplificação com o *threshold* forneceu o  $C_T$  (*Threshold cycle* – o ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima da linha basal) da amostra analisada.

Foi utilizado um método de quantificação relativa para analisar os dados. Assim, para cada cDNA analisado eram realizadas duas reações, sendo uma utilizando *primers* para o gene analisado e outra utilizando *primers* para um controle endógeno (gene *housekeeping*). Neste caso, foi utilizado o gene GAPDH e a diferença entre os  $C_T$  dos dois genes foi definida como  $\Delta C_T$ .

Teoricamente, em uma reação de PCR a quantidade de produto formado é duplicada a cada ciclo, portanto, a diferença entre uma amostra analisada e uma amostra de referência é dada pelo ganho em cada ciclo (2 vezes) elevado a diferença de  $\Delta C_T$  das duas amostras (154). Entretanto, na prática a eficiência dos *primers* não é sempre 100%, ou seja, ocorre um ganho menor que 2 vezes entre cada ciclo de PCR, sendo que o valor da eficiência do *primer* deve ser considerado, substituindo 2 pela eficiência do *primer* da amostra (E).

Portanto, a partir dos valores de  $C_T$  encontrados, foi calculado o valor de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (155), onde:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \frac{(1 + E)^{-\Delta C_T \text{ do gene alvo}}}{(1 + E)^{-\Delta C_T \text{ do gene controle}}}$$

E = eficiência da reação de PCR

$\Delta C_T$  do gene alvo = diferença entre o valor de  $C_T$  da amostra desconhecida e da amostra controle ( $C_T$  médio dos linfócitos normais) para este gene

$\Delta C_T$  do gene controle = diferença entre o valor de  $C_T$  da amostra desconhecida e da amostra controle ( $C_T$  médio dos linfócitos normais) para este gene

O cálculo do  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  pode ser usado se as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene controle apresentarem valores muito próximos. De modo a comprovar a eficiência da reação, o gene alvo e o gene controle foram amplificados, para a mesma amostra, em diluições seriadas. A partir dos valores de  $C_T$  de cada uma das diluições, o termociclador desenha uma reta, formada a partir dos valores de  $C_T$  e da concentração da amostra em cada uma das diluições. As reações que apresentarem inclinação da reta “slope” entre 3,1 e 3,9 foram consideradas dentro do padrão de eficiência aceitável.

Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação, a qual foi realizada para verificar a especificidade da amplificação e confirmar ausência de formação de dímeros de *primer* ou qualquer outro produto inespecífico.

## *Resultados.*

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

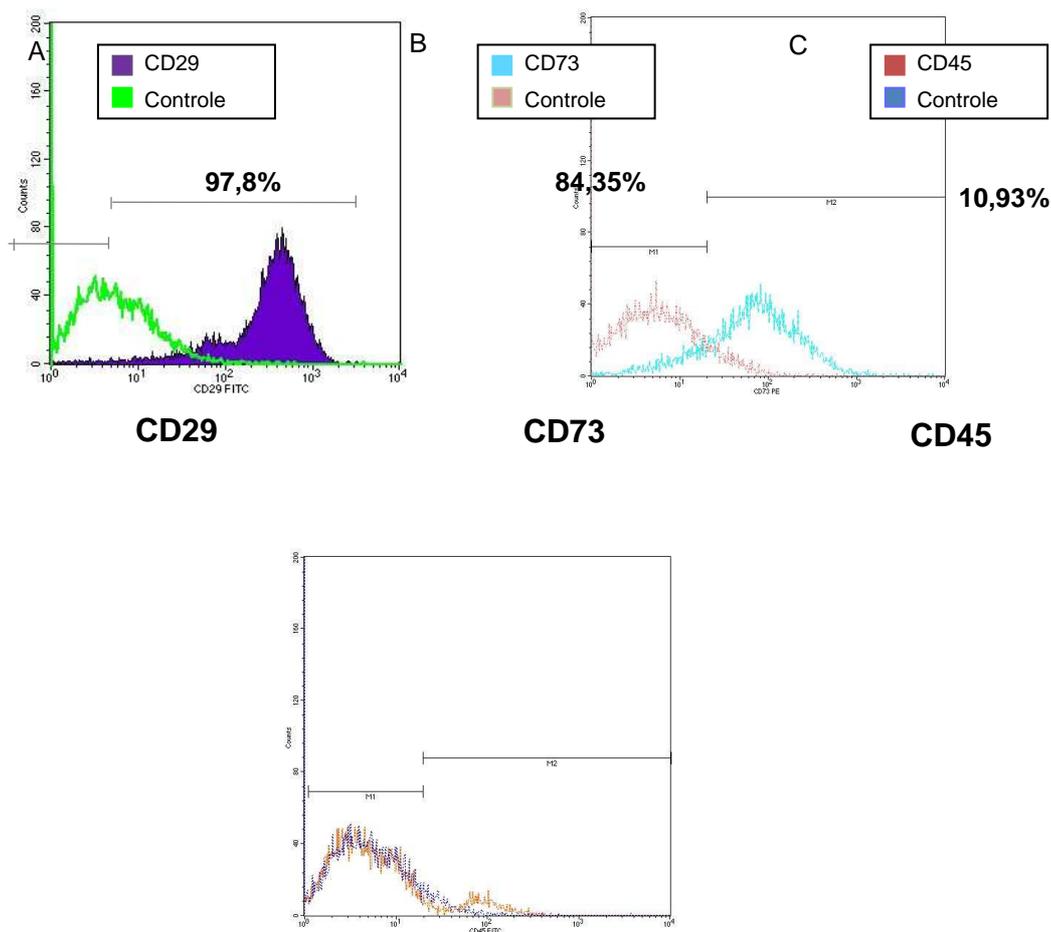
As CTM de medula óssea de fêmures de ratos Wistar foram obtidas como descrito na sessão de Métodos. O rendimento médio de células mononucleares totais foi de  $5,3 \times 10^7 \pm 9,4 \times 10^7$  células/animal ( $n = 8$ ). A viabilidade celular avaliada por azul de Tripán foi, em média, de  $98,6\% \pm 0,2$ . As colônias de células com morfologia fibroblastóide começaram a aparecer nos frascos de cultivo em 4 dias. Após uma a duas semanas, as células atingiam 80% de confluência na placa, quando eram então tripsinizadas e transferidas a uma nova placa em uma diluição 1:3. As células foram submetidas a 4 subcultivos antes do transplante.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Após o 4º subcultivo, as células foram caracterizadas através de técnicas de citoquímica (caracterização funcional) e de citometria de fluxo (imunofenotipagem), para confirmar sua origem mesenquimal.

#### 4.2.1 Imunofenotipagem

As células de um cultivo na 4ª passagem foram marcadas com anticorpos anti-CD29-FITC, CD45-FITC e CD73-PE, em tubos separados. O resultado deste experimento está ilustrado na figura 6. Pode-se observar que a grande maioria das células foi positiva para os marcadores mesenquimais CD29 e CD73. Em relação ao marcador CD45, aproximadamente 90% das células foram negativas.



**Figura 6. Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos Wistar no 4<sup>o</sup>. subcultivo.** Os histogramas apresentam a porcentagem de células reativas com os anticorpos testados. Em A e B, estão demonstradas as porcentagens de reatividade para os marcadores de superfície característicos de CTM. Em C, a porcentagem de reatividade para marcadores de superfície hematopoiéticos.

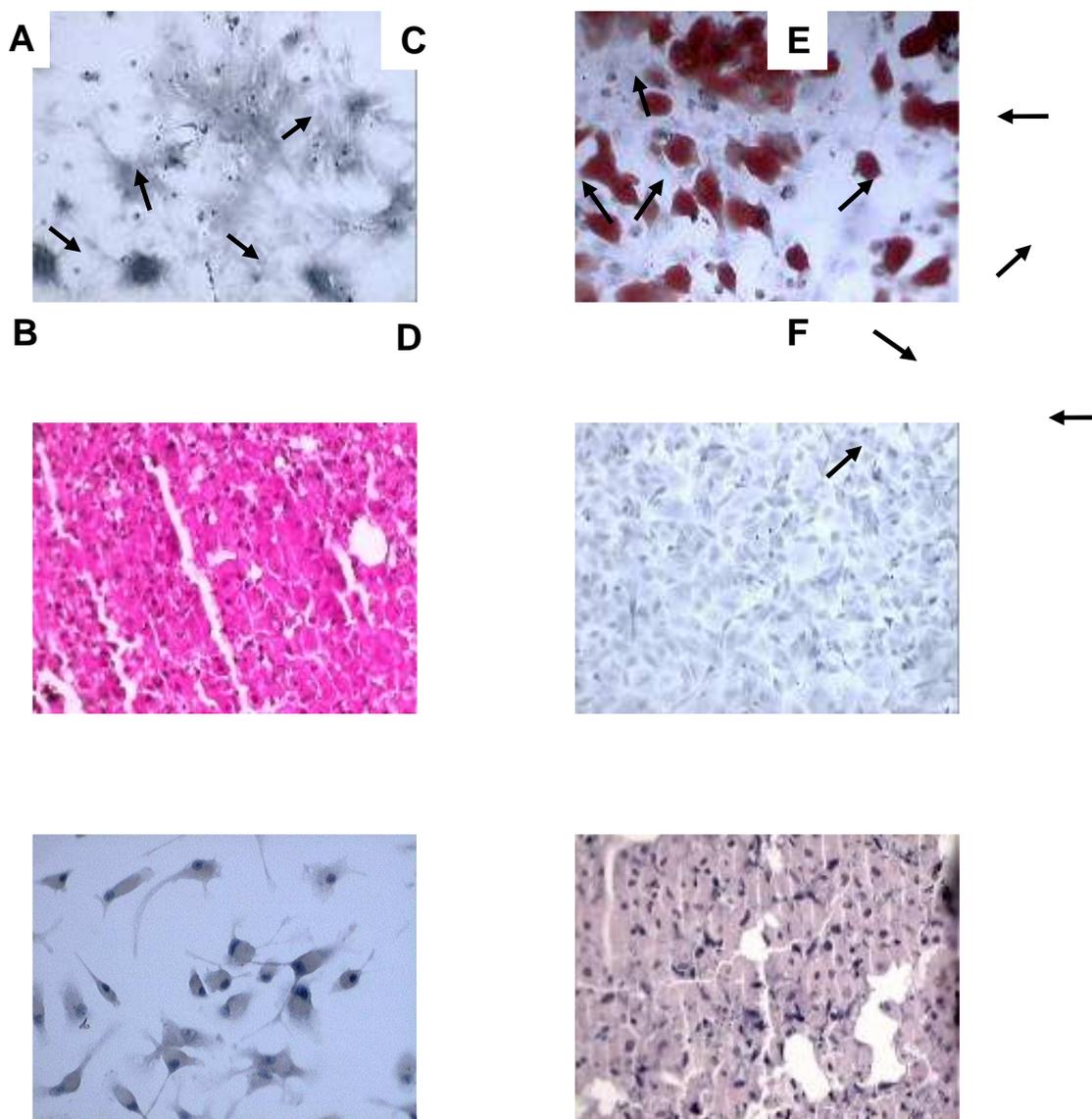
#### 4.2.2 Citoquímica

A caracterização funcional foi realizada pela demonstração do seu potencial de diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos.

