

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

PATRICIA GONZÁLEZ JARA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO
ENDÓCRINA PANCREÁTICA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
MEDULA ÓSSEA DE RATO TRATADAS COM PROLACTINA**

**CURITIBA
2009**

PATRICIA GONZÁLEZ JARA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO
ENDÓCRINA PANCREÁTICA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
MEDULA ÓSSEA DE RATO TRATADAS COM PROLACTINA**

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

Orientador: Prof. Carlos Alberto Mayora Aita

**CURITIBA
2009**



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

Aos nove dias do mês de fevereiro de 2009, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação "ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA PANCREÁTICA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA DE RATO TRATADAS COM PROLACTINA" apresentada por PATRICIA GONZÁLEZ JARA para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita PUCPR	
Profª. Drª. Andréa Novais Moreno PUCPR	
Prof. Dr. Fernando Henrique Lojudice da Silva USP	

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

Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita

Conceito: APROVADO

Profª. Drª. Andréa Novais Moreno

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Fernando Henrique Lojudice da Silva

Conceito: Aprovado

Conceito Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

À minha equipe de ilhotas, pela genial acolhida, grande entusiasmo e apoio para que isto fosse possível.

Aos meus pais pela educação e confiança que sempre tiveram em mim.

Ao Andrés, pelo seu amor e apoio incondicionais de sempre.

À minha filha Daniela, pela paciência e por permitir as horas de dedicação em troca de suas brincadeiras.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita, meu orientador, que desde o início me brindou a sua cálida acolhida, disponibilizou todas as ferramentas necessárias, sua experiência e tempo, possibilitando a realização desta tese. Agradeço a sua presença permanente e seus conselhos sempre que eu precisei.

Ao Prof. Dr. Miguel Carlos Riella, pelo incentivo e apoio para a formação de um grupo de pesquisadores na PUC-PR, na área de diabetes.

Ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, da USP pela colaboração, apoio e por permitir esta parceria.

Às minhas queridas amigas e companheiras de laboratório, Thatiana, Carla, Aline, Ire, Elaine, Karina e Kharol por toda a cooperação, apoio e humanidade que me brindaram e fizeram da minha estadia uma fase muito feliz. Em especial, agradeço a Ire, Carlos, Carla, Thatiana e suas famílias que com esforço trabalharam na adaptação do nosso laboratório.

À Alejandro, Alessandra, Patrícia, Crisciele do Instituto de Biologia Molecular de Paraná (IBMP) pela colaboração nos experimentos e por permitirem e facilitarem a realização dos experimentos de isolamento dos clusters e PCR em tempo real.

À Ana Paula e Marina do Laboratório de Anatomia Patológica pela sua colaboração no preparo das lâminas histológicas.

Às colegas do Núcleo de Miocardioplastia Celular da PUCPR Alexandra, Carmem, Paula, Fabiane, obrigada pelos inúmeros favores.

Ao Dr. Repka e aos colegas Julio e João, por a sua importante aporte de conhecimentos no manejo dos animais.

A todos que de alguma maneira participaram em este projeto, obrigada pela gentileza e boa vontade.

APOIO FINANCEIRO

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

RESUMO

Introdução: a busca de uma fonte renovável e de fácil obtenção, de células com capacidade de produção e secreção de insulina de modo regulado, para reposição das células β perdidas no Diabetes Mellito tipo 1, é um tema de enorme interesse e uma alternativa promissora para o tratamento desta doença. As células-tronco mesenquimais (CTM) têm um grande potencial em terapia celular, por sua relativa facilidade de obtenção, expansão e diferenciação. Durante a gravidez, a prolactina (PRL) induz um incremento na massa de células β e na sua sensibilidade à glicose, sugerindo que sua utilização em protocolos para diferenciação de CTM poderia exercer um efeito benéfico. **Objetivo:** avaliar o efeito da prolactina no processo de diferenciação das CTM da medula óssea de rato, em células com capacidade de produção de insulina. **Métodos:** CTM da medula óssea de ratos Wistar foram isoladas, caracterizadas (por citoquímica e citometria de fluxo) e expandidas *in vitro*. A diferenciação das CTM foi realizada em meio contendo alta concentração de glicose (25 mM), nicotinamida e β -mercaptoetanol durante um período de até 4 meses. A seguir foi adicionada exendina-4 ao meio, na presença ou ausência de PRL. A expressão dos genes Pax6, neurogenin-3, Isl1, NeuroD1, Nkx2.2, Nkx6.1, polipeptídeo pancreático, somatostatina, glucagon, insulina 1 e 2 e receptor de PRL foi avaliada por PCR em tempo real, sendo comparada entre os vários estágios de cultivo. Expressão de insulina, somatostatina, glucagon e PDX-1 foi avaliada também por imunofluorescência indireta. **Resultados:** as células isoladas foram positivas para CD29 e CD73, negativas para CD45, e diferenciaram em adipócitos, condrócitos e osteócitos, demonstrando se tratar de CTM. Pax6, neurogenin-3, Isl1, NeuroD1, Nkx2.2 e Nkx6.1 tiveram uma expressão variada durante os estágios de cultivo, porém insulina, glucagon e polipeptídeo pancreático não foram expressos. A isoforma longa do receptor de PRL foi induzida significativamente ($p < 0,05$) nos cultivos tratados com PRL. O gene da somatostatina foi significativamente induzido ($p < 0,05$) nos estágios iniciais da diferenciação, e a imunofluorescência mostrou que a PRL induziu a produção deste hormônio. **Conclusão:** as CTM diferenciadas expressaram genes característicos de células endócrinas pancreáticas, e a expressão de somatostatina foi induzida por PRL.