A diferenciação osteogênica foi confirmada pela coloração com Alizarin Red S demonstrando a presença de depósitos de cálcio na matriz. As setas indicam a calcificação que aparece como regiões escuras na matriz secretada. Várias regiões calcificadas foram observadas nas culturas diferenciadas (Figura 7A), e não foi observada no controle (Figura 7B).

A diferenciação adipogênica foi confirmada pela coloração com Oil Red O demonstrada pela a presença de vacúolos lipídicos nas células. Uma fração significativa da cultura apresentou células com múltiplos vacúolos lipídicos corados em vermelho (Figura 7C), os quais não foram observados no controle (Figura 7D).

A diferenciação condrogênica foi induzida pela técnica de micromassa. No transcurso da diferenciação observou-se a formação de uma massa redonda, a qual foi fixada com formalina 10% e submetida ao preparo de lâminas histológicas e coradas com Sirius red para detecção de colágeno. A presença de colágeno foi evidenciada em toda a cultura, por coloração com Sirius red (Figura 7E). A figura 7F mostra a cultura diferenciada sem a coloração Sirius red. Nestes experimentos não foi possível a realização de um controle negativo porque o meio de controle, sem os fatores que induzem a diferenciação, não formou um *pellet* celular similar ao das células diferenciadas (condrócitos).



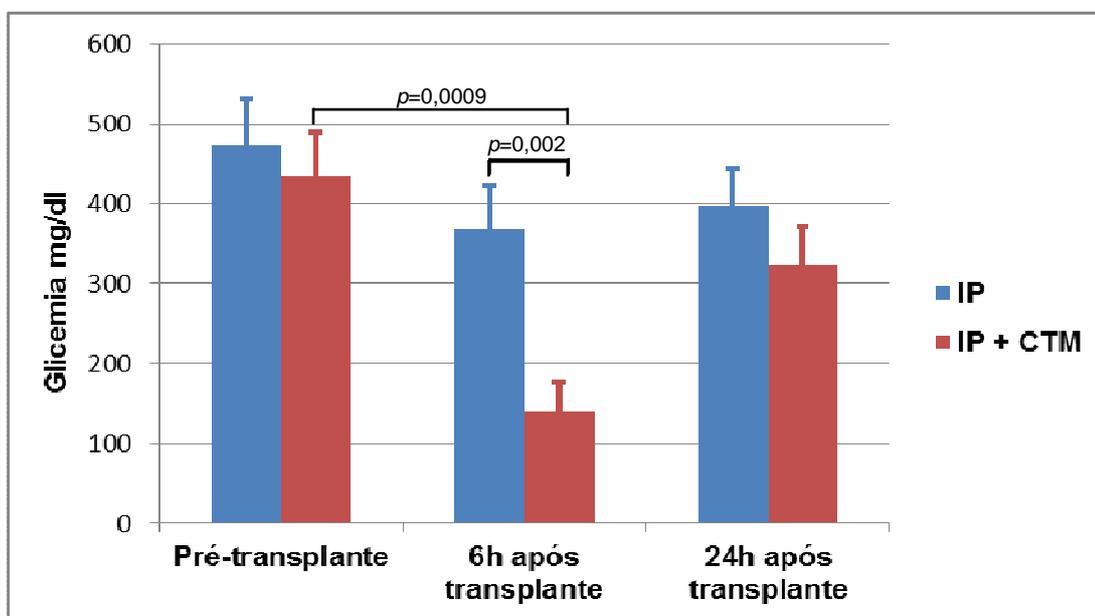
**Figura 7. Diferenciação das células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea de rato em adipócitos, osteócitos e condrócitos.** Diferenciação osteogênica na cultura diferenciada (A) e controle (B), (100X), coradas com Alizarin Red S. As setas indicam a presença de depósitos de cálcio que aparece como regiões escuras na matriz secretada (A); Diferenciação adipogênica na cultura diferenciada (C) e controle (D), (200X). A diferenciação adipogênica foi confirmada pela coloração com Oil Red O demonstrada pela presença de vacúolos lipídicos nas células, indicados pelas setas (C); Diferenciação condrogênica na cultura diferenciada demonstrando o colágeno corado com Sirius red (D) e condrócito corado com Hematoxilina eosina (F), (400X).

#### 4.3 EFEITO DO COTRANSPLANTE DE ILHOTAS E CTM NA GLICEMIA

Os animais dos grupos 'IP' e 'IP+CTM' foram transplantados com o mesmo número de ilhota (500), sendo que o grupo do cotransplante recebeu também 50.000 células mesenquimais.

A glicemia dos animais foi monitorada a partir de amostras de sangue da veia caudal, antes e após o transplante, utilizando glicosímetro portátil. Na figura 8, estão demonstrados os níveis glicêmicos apenas até 24 horas pós-transplante, pois a partir desse momento a glicemia de muitos animais elevou-se significativamente, aparecendo apenas a expressão "high" na leitura da glicemia no glicosímetro, impedindo a análise estatística dos dados, após esse período.

Não houve diferença nos níveis glicêmicos entre NOD transplantados com ilhotas pancreáticas (n=5) ou com ilhotas e CTM (n=5), antes ( $472,4 \pm 138,3$  e  $434,7 \pm 126,1$  mg/dl, respectivamente;  $p=0,76$ ), e 24 horas após o transplante ( $398,8 \pm 125,2$  e  $323,4 \pm 112,6$  mg/dl, respectivamente;  $p=0,46$ ). Entretanto, após 6 horas do transplante, o grupo 'IP+CTM' apresentou uma redução significativa da glicemia quando comparado ao pré-transplante ( $p=0,0009$ ), além disso, apresentou níveis glicêmicos significativamente menores que o grupo 'IP' ( $p=0,002$ ) no mesmo período ( $140,5 \pm 38,2$  e  $369,2 \pm 89,9$  mg/dl, respectivamente) (Figura 8).



**Figura 8.** Níveis glicêmicos (mg/dl) dos camundongos diabéticos não-obesos (NOD) transplantados com ilhotas pancreáticas (grupo 'IP'; n=5) (coluna azul) ou com ilhotas pancreáticas associadas com células-tronco mesenquimais (grupo 'IP+CTM'; n=5) (coluna vermelha) antes, 6 e 24 horas após o transplante. Os valores de glicemia estão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o teste *t de Student* (para a comparação do mesmo grupo em momentos

diferentes foi utilizado teste *t de Student* pareado). Foi considerada diferença estatística significativa os valores de  $p < 0,05$ .

#### 4.4 ANÁLISE DE MARCADORES DE REJEIÇÃO E TOLERÂNCIA AO TRANSPLANTE DE ILHOTAS

No 4<sup>o</sup> dia pós-transplante os animais foram submetidos à nefrectomia. Secções dos rins removidos foram armazenados em RNA $later$  (Qiagen, EUA) para análise da expressão de marcadores celulares de inflamação, rejeição e tolerância imunológica por PCR em tempo real.

##### 4.4.1 Expressão do GAPDH como controle endógeno

Conforme descrito na seção de Métodos deste trabalho, a quantificação da expressão dos genes foi feita de forma relativa, isto é, pela comparação da expressão em um grupo exposto a um estímulo ao grupo não exposto, denominado grupo controle. Com o intuito de corrigir possíveis variações na quantidade de RNA inicial empregada em cada reação, assim como variações decorrentes da pipetagem manual dos reagentes, optou-se pela utilização do gene GAPDH como controle endógeno.

A quantificação da expressão desse gene nos diferentes grupos estudados foi expressa em valores de Ct (Tabela 3).

**Tabela 3. Expressão do gene GAPDH nas diferentes amostras pela técnica de PCR em tempo real.** Média e desvio-padrão dos valores de CT obtidos nas amostras de tecido renal de camundongos NOD (non obese diabetic, diabéticos não obesos) que receberam implante de ilhotas pancreáticas (IP), células-tronco mesenquimais e ilhotas pancreáticas (IP+CTM), e que não receberam implante celular (controle).

<b>Grupos</b>		
<b>IP (n=5)</b>	<b>IP+CTM (n=5)</b>	<b>Controle (n=6)</b>
$25,0 \pm 0,7^a$	$24,8 \pm 0,2^a$	$25,6 \pm 1,1^a$

Letras distintas entre grupos indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Teste *t* de Student.

O gene GAPDH foi detectado em quantidade similar em todos os grupos experimentais, sem apresentar uma diferença estatística significativa entre os valores médios dos grupos controle e dos submetidos ao cotransplante (IP+CTM) ( $p=0,10$ ) e ao transplante de ilhotas (IP) ( $p=0,26$ ) e na comparação dos submetidos ao transplante de ilhotas (IP) com os do cotransplante (IP+CTM) ( $p=0,57$ ) (Tabela 3). Essa ausência de variação na expressão do gene controle endógeno também pode ser interpretada como um indicador da integridade do RNA extraído, da adequada síntese de cDNA na reação de transcrição reversa e da boa amplificação do produto durante a PCR.

#### 4.4.2 Expressão de insulina e glucagon

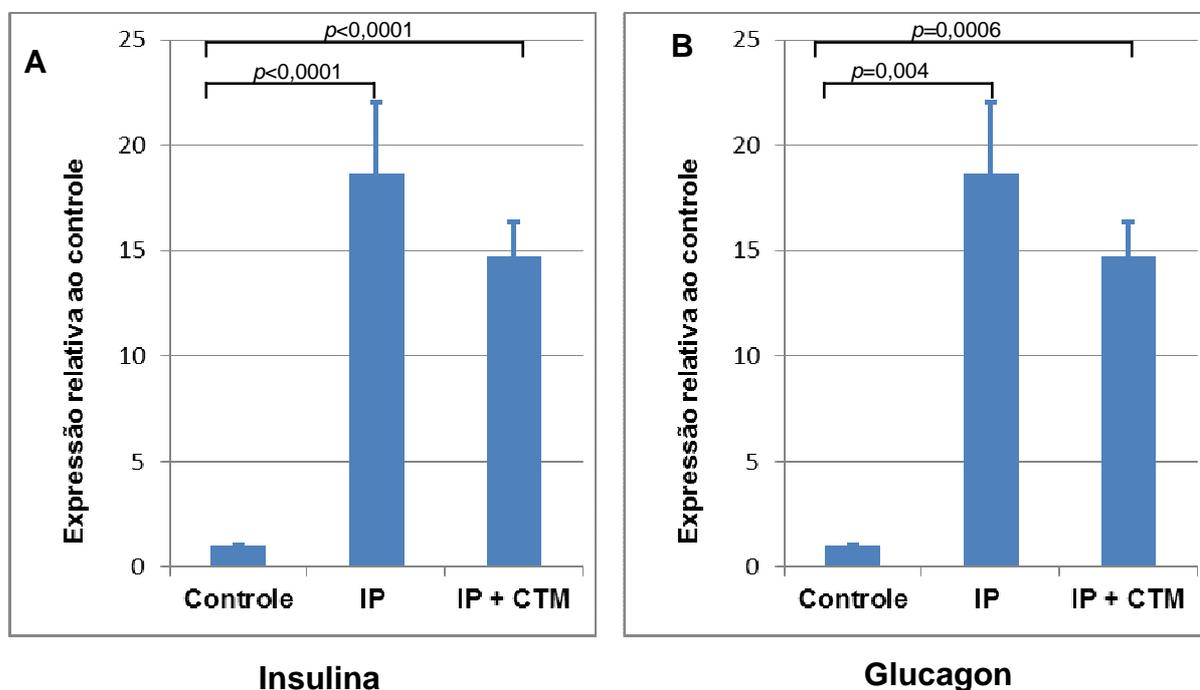
Similarmente ao realizado para o gene GAPDH, a técnica da RT-PCR em tempo real foi utilizada para detectar a expressão dos demais genes alvo em todos os grupos experimentais analisados.

Os genes de insulina e glucagon foram utilizados para avaliar a presença e função das ilhotas pancreáticas implantadas.

A quantificação da expressão dos genes glucagon e insulina foi expressa em valores de  $\Delta\Delta CT$  (Figura 9), utilizando a expressão do gene GAPDH como fator de normalização.

A expressão relativa de insulina e glucagon nos animais transplantados está demonstrada em número médio de vezes que o gene foi expresso em relação aos níveis de expressão do grupo controle. O gene da insulina apresentou uma expressão média superior a 14 vezes nos animais transplantados, em ambos os grupos, os que receberam apenas ilhotas (IP;  $n=5$ ) e aqueles que receberam o

cotransplante de ilhotas mais células mesenquimais (IP+CTM; n=5), quando comparados ao grupo controle (n=6), que não recebeu transplante de ilhotas.



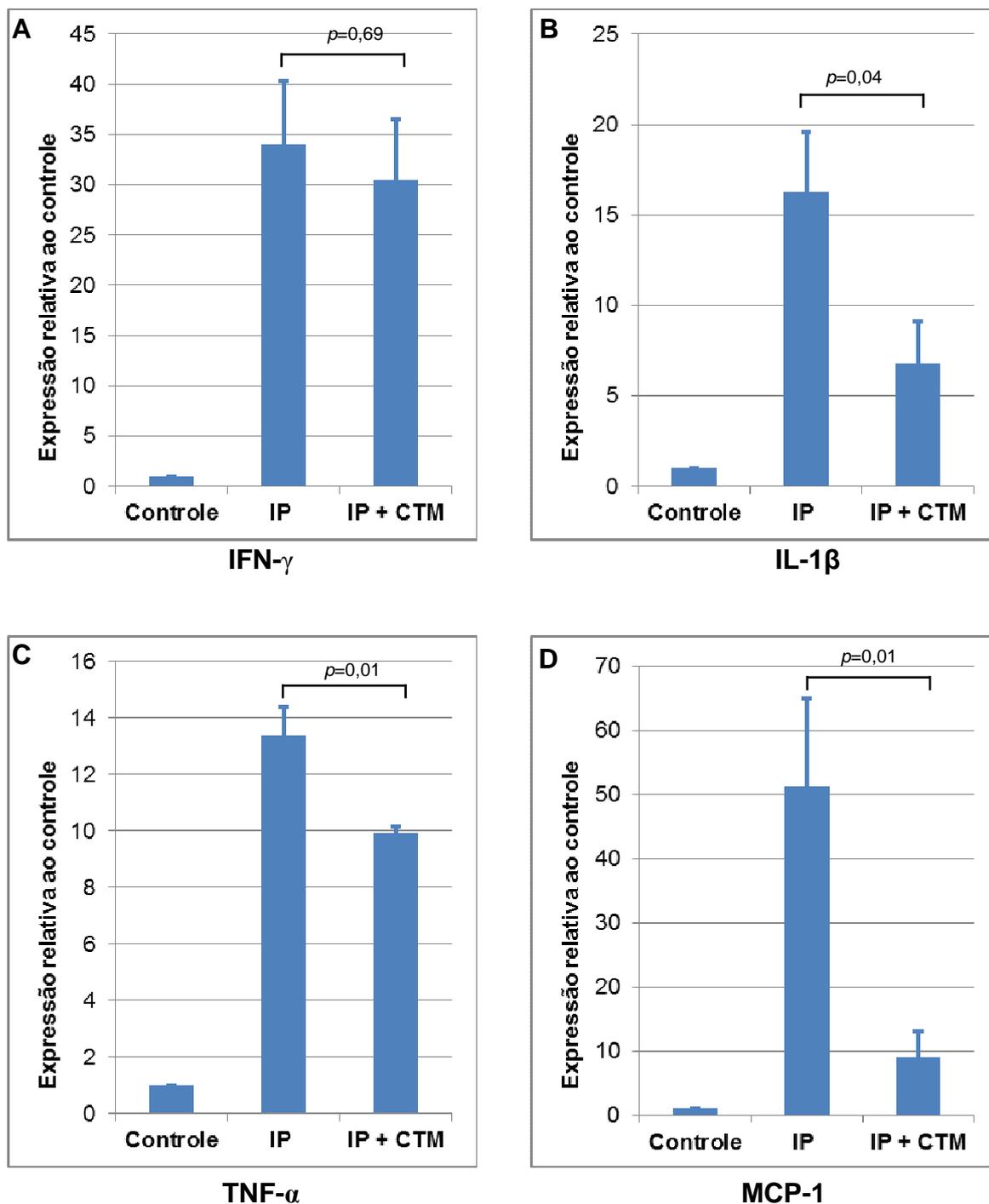
**Figura 9. Expressão dos genes de insulina e glucagon.** Quantificação relativa da expressão dos genes Insulina (A) e Glucagon (B) nas amostras de tecido renal de camundongos NOD (non obese diabetic, diabéticos não obesos) que receberam implante de ilhotas pancreáticas (IP; n=5) ou cotransplante de ilhotas e células-tronco mesenquimais (IP+CTM; n=5) em relação ao grupo controle (n=6), pela técnica de PCR em tempo real, normalizado pelo controle endógeno GAPDH. Valores de expressão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o test t de *Student*. Foi considerada diferença estatística significativa os valores de  $p < 0,05$ .

Não foi observada diferença significativa na expressão de insulina ( $18,6 \pm 3,4$  vs.  $14,7 \pm 1,6$ ;  $p = 0,27$ ) e glucagon ( $10,8 \pm 3,3$  vs.  $8,2 \pm 2,0$ ,  $p = 0,51$ ), entre os grupos 'IP' e 'IP+CTM', respectivamente.

A expressão dos genes de insulina e glucagon demonstram uma atividade das ilhotas implantadas, já que o tecido renal, que recebeu o enxerto, não secreta esses hormônios.

#### 4.4.3 Expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas

A expressão relativa de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e MCP-1 nos animais transplantados está demonstrada em número médio de vezes que o gene foi expresso em relação aos níveis de expressão do grupo controle (Figura 10).



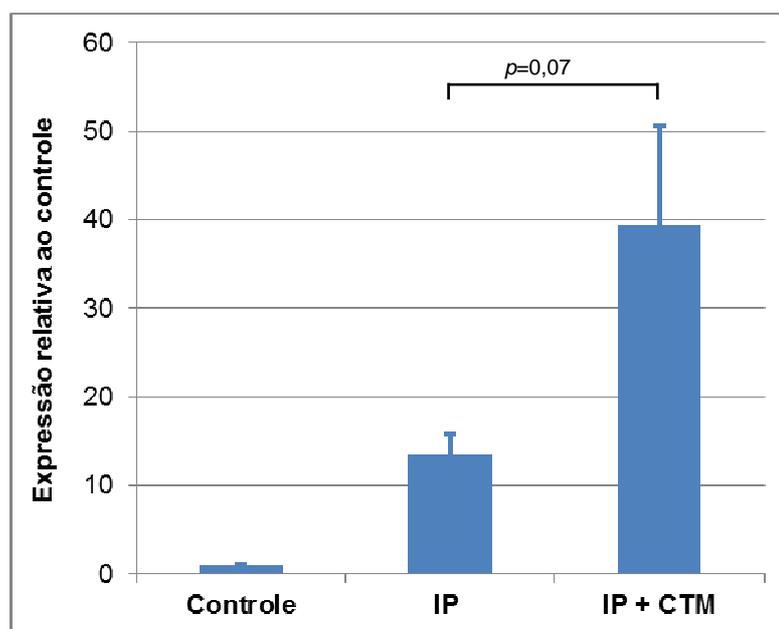
**Figura 10. Expressão dos genes de marcadores pró-inflamatórios.** Quantificação relativa da expressão dos genes Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (A), Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (B), Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (C) e Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (D) nas amostras de tecido renal de camundongos NOD (*non obese diabetic*, diabéticos não obesos) que receberam implante de ilhotas pancreáticas (IP; n=5) ou cotransplante de ilhotas e células-tronco mesenquimais (IP+CTM; n=5) em relação ao grupo controle (n=6), pela técnica de PCR em tempo real, normalizado pelo controle

endógeno GAPDH. Valores de expressão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o test t de *Student*. Foi considerada diferença estatística significativa os valores de  $p < 0,05$ .

Todos os genes foram amplificados, demonstrando a expressão desses marcadores no grupo 'IP' (n=5) e no grupo 'IP+CTM' (n=5). Todos os marcadores apresentaram uma maior expressão no grupo transplantado apenas com ilhotas, sendo esta diferença considerada significativa ( $p < 0,05$ ), exceto para o gene de IFN- $\gamma$ . Este gene apresentou, em relação ao grupo controle, um aumento médio de  $34,1 \pm 15,1$  no grupo 'IP' e  $30,5 \pm 14,8$  no grupo que recebeu o cotransplante (IP+CTM), sendo que a diferença entre os grupos transplantados não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,69$ ).

#### 4.4.4 Expressão de Interleucina-6

A expressão relativa de IL-6 nos animais transplantados está demonstrada em número médio de vezes que o gene foi expresso em relação aos níveis de expressão do grupo controle (Figura 11).



**Figura 11. Expressão do gene da Interleucina-6 (IL-6).** Quantificação relativa da expressão do gene de IL-6 nas amostras de tecido renal de camundongos NOD (*non obese diabetic*, diabéticos não obesos) que receberam implante de ilhotas pancreáticas (IP; n=5) ou cotransplante de ilhotas e células-tronco

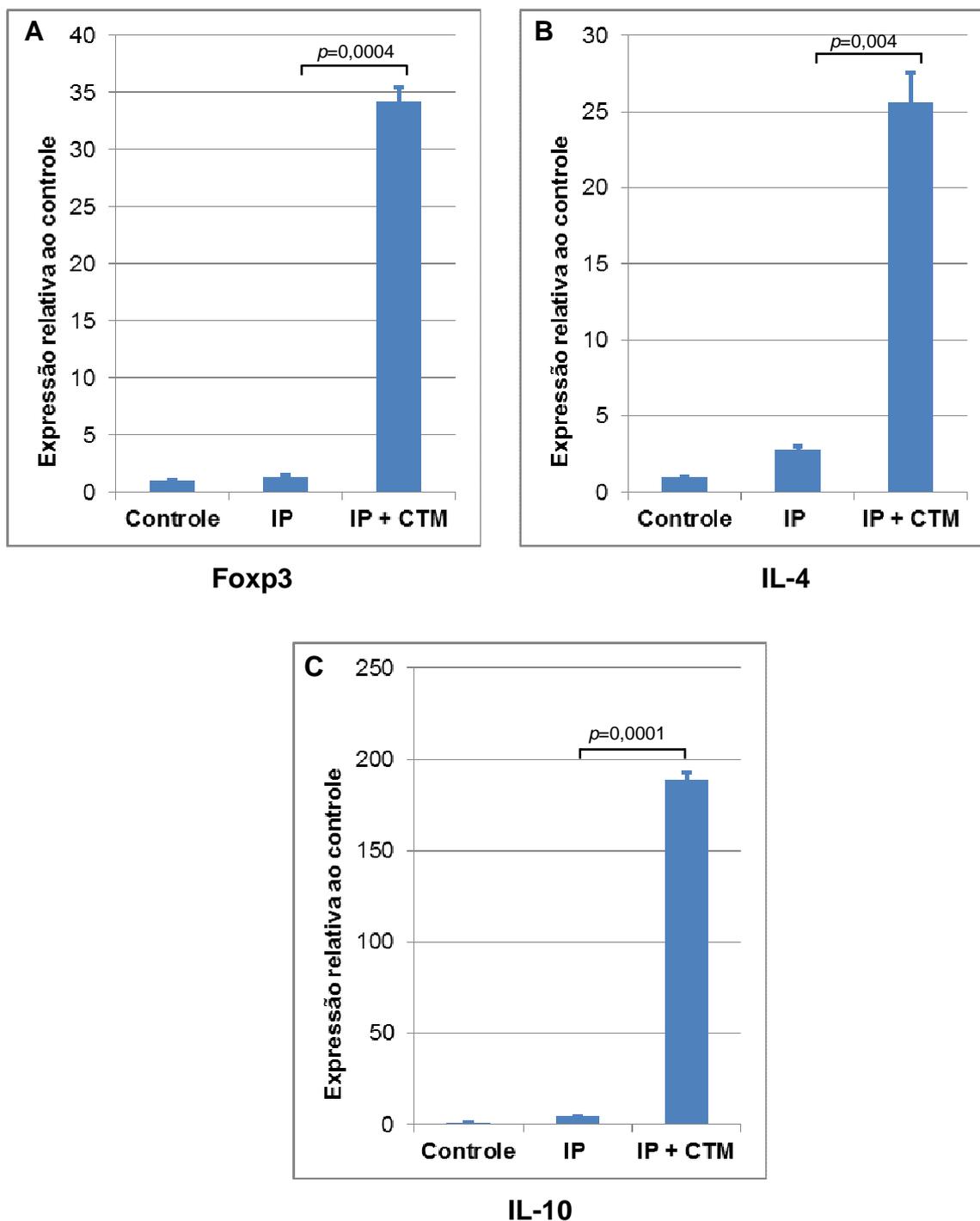
mesenquimais (IP+CTM; n=5) em relação ao grupo controle (n=6), pela técnica de PCR em tempo real, normalizado pelo controle endógeno GAPDH. Valores de expressão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o test t de *Student*. Foi considerada diferença estatística significativa os valores de  $p < 0,05$ .

Não foi observada diferença significativa na expressão de IL-6 ( $13,6 \pm 2,2$  vs.  $39,4 \pm 11,25$ ), entre os grupos 'IP' e 'IP+CTM', respectivamente. O gene da IL-6 apresentou uma tendência a ser mais expresso nos animais que receberam o cotransplante de ilhotas e CTM, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,07$ ).

#### **4.4.5 Expressão de citocinas anti-inflamatórias e do fator nuclear Foxp3**

A expressão relativa de IL-4, IL-10 e do fator de transcrição nuclear Foxp3 está demonstrada em número médio de vezes que o gene foi expresso em relação aos níveis de expressão do grupo controle (Figura 12).

Todos os genes foram amplificados, demonstrando a expressão desses marcadores no grupo 'IP' (n=5) e no grupo 'IP+CTM' (n=5). Todos os marcadores apresentaram uma maior expressão no grupo de animais que receberam o cotransplante (IP+CTM) sendo essa diferença considerada estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 12. Expressão dos genes das citocinas anti-inflamatórias e do fator de transcrição nuclear Foxp3.** Quantificação relativa da expressão dos genes Foxp3 (A), Interleucina-4 (IL-4) (B) e Interleucina-10 (IL-10) (C) nas amostras de tecido renal de camundongos NOD (*non obese diabetic*, diabéticos não obesos) que receberam implante de ilhotas pancreáticas (IP; n=5) ou cotransplante de ilhotas e células-tronco mesenquimais (IP+CTM; n=5) em relação ao grupo controle (n=6), pela técnica de PCR em tempo real, normalizado pelo controle endógeno GAPDH. Valores de expressão apresentados em média  $\pm$  erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o test t de *Student*. Foi considerada diferença estatística significativa os valores de  $p < 0,05$ .

## *Discussão.*

---

## 5 DISCUSSÃO

O transplante alogênico de ilhotas é uma opção minimamente invasiva para a reposição de células  $\beta$  em indivíduos com DM1 complicado, caracterizado por recorrentes eventos de hipoglicemia e/ou por labilidade glicêmica.

Atualmente, o transplante consegue normalizar a glicemia, mas a independência ao uso de insulina é por curto prazo. Apesar disso, mesmo na ausência da independência insulínica, um transplante de ilhotas pode proteger os pacientes de graves episódios de hipoglicemia à medida que uma função residual do enxerto seja mantida, evidenciada pela produção de peptídeo C, que é um marcador utilizado na prática clínica para avaliação da resposta secretora das células  $\beta$  pancreáticas (156). Após 5 anos do transplante, aproximadamente 10% dos pacientes não mantêm a independência à insulina, entretanto, 80% dos receptores continuam produzindo peptídeo C. Barton e colaboradores (157) relataram a partir dos dados do CITR (do inglês *Collaborative Islet Transplant Registry*) que o peptídeo C tem forte correlação com todos os outros resultados primários referentes ao transplante de ilhotas, ou seja, quanto maior o peptídeo C, maior a probabilidade de HbA1c <6,5%, maior a probabilidade de ausência de eventos graves de hipoglicemia, maior a probabilidade de glicemia de jejum na faixa de 60-140 mg/dL, e maior será a probabilidade de independência da insulina.

Em alguns países o transplante de ilhotas tem sido considerado como não-experimental na última década, onde a relação de risco entre a hipoglicemia grave e a imunossupressão foi considerada justificável em pacientes cuidadosamente selecionados. O transplante de ilhotas continua sendo um procedimento experimental na maioria dos países, incluindo Brasil e os Estados Unidos, sendo que este aguarda por resultados formais de ensaios clínicos de Fase III em andamento para justificar sua realização como procedimento padrão para o tratamento do DM1 lábil (157).

As atuais sobrevida curta do enxerto, necessidade de múltiplos doadores e imunossupressão durante toda a sobrevida do enxerto, motivam a busca de novas estratégias e propostas de diferentes grupos em todo o mundo para adequações de protocolos de seleção de pacientes, de isolamento e purificação de ilhotas, de

imunossupressão e de estratégias para minimizar a inflamação pós-transplante e induzir tolerância ao enxerto.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito do cotransplante de ilhotas e células-tronco mesenquimais xenogênicas na prevenção da rejeição do transplante de ilhotas em um modelo experimental de DM1. Mais especificamente, utilizar a terapia celular para induzir a tolerância imunológica às ilhotas transplantadas.

As CTM da medula de ratos Wistar foram isoladas e expandidas em cultivos *in vitro*. Para comprovar a origem mesenquimal, as células foram caracterizadas quanto ao fenótipo de antígenos de superfície e capacidade de diferenciação em linhagens mesenquimais.

Por técnica de citometria de fluxo comprovou-se a expressão nas células isoladas, dos antígenos CD29 e CD73, que são típicos de CTM murinas, e a ausência de CD45, um marcador de célula-tronco hematopoiética (69). Os resultados foram claramente positivos nos ensaios funcionais de diferenciação em linhagens mesenquimais, concluindo-se que estas células tratavam-se realmente de CTM.

As células mesenquimais de diferentes tecidos vêm sendo estudadas em relação ao seu papel imunomodulador nas mais variadas doenças incluindo doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), doença de Crohn e DM1.

Recente estudo demonstrou uma tolerância imunológica ao transplante de ilhotas associadas às células mesenquimais, com supressão da resposta de células T e diminuição de citocinas pró-inflamatórias relacionadas ao processo de rejeição. Para tanto, os autores realizaram as análises em amostras de sangue periférico e de medula óssea (158). Nosso estudo pretendeu mostrar uma resposta local ao transplante, utilizando a técnica de PCR em tempo real.

O modelo experimental utilizado neste estudo, camundongos NOD, desenvolve espontaneamente o diabetes autoimune, servindo como modelo para o DM1 humano. Por se tratar de uma autoimunidade, esse camundongo pode apresentar uma recorrência da doença autoimune de origem, levando à destruição das ilhotas implantadas, além da rejeição propriamente dita. Ou seja, mesmo quando a rejeição do enxerto é prevenida ou quando o transplante isogênico é realizado, as ilhotas podem ser destruídas por um ataque do sistema imunológico, assemelhando-se ao processo anterior do diabetes (159).

Essa resposta inflamatória normalmente está relacionada com a falência precoce do enxerto, definida como a imediata destruição das ilhotas transplantadas, sendo um processo mediado principalmente por macrófagos, que ocorre antes da rejeição imunológica ao enxerto (160-163). Essa teoria foi fundamentada principalmente em estudos de transplantes de ilhotas em animais isogênicos, com DM autoimune, que é o caso dos camundongos NOD. Os animais, que não deveriam rejeitar as ilhotas isogênicas, não atingem a normoglicemia dentro de 3 dias após o transplante quando não recebem imunossupressão (160, 164).

O mesmo observou-se neste estudo, pois todos os animais que receberam apenas o transplante de ilhotas (sem imunossupressão), não tiveram a normalização da glicemia em nenhum momento, como demonstrado na figura 8. Entretanto, os animais submetidos ao tratamento com CTM associada às ilhotas pancreáticas, apresentaram uma breve melhora da glicemia em 6 horas após o transplante. Apesar da normoglicemia não se manter após 24 horas do transplante, sugere-se que as CTM possam proteger as ilhotas dessa falência precoce do enxerto.

Essa proteção pode estar associada com o perfil de secreção de citocinas induzida pelas CTM. No estudo de Faust e colaboradores (160), os camundongos NOD que foram tratados com IL-4 e IL-10 preveniram a perda do enxerto, sendo que os não tratados apresentaram a falência precoce das ilhotas transplantadas. A resposta inflamatória, imediatamente após o transplante, representa um importante fator para a perda da função das ilhotas e é caracterizada por aumento no IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (161, 165).

No presente estudo, os camundongos NOD que receberam CTM juntamente com ilhotas tiveram uma redução da hiperglicemia nas primeiras horas pós-transplante. Essa glicemia voltou a subir nas horas seguintes, o que pode estar relacionado com o número de células implantadas. O protocolo utilizado previu uma implantação de  $1,5 \times 10^4$  CTM associado a 500 ilhotas. Entretanto, mais atualmente foi proposto em um estudo com modelo experimental animal de diabetes induzida por estreptozotocina, uma quantidade de  $3 \times 10^6$  CTM murinas por camundongo C57LB/6 (158) associadas a 200 equivalentes de ilhotas (IEQ – definido pelos autores como uma massa de ilhotas equivalente a 125  $\mu$ m de diâmetro), com normalização da glicemia por quase 1 mês. Deve-se ponderar, ainda, o fato de serem modelos diferentes, pois no presente estudo foram utilizados animais com diabetes autoimune, que como discutido anteriormente, podem apresentar certa

reatividade decorrente da doença autoimune de origem, com consequente destruição das células implantadas.

Por outro lado, é importante ressaltar que essa breve normalização da glicemia, possa ser um indício do papel imunomodulador da CTM. Os animais que receberam o cotransplante de ilhotas e CTM apresentaram expressão gênica de IL-4 e IL-10 superior aos NOD que receberam apenas o transplante de ilhotas ( $p=0,01$  e  $p<0,0001$ , respectivamente). Além disso, houve menor expressão de TNF- $\alpha$  ( $p=0,004$ ) e IL-1 $\beta$  ( $p=0,04$ ) e uma tendência para níveis de expressão mais baixos de IFN- $\gamma$  nos NOD que receberam o cotransplante, reforçando a proteção promovida pelas CTM frente à ação inicial dos macrófagos no processo de destruição das ilhotas transplantadas.

Os macrófagos são as primeiras células a infiltrar as ilhotas pancreáticas, mesmo antes dos linfócitos T, e eles podem secretar citocinas pró-inflamatórias, as quais promovem o recrutamento e ativação de outras células do sistema imunológico. As citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , têm demonstrado, inibir a secreção de insulina e serem citotóxicas para células  $\beta$  pancreáticas (33, 35, 36). Estratégias terapêuticas, no contexto do transplante de ilhotas, que visem diminuir a expressão e atividade de citocinas pró-inflamatórias, e que inibam a atividade de macrófagos, poderiam minimizar a inflamação no local do transplante, principalmente nos primeiros dias que corresponde ao período de *engraftment* e desta forma ajudam a prolongar a sobrevivência das ilhotas transplantadas e manter a independência insulínica por tempo prolongado.

Neste contexto, é importante discorrer também sobre o efeito das CTM sobre as quimiocinas, que são citocinas quimiotáticas, com um importante papel no recrutamento seletivo de monócitos, neutrófilos e linfócitos. Dentre as quimiocinas, destaca-se a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*), que regula a migração e infiltração de monócitos/macrófagos (166). Neste estudo, o grupo de animais que recebeu o cotransplante de ilhotas com CTM, apresentou uma expressão significativamente menor de MCP-1 ( $p=0,03$ ), o que pode explicar parte do mecanismo de ação das CTM na prevenção do processo inflamatório responsável pela perda das ilhotas logo após o transplante.

Há também a sugestão de que o controle da inflamação possa ser obtido com o cotransplante de ilhotas e CTM, pois estas também secretam citocinas anti-

inflamatórias e suprimem a atividade de várias células do sistema imunológico (167, 168). Tem sido documentado que as CTM exercem um efeito imunossupressor nos transplantes de ilhotas alogênicas (169, 170) principalmente sobre os linfócitos T (171, 172), por secretar ou expressar fatores anti-inflamatórios e imunomoduladores (114, 173). Além disso, tem sido demonstrado que esses fatores de crescimento promovem uma maior sobrevivência das ilhotas, e aumentam a função das células  $\beta$  (174).

No presente estudo foi observado o efeito imunorregulatório das CTM no xenotransplante, com maior expressão de marcadores anti-inflamatórios e de tolerância, e menor expressão de citocinas pró-inflamatórias, quando comparado com o grupo que recebeu apenas o transplante de ilhotas. Sugere-se que as CTM possam promover um microambiente que limite a destruição das células beta e ao mesmo tempo module a resposta imunológica local por meio da secreção desses fatores imunorreguladores.

As CTM podem secretar fatores de crescimento que melhoram a sobrevivência dos tecidos, estimulam a angiogênese e facilitam o *engraftment* de tecidos em modelos animais de infarto do miocárdio, diabetes e DECH (167, 168). No campo do transplante de ilhotas, os efeitos tróficos de CTM também foram relatados em roedores e humanos, sugerindo que os fatores secretados pelas CTM aumentam a sobrevivência e a função das células após o transplante, a partir de uma melhor revascularização e regulação imune (175-178).

Apesar de vários estudos que demonstram diferentes vias de imunossupressão das CTM, os mecanismos específicos envolvidos nos efeitos imunossupressores dessas células não estão bem esclarecidos. Tem sido postulado que a rejeição ao transplante esteja relacionada aos efeitos relacionados aos linfócitos Th1 e a tolerância imunológica seja induzida principalmente pelos efeitos dos linfócitos Th2. A tolerância do enxerto ao hospedeiro pode ser conseguida através da indução da diferenciação do linfócito T CD4<sup>+</sup> em célula Th2 (158)

Aggarwal e Pittenger (114) demonstraram que as CTM inibiram a secreção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos Th1 e que a secreção de IL-4 pelos linfócitos Th2 foi elevada. Os resultados do presente estudo indicam que no grupo que recebeu o cotransplante, a secreção de IFN- $\gamma$  foi marcadamente menor e a secreção de IL-4 foi significativamente maior quando comparado ao grupo que recebeu apenas ilhotas,

sugerindo que o cotransplante com as CTM induziu uma modificação das subpopulações de linfócitos nos animais transplantados.

As células T regulatórias (Treg) compõem uma outra subpopulação de linfócitos T, importantes principalmente por seu papel na tolerância imunológica. São células caracterizadas pela expressão da molécula CD25<sup>+</sup> e do fator nuclear Foxp3. Dentre suas formas de ação, estão descritas a indução da supressão das células T efetoras e o bloqueio da ativação e função desses linfócitos (179, 180) que dependem do contato da Treg com a célula efetora. Um outro mecanismo de ação proposto para essas células é a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, que inibe a ativação das células apresentadoras de antígenos e é antagonista do IFN- $\gamma$ , tendo relação com reações de controle da inflamação nos tecidos-alvo (181). Além disso, as Treg podem atuar competindo por fatores de crescimento, em especial a IL-2, com as células-alvo, levando à apoptose celular por privação de citocinas (180).

Neste estudo houve uma marcante expressão de IL-10 pelo grupo que recebeu o cotransplante em comparação ao grupo de ilhotas apenas ( $p < 0001$ ), podendo ser correlacionada, portanto, com uma ação das CTM sobre as Treg.

Alguns estudos tem demonstrado o importante papel supressor das Treg, com evidências de prevenção de rejeição e indução de tolerância em transplantes alogênicos (182-184).

Sendo o Foxp3 um marcador específico das Treg, pode-se inferir, a partir dos resultados deste estudo, onde os níveis de expressão do gene desse fator nuclear foram significativamente maiores no grupo do cotransplante de ilhotas com CTM ( $p = 0,004$ ), que um dos mecanismos das CTM em induzir tolerância nos transplantes alogênicos é via ação das Treg.

A resposta imunológica também está relacionada à interação entre linfócitos e células dendríticas (185). Alguns estudos mostram que as CTM poderiam suprimir a diferenciação e funções das células dendríticas derivadas de monócitos periféricos (186) ou ainda que CTM poderiam agir indiretamente nas células T tendo como mediadoras as células apresentadoras de antígenos. Djouad e colaboradores (187) demonstraram que as CTM inibiram a diferenciação de células dendríticas a partir de um mecanismo dependente de IL-6, sugerindo que esta citocina esteja envolvida com o papel imunorregulatório das CTM. Neste estudo, o gene da IL-6 apresentou

uma tendência a ser mais expresso nos animais que receberam o cotransplante com CTM.

Esses dados oferecem uma visão sobre as interações entre CTM xenogênicas e células do sistema imunológico, bem como os mecanismos que possivelmente estão envolvidos com tolerância, devendo ser considerada como estratégia terapêutica para redução de DECH, rejeição e modulação da inflamação.

O xenotransplante de ilhotas pode ser uma alternativa futura para o tratamento do DM1, mas os estudos pré-clínicos devem investir ainda nas propostas terapêuticas para minimizar essa inflamação que é exacerbada em resposta ao xenoenxerto, destruindo parte importante das ilhotas implantadas. A terapia celular com células mesenquimais talvez possa ser uma das alternativas mais seguras clinicamente, pelo seu papel anti-inflamatório e imunossupressor, além de sua importância na indução da tolerância. Muitos estudos demonstram esses efeitos principalmente no que se refere aos alotransplantes, com evidências ainda que essas células possam auxiliar no *engraftment*.

Além disso, as células mesenquimais podem ser utilizadas para gerar células produtoras de insulina, se colocada em condições apropriadas para essa diferenciação, como demonstrado em estudos realizados pelo nosso grupo (188-190).

Diante do exposto, ressalta-se que são inúmeras as possibilidades para a utilização das células-tronco mesenquimais no campo do diabetes, sendo importante que as pesquisas nessa área continuem a ser realizadas.

*Conclusões.*

---

## 6 CONCLUSÕES

- As CTM de medula óssea de ratos Wistar foram isoladas, cultivadas e expandidas *in vitro* em estado indiferenciado;
- As CTM isoladas e expandidas em estado indiferenciado foram caracterizadas pela imunofenotipagem por citometria de fluxo, demonstrando a expressão dos marcadores CD29 e CD73, típicos de CTM, e a ausência do marcador hematopoético CD45;
- As CTM isoladas foram capazes de diferenciar nas linhagens celulares osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas, demonstrando a sua capacidade multipotencial de diferenciação;
- A capacidade funcional das ilhotas foi demonstrada pela expressão dos genes insulina e glucagon nos animais que receberam o transplante de ilhotas e o cotransplante;
- Na análise por PCR em tempo real, detectou-se uma menor expressão dos genes de marcadores inflamatórios relacionados à rejeição, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e MCP-1, nos animais que receberam o cotransplante de ilhotas, não havendo diferença entre os grupos para a expressão dos genes IFN- $\gamma$  e IL-6.
- O cotransplante de ilhotas e CTM induziu a expressão de genes relacionados à tolerância imunológica, como as citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 e o fator de transcrição Foxp3, marcador específico das células Treg, analisados por PCR em tempo real.
- Os resultados obtidos evidenciam o papel imunomodulador das CTM no xenotransplante de ilhotas sugerindo que essas células-tronco têm potencial para amenizar em curto prazo as perdas de enxertos devido ao processo

inflamatório do transplante. Além disso, os dados sugerem que a infusão de CTM xenogênicas possam induzir tolerância imunológica, desejada nos transplantes alo e xenogênicos.

## *Referências.*

---

## REFERÊNCIAS

1. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1998;15(7):539-53. Epub 1998/08/01.
2. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2009;32 Suppl 1:S62-7. Epub 2009/01/06.
3. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*. 2004;27(5):1047-53. Epub 2004/04/28.
4. Diabetes SBd. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2009.
5. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001;358(9277):221-9. Epub 2001/07/31.
6. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 2004;328(7442):750-4. Epub 2004/03/27.
7. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 1983;222(4630):1337-9. Epub 1983/12/23.
8. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*. 1990;347(6289):151-6. Epub 1990/09/13.
9. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, et al. Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J Immunol*. 1994;152(6):3183-8. Epub 1994/03/15.
10. Gorus FK, Goubert P, Semakula C, Vandewalle CL, De Schepper J, Scheen A, et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. *The Belgian Diabetes Registry. Diabetologia*. 1997;40(1):95-9. Epub 1997/01/01.
11. Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes*. 1993;42(2):359-62. Epub 1993/02/01.
12. Fourlanos S, Dotta F, Greenbaum CJ, Palmer JP, Rolandsson O, Colman PG, et al. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetologia*. 2005;48(11):2206-12. Epub 2005/09/30.
13. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(9):1247-52. Epub 2001/11/07.
14. Group TDCaCTR. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The New England journal of medicine*. 1993;329(14):977-86. Epub 1993/09/30.
15. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20. Epub 2001/12/14.

16. Ritz E, Schomig M. The diabetic patient with renal failure. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. 2000;20 Suppl 3:16-24. Epub 2000/06/03.
17. 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. *Clinical transplantation*. 2005;19(4):433-55. Epub 2005/07/13.
18. Takita M, Matsumoto S, Noguchi H, Shimoda M, Ikemoto T, Chujo D, et al. Adverse events in clinical islet transplantation: one institutional experience. *Cell transplantation*. 2012;21(2-3):547-51. Epub 2012/07/17.
19. Lacy PE. Islet cell transplantation. *The Proceedings of the Institute of Medicine of Chicago*. 1982;35(2):40-2. Epub 1982/04/01.
20. Ryan EA, Lakey JR, Shapiro AM. Clinical results after islet transplantation. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2001;49(6):559-62. Epub 2001/12/04.
21. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *The New England journal of medicine*. 2006;355(13):1318-30. Epub 2006/09/29.
22. Robertson RP. Pancreatic islet transplantation for diabetes: successes, limitations, and challenges for the future. *Molecular genetics and metabolism*. 2001;74(1-2):200-5. Epub 2001/10/11.
23. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005;54(7):2060-9. Epub 2005/06/29.
24. Alejandro R, Barton FB, Hering BJ, Wease S. 2008 Update from the Collaborative Islet Transplant Registry. *Transplantation*. 2008;86(12):1783-8. Epub 2008/12/24.
25. Senior PA, Zeman M, Paty BW, Ryan EA, Shapiro AM. Changes in renal function after clinical islet transplantation: four-year observational study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007;7(1):91-8. Epub 2007/01/18.
26. Maffi P, Bertuzzi F, De Taddeo F, Magistretti P, Nano R, Fiorina P, et al. Kidney function after islet transplant alone in type 1 diabetes: impact of immunosuppressive therapy on progression of diabetic nephropathy. *Diabetes care*. 2007;30(5):1150-5. Epub 2007/01/30.
27. Rickels MR, Kearns J, Markmann E, Palanjian M, Markmann JF, Naji A, et al. HLA sensitization in islet transplantation. *Clinical transplants*. 2006:413-20. Epub 2008/03/28.
28. Campbell PM, Senior PA, Salam A, Labranche K, Bigam DL, Kneteman NM, et al. High risk of sensitization after failed islet transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007;7(10):2311-7. Epub 2007/09/12.
29. Cardani R, Pileggi A, Ricordi C, Gomez C, Baidal DA, Ponte GG, et al. Allosensitization of islet allograft recipients. *Transplantation*. 2007;84(11):1413-27. Epub 2007/12/20.
30. Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2005;293(7):830-5. Epub 2005/02/17.

31. Bellin MD, Kandaswamy R, Parkey J, Zhang HJ, Liu B, Ihm SH, et al. Prolonged insulin independence after islet allotransplants in recipients with type 1 diabetes. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(11):2463-70. Epub 2008/09/24.
32. 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. *Transplantation proceedings*. 2004;36(4):1117-8. Epub 2004/06/15.
33. Matsuda T, Omori K, Vuong T, Pascual M, Valiente L, Ferreri K, et al. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(3):484-93. Epub 2005/02/15.
34. Moberg L, Johansson H, Lukinius A, Berne C, Foss A, Kallen R, et al. Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet*. 2002;360(9350):2039-45. Epub 2002/12/31.
35. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*. 1996;39(9):1005-29. Epub 1996/09/01.
36. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochemical pharmacology*. 1998;55(8):1139-49. Epub 1998/08/27.
37. Graves T. Improving islet transplantation. *The Scientist Magazine*. 2006;May(1).
38. Rother KI, Harlan DM. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(7):877-83. Epub 2004/10/07.
39. Montori VM, Basu A, Erwin PJ, Velosa JA, Gabriel SE, Kudva YC. Posttransplantation diabetes: a systematic review of the literature. *Diabetes care*. 2002;25(3):583-92. Epub 2002/03/05.
40. Linn T, Schmitz J, Hauck-Schmalenberger I, Lai Y, Bretzel RG, Brandhorst H, et al. Ischaemia is linked to inflammation and induction of angiogenesis in pancreatic islets. *Clinical and experimental immunology*. 2006;144(2):179-87. Epub 2006/04/26.
41. Mahmoud IM, Gabr MM, Refaie AF, el-Baz MA, Bakr MA, Ghoneim MA. Purified murine islet allografts: islet engraftment as influenced by implantation site and glucotoxicity. *Transplantation proceedings*. 1998;30(2):369-72. Epub 1998/04/09.
42. Balamurugan AN, Bottino R, Giannoukakis N, Smetanka C. Prospective and challenges of islet transplantation for the therapy of autoimmune diabetes. *Pancreas*. 2006;32(3):231-43. Epub 2006/04/22.
43. Nanji SA, Shapiro AM. Islet transplantation in patients with diabetes mellitus: choice of immunosuppression. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2004;18(5):315-28. Epub 2004/09/21.
44. Evgenov NV, Medarova Z, Pratt J, Pantazopoulos P, Leyting S, Bonner-Weir S, et al. In vivo imaging of immune rejection in transplanted pancreatic islets. *Diabetes*. 2006;55(9):2419-28. Epub 2006/08/29.
45. Makhlof L, Kishimoto K, Smith RN, Abdi R, Koulmanda M, Winn HJ, et al. The role of autoimmunity in islet allograft destruction: major histocompatibility complex class II matching is necessary for autoimmune destruction of allogeneic islet

- transplants after T-cell costimulatory blockade. *Diabetes*. 2002;51(11):3202-10. Epub 2002/10/29.
46. Huang X, Moore DJ, Ketchum RJ, Nunemaker CS, Kovatchev B, McCall AL, et al. Resolving the conundrum of islet transplantation by linking metabolic dysregulation, inflammation, and immune regulation. *Endocrine reviews*. 2008;29(5):603-30. Epub 2008/07/31.
47. Jahansouz C, Kumer SC, Brayman KL. Evolution of beta-Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus: Islet Cell Transplantation. *Journal of transplantation*. 2011;2011:247959. Epub 2011/10/21.
48. Donath MY, Storling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. *Endocrine reviews*. 2008;29(3):334-50. Epub 2007/12/01.
49. Li F, Mahato RI. RNA interference for improving the outcome of islet transplantation. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(1-2):47-68. Epub 2010/12/16.
50. Giuliani M, Moritz W, Bodmer E, Dindo D, Kugelmeier P, Lehmann R, et al. Central necrosis in isolated hypoxic human pancreatic islets: evidence for postisolation ischemia. *Cell transplantation*. 2005;14(1):67-76. Epub 2005/03/26.
51. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57. Epub 1972/08/01.
52. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis\*. *Annual review of genetics*. 2009;43:95-118. Epub 2009/08/08.
53. Maria-Engler SS, Mares-Guia M, Correa ML, Oliveira EM, Aita CA, Krogh K, et al. Microencapsulation and tissue engineering as an alternative treatment of diabetes. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2001;34(6):691-7. Epub 2001/05/30.
54. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980;210(4472):908-10. Epub 1980/11/21.
55. Basta G, Montanucci P, Luca G, Boselli C, Noya G, Barbaro B, et al. Long-term metabolic and immunological follow-up of nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes treated with microencapsulated islet allografts: four cases. *Diabetes care*. 2011;34(11):2406-9. Epub 2011/09/20.
56. Kitzmann JP, Law L, Shome A, Muzina M, Elliott RB, Mueller KR, et al. Real-time assessment of encapsulated neonatal porcine islets prior to clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2012;19(6):333-6. Epub 2012/10/24.
57. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg*. 2004;139(1):93-9. Epub 2004/01/14.
58. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7. Epub 1998/11/06.
59. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *The Journal of pathology*. 2009;217(2):144-60. Epub 2008/12/17.
60. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell transplantation*. 2010;19(6):667-79. Epub 2010/06/08.
61. English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell stem cell*. 2010;7(4):431-42. Epub 2010/10/05.

62. Sakata N, Goto M, Yoshimatsu G, Egawa S, Unno M. Utility of co-transplanting mesenchymal stem cells in islet transplantation. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17(47):5150-5. Epub 2012/01/05.
63. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology*. 2009;217(2):318-24. Epub 2008/11/22.
64. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4. Epub 1997/04/04.
65. Owen M. Marrow stromal stem cells. *Journal of cell science Supplement*. 1988;10:63-76. Epub 1988/01/01.
66. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5. Epub 2005/10/21.
67. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology*. 1974;2(2):83-92. Epub 1974/01/01.
68. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-47. Epub 1968/03/01.
69. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992;13(1):69-80. Epub 1992/01/01.
70. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G, Patterson B, Broxmeyer HE, et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood*. 1994;83(9):2489-97. Epub 1994/05/01.
71. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95. Epub 2002/12/12.
72. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287(5457):1433-8. Epub 2000/02/26.
73. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13473-5. Epub 2000/11/23.
74. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(5):1522-32. Epub 2004/05/18.
75. Miller JB, Schaefer L, Dominov JA. Seeking muscle stem cells. *Current topics in developmental biology*. 1999;43:191-219. Epub 1999/01/19.
76. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2001;344(23):1750-7. Epub 2001/06/09.
77. Duret C, Gerbal-Chaloin S, Ramos J, Fabre JM, Jacquet E, Navarro F, et al. Isolation, characterization, and differentiation to hepatocyte-like cells of nonparenchymal epithelial cells from adult human liver. *Stem Cells*. 2007;25(7):1779-90. Epub 2007/04/07.
78. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *The American journal of pathology*. 2005;166(2):545-55. Epub 2005/02/01.

79. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*. 2006;8(4):315-7. Epub 2006/08/23.
80. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology*. 2000;28(8):875-84. Epub 2000/09/16.
81. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7. Epub 1999/04/02.
82. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *Journal of biomedical science*. 2005;12(1):47-57. Epub 2005/05/03.
83. Wan CD, Cheng R, Wang HB, Liu T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2008;7(1):29-33. Epub 2008/02/01.
84. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(5):697-705. Epub 1999/03/13.
85. Lee JH, Kemp DM. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;341(3):882-8. Epub 2006/01/31.
86. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, et al. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue engineering*. 1999;5(3):267-77. Epub 1999/08/06.
87. Jeon SJ, Oshima K, Heller S, Edge AS. Bone marrow mesenchymal stem cells are progenitors in vitro for inner ear hair cells. *Molecular and cellular neurosciences*. 2007;34(1):59-68. Epub 2006/11/23.
88. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*. 2000;61(4):364-70. Epub 2000/08/10.
89. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(10):1291-302. Epub 2002/05/22.
90. Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells*. 2007;25(11):2837-44. Epub 2007/07/07.
91. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry*. 1997;64(2):278-94. Epub 1997/02/01.
92. de Girolamo L, Lucarelli E, Alessandri G, Avanzini MA, Bernardo ME, Biagi E, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Group (GISM): A New "Cells as Drugs" Paradigm. Efficacy and Critical Aspects in Cell Therapy. *Current pharmaceutical design*. 2013;19(13):2459-73. Epub 2013/01/03.
93. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JA, Jacobsohn D, Broadwater G, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host

disease in a compassionate use study. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2011;17(4):534-41. Epub 2010/05/12.

94. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(24):2277-86. Epub 2009/12/05.

95. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*. 2010;67(10):1187-94. Epub 2010/10/13.

96. Haleem AM, Singergy AA, Sabry D, Atta HM, Rashed LA, Chu CR, et al. The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage*. 2010;1(4):253-61. Epub 2010/12/21.

97. Wright KT, El Masri W, Osman A, Chowdhury J, Johnson WE. Concise review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. *Stem Cells*. 2011;29(2):169-78. Epub 2011/07/07.

98. Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, et al. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem cells and development*. 2010;19(4):423-38. Epub 2009/12/05.

99. Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, Deng Y, Lai PF, Slutsky AS, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(8):1047-57. Epub 2010/06/19.

100. Matthay MA, Goolaerts A, Howard JP, Lee JW. Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence. *Critical care medicine*. 2010;38(10 Suppl):S569-73. Epub 2011/01/05.

101. 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;57(7):1759-67. Epub 2008/07/01.

102. Vija L, Farge D, Gautier JF, Vexiau P, Dumitrache C, Bourgarit A, et al. Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. *Diabetes & metabolism*. 2009;35(2):85-93. Epub 2009/02/24.

103. Jurewicz M, Yang S, Augello A, Godwin JG, Moore RF, Azzi J, et al. Congenic mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes. *Diabetes*. 2010;59(12):3139-47. Epub 2010/09/16.

104. La Manna G, Bianchi F, Cappuccilli M, Cenacchi G, Tarantino L, Pasquinelli G, et al. Mesenchymal stem cells in renal function recovery after acute kidney injury: use of a differentiating agent in a rat model. *Cell transplantation*. 2011;20(8):1193-208. Epub 2010/11/26.

105. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99. Epub 2008/06/21.

106. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells*. 2009;27(3):670-81. Epub 2009/03/10.

107. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell stem cell*. 2009;4(3):206-16. Epub 2009/03/07.
108. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003;101(9):3722-9. Epub 2002/12/31.
109. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*. 2003;57(1):11-20. Epub 2003/01/25.
110. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. 2003;76(8):1208-13. Epub 2003/10/28.
111. Lin Y, Hogan WJ. Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment and Prevention of Graft-versus-Host Disease. *Advances in hematology*. 2011;2011:427863. Epub 2011/12/23.
112. Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003;102(10):3837-44. Epub 2003/07/26.
113. Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohemagglutinin-activated lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology*. 2004;60(3):307-15. Epub 2004/08/24.
114. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22. Epub 2004/10/21.
115. Bassi EJ, Aita CA, Camara NO. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World journal of stem cells*. 2011;3(1):1-8. Epub 2011/05/25.
116. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology letters*. 2007;110(2):91-100. Epub 2007/05/18.
117. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology*. 2007;149(2):353-63. Epub 2007/05/25.
118. Huang YL, Wang YZ, Chen JB, Wang F, Kang XP, Xia JJ, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection by combinations of tolerogenic dendritic cells. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;73(2):91-101. Epub 2011/01/05.
119. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43. Epub 2002/05/03.
120. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105(7):2821-7. Epub 2004/12/14.
121. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Experimental hematology*. 2005;33(8):928-34. Epub 2005/07/26.
122. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-

specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005;90(4):516-25. Epub 2005/04/12.

123. Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, Imberti B, Morigi M, Cugini D, et al. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol*. 2008;181(6):3933-46. Epub 2008/09/05.

124. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*. 2002;30(1):42-8. Epub 2002/02/02.

125. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005;105(5):2214-9. Epub 2004/10/30.

126. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-97. Epub 2003/02/18.

127. Zhang W, Ge W, Li CH, You SG, Han Q, Deng WM, et al. [Inhibition effect of bone marrow mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation through up-regulation of CD8+CD28- T cells]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology*. 2004;12(5):666-9. Epub 2004/10/23.

128. Chen K, Wang D, Du WT, Han ZB, Ren H, Chi Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol*. 2010;135(3):448-58. Epub 2010/03/09.

129. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. 2009;113(26):6576-83. Epub 2009/04/29.

130. Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol*. 2010;185(1):302-12. Epub 2010/06/01.

131. Trenado A, Sudres M, Tang Q, Maury S, Charlotte F, Gregoire S, et al. Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J Immunol*. 2006;176(2):1266-73. Epub 2006/01/06.

132. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clinical and experimental immunology*. 2009;156(1):149-60. Epub 2009/02/13.

133. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol*. 2010;184(10):5885-94. Epub 2010/04/13.

134. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(4):459-68. Epub 2002/08/21.

135. Yoo KH, Jang IK, Lee MW, Kim HE, Yang MS, Eom Y, et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cellular immunology*. 2009;259(2):150-6. Epub 2009/07/18.
136. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'Huillie A, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009;27(8):1954-62. Epub 2009/06/23.
137. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell*. 2008;2(2):141-50. Epub 2008/03/29.
138. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007;109(1):228-34. Epub 2006/09/21.
139. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunological reviews*. 2009;229(1):114-25. Epub 2009/05/12.
140. Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental hematology*. 2009;37(5):604-15. Epub 2009/04/21.
141. Tondreau T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Delforge A, Dejeneffe M, et al. In vitro study of matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase production by mesenchymal stromal cells in response to inflammatory cytokines: the role of their migration in injured tissues. *Cytotherapy*. 2009;11(5):559-69. Epub 2009/06/25.
142. Raimondi G, Thomson AW. Dendritic cells, tolerance and therapy of organ allograft rejection. *Contributions to nephrology*. 2005;146:105-20. Epub 2004/11/30.
143. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52. Epub 1998/04/01.
144. LaRosa DF, Rahman AH, Turka LA. The innate immune system in allograft rejection and tolerance. *J Immunol*. 2007;178(12):7503-9. Epub 2007/06/06.
145. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120-6. Epub 2005/02/05.
146. Bueno V, Pestana JOM. Revisão/Atualização em Transplante Renal: Xenotransplante. *J Bras Nefrol*. 1996;18(3):302-6.
147. Cozzi E, Bosio E. Islet xenotransplantation: current status of preclinical studies in the pig-to-nonhuman primate model. *Current opinion in organ transplantation*. 2008;13(2):155-8. Epub 2008/08/08.
148. Cardona K, Milas Z, Strobert E, Cano J, Jiang W, Safley SA, et al. Engraftment of adult porcine islet xenografts in diabetic nonhuman primates through targeting of costimulation pathways. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007;7(10):2260-8. Epub 2007/09/12.
149. Hering BJ, Cooper DK, Cozzi E, Schuurman HJ, Korbitt GS, Denner J, et al. The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes--executive summary. *Xenotransplantation*. 2009;16(4):196-202. Epub 2009/10/06.
150. Hering BJ, Walawalkar N. Pig-to-nonhuman primate islet xenotransplantation. *Transplant immunology*. 2009;21(2):81-6. Epub 2009/05/12.
151. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British journal of haematology*. 2003;123(4):702-11. Epub 2003/11/18.

152. González Jara P, Aita CAM. Análise da expressão de marcadores de diferenciação endócrina pancreática em células-tronco mesenquimais de medula óssea de rato tratadas com prolactina. Curitiba-PR: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2009.
153. Sutton R, Peters M, McShane P, Gray DW, Morris PJ. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. *Transplantation*. 1986;42(6):689-91. Epub 1986/12/01.
154. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45. Epub 2001/05/09.
155. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16.
156. Ryan EA, Shandro T, Green K, Paty BW, Senior PA, Bigam D, et al. Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes*. 2004;53(4):955-62. Epub 2004/03/30.
157. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes care*. 2012;35(7):1436-45. Epub 2012/06/23.
158. Li FR, Wang XG, Deng CY, Qi H, Ren LL, Zhou HX. Immune modulation of co-transplantation mesenchymal stem cells with islet on T and dendritic cells. *Clinical and experimental immunology*. 2010;161(2):357-63. Epub 2010/05/12.
159. Assalino M, Genevay M, Morel P, Demuylder-Mischler S, Toso C, Berney T. Recurrence of type 1 diabetes after simultaneous pancreas-kidney transplantation in the absence of GAD and IA-2 autoantibodies. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(2):492-5. Epub 2011/12/14.
160. Faust A, Rothe H, Schade U, Lampeter E, Kolb H. Primary nonfunction of islet grafts in autoimmune diabetic nonobese diabetic mice is prevented by treatment with interleukin-4 and interleukin-10. *Transplantation*. 1996;62(5):648-52. Epub 1996/09/15.
161. Barshes NR, Wyllie S, Goss JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *Journal of leukocyte biology*. 2005;77(5):587-97. Epub 2005/02/25.
162. Deng S, Ketchum RJ, Kucher T, Weber M, Naji A, Brayman KL. Primary nonfunction of islet xenografts in rat recipients results from non-T-cell-mediated immune responses. *Transplantation proceedings*. 1997;29(3):1726-7. Epub 1997/05/01.
163. Deng S, Ketchum RJ, Kucher T, Weber M, Naji A, Brayman KL. NK cells, macrophages, and humoral immune responses are dominant in primary nonfunction of islet grafts in the dog-to-rat xenotransplant model. *Transplantation proceedings*. 1997;29(4):2062-3. Epub 1997/06/01.
164. Gysemans CA, Waer M, Valckx D, Laureys JM, Mihkalsky D, Bouillon R, et al. Early graft failure of xenogeneic islets in NOD mice is accompanied by high levels of interleukin-1 and low levels of transforming growth factor-beta mRNA in the grafts. *Diabetes*. 2000;49(12):1992-7. Epub 2000/12/16.
165. Bottino R, Fernandez LA, Ricordi C, Lehmann R, Tsan MF, Oliver R, et al. Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes*. 1998;47(3):316-23. Epub 1998/03/31.

166. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(6):313-26. Epub 2009/05/16.
167. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896-902. Epub 2007/09/29.
168. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739-49. Epub 2007/07/28.
169. Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, Rota C, Morigi M, Remuzzi G, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplantation proceedings*. 2009;41(5):1797-800. Epub 2009/06/24.
170. Solari MG, Srinivasan S, Boumaza I, Unadkat J, Harb G, Garcia-Ocana A, et al. Marginal mass islet transplantation with autologous mesenchymal stem cells promotes long-term islet allograft survival and sustained normoglycemia. *Journal of autoimmunity*. 2009;32(2):116-24. Epub 2009/02/17.
171. Aksu AE, Horibe E, Sacks J, Ikeguchi R, Breiting J, Scozio M, et al. Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. *Clin Immunol*. 2008;127(3):348-58. Epub 2008/04/05.
172. Boumaza I, Srinivasan S, Witt WT, Feghali-Bostwick C, Dai Y, Garcia-Ocana A, et al. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. *Journal of autoimmunity*. 2009;32(1):33-42. Epub 2008/12/09.
173. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;98(5):1076-84. Epub 2006/04/19.
174. Lim JY, Min BH, Kim BG, Shin JS, Park CS, Yoon TW, et al. Combinations of growth factors enhance the potency of islets in vitro. *Pancreas*. 2009;38(4):447-53. Epub 2009/03/05.
175. Luo L, Badiavas E, Luo JZ, Maizel A. Allogeneic bone marrow supports human islet beta cell survival and function over six months. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;361(4):859-64. Epub 2007/08/10.
176. Johansson U, Rasmusson I, Niclou SP, Forslund N, Gustavsson L, Nilsson B, et al. Formation of composite endothelial cell-mesenchymal stem cell islets: a novel approach to promote islet revascularization. *Diabetes*. 2008;57(9):2393-401. Epub 2008/06/04.
177. Park KS, Kim YS, Kim JH, Choi B, Kim SH, Tan AH, et al. Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. *Transplantation*. 2010;89(5):509-17. Epub 2010/02/04.
178. Duprez IR, Johansson U, Nilsson B, Korsgren O, Magnusson PU. Preparatory studies of composite mesenchymal stem cell islets for application in intraportal islet transplantation. *Upsala journal of medical sciences*. 2011;116(1):8-17. Epub 2010/11/06.
179. Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(4):305-10. Epub 2007/03/24.

180. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008;124(1):13-22. Epub 2008/03/19.
181. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(2):227-35; quiz 36-7. Epub 2007/08/02.
182. Chai JG, Xue SA, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D, et al. Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation*. 2005;79(10):1310-6. Epub 2005/05/25.
183. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews*. 2001;182:18-32. Epub 2001/11/28.
184. Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(10):1398-403. Epub 2004/11/17.
185. Lutz MB, Kurts C. Induction of peripheral CD4+ T-cell tolerance and CD8+ T-cell cross-tolerance by dendritic cells. *European journal of immunology*. 2009;39(9):2325-30. Epub 2009/08/25.
186. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007;83(1):71-6. Epub 2007/01/16.
187. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007;25(8):2025-32. Epub 2007/05/19.
188. Silva AC, Percegon LS, Franca AL, Dos Santos TM, Perini CC, Gonzalez P, et al. Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Transplantation proceedings*. 2012;44(8):2495-6. Epub 2012/10/03.
189. Gonzalez P, Santos TM, Calil A, Corradi Perini C, Percegon LS, Silva IC, et al. Expression of pancreatic endocrine markers by prolactin-treated rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Transplantation proceedings*. 2010;42(2):566-9. Epub 2010/03/23.
190. Santos TM, Percegon LS, Gonzalez P, Calil A, Corradi Perini C, Faucz FR, et al. Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal stem cells from human umbilical cord vein. *Transplantation proceedings*. 2010;42(2):563-5. Epub 2010/03/23.