Descritores: Diabetes Mellitus Tipo 1, Células-Tronco Mesenquimais, Células Secretoras de Insulina, Prolactina.

ABSTRACT

Introduction: the search for a renewable source of cells with insulin-producing capacity to replace β cells destroyed by the autoimmune process in Type 1 Diabetes Mellitus, is a very interesting subject and a promising therapeutic alternative for this disease. Mesenchymal stem cells (MSC) have a great potential in cell therapy, due to its relative ease of isolation, expansion and differentiation. During pregnancy, prolactin (PRL) induces an increase in β -cell mass and glucose sensitivity, suggesting that its use in MSC differentiation protocols could exert a beneficial effect.

Objective: to evaluate the ability of prolactin to induce differentiation of rat MSC into insulin-producing cells. **Methods:** MSC from bone marrow of Wistar rats were isolated, characterized (by cytochemistry and FACS) and *in vitro* expanded. MSC differentiation was performed in medium containing high glucose concentration (25 mM), nicotinamide and β -mercaptoethanol. After that, exendin-4 was added to the medium, in the presence or absence of PRL. Expression of Pax6, neurogenin-3, Isl1, NeuroD1, Nkx2.2, Nkx6.1, pancreatic polypeptide, somatostatin, insulin-1 and 2, glucagon and PRL receptor genes were evaluated by real-time PCR, and compared between culture stages. Insulin, somatostatin, glucagon and PDX-1 expression were also evaluated by immunofluorescence. **Results:** isolated cells were CD29 and CD73 positive, CD45 negative and differentiated into adipocyte, chondrocyte and osteocyte lineages, confirming their MSC origin. Pax6, neurogenin-3, Isl1, NeuroD1, Nkx2.2 and Nkx6.1 showed varied expression during culture stages, while insulin, glucagon and pancreatic polypeptide were not expressed. PRL receptor long form was significantly induced ($p < 0,05$) in PRL treated cultures. Somatostatin gene was significantly induced ($p < 0,05$) in early stages of differentiation, and its expression was induced by PRL as confirmed by immunofluorescence. **Conclusion:** differentiated MSC expressed pancreatic endocrine-specific genes, and somatostatin expression was induced by PRL.

Key words: Diabetes Mellitus, Type 1, Mesenchymal Stem Cells, Insulin-Secreting Cells , Prolactin

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE GRÁFICOS	IV
LISTA DE QUADROS	IV
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	05
2.1 OBJETIVO GERAL	06
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	06
3 LITERATURA	07
3.1 ILHOTAS DE LANGERHANS	08
3.1.1 Insulina	09
3.2 DIABETES MELITO	09
3.2.1 Diabetes Melito	09
3.2.2 Diabetes Melito Tipo 1	10
3.2.3 Tratamento do DM1	10
3.2.4 Terapia celular no DM1	11
3.3 ORGANOGÊNESE DO PÂNCREAS ENDÓCRINO	13
3.3.1 Organogênese do pâncreas	13
3.3.2 Controle transcricional do desenvolvimento pancreático	16
3.3.3 Principais fatores de transcrição	18
3.3.4 Sinalização e desenvolvimento pancreático	20
3.4 CÉLULAS-TRONCO	21
3.4.1 Células-tronco	21
3.4.2 Células-Tronco Mesenquimais	22
3.5 AGENTES INDUTORES DE DIFERENCIAÇÃO A CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA	23
3.6 EFEITOS DA PRL	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 ANIMAIS	27
4.2 COLETA DA MEDULA ÓSSEA	27
4.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	27

4.4	CULTIVO E EXPANSÃO DAS CTM EM ESTADO INDIFERENCIADO	29
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS CTM POR CITOMETRIA DE FLUXO ...	29
4.6	ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO DAS CTM EM LINHAGENS MESENQUIMAIS	30
4.7	DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS CTM EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA	31
4.8	IMUNOFLUORESCÊNCIA	33
4.9	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA	34
4.10	SÍNTESE DE cDNA	34
4.11	PCR EM TEMPO REAL	35
4.12	ANÁLISE DOS RESULTADOS DO PCR EM TEMPO REAL	36
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS	38
5.1	ISOLAMENTO E CULTURA DE CTM DA MEDULA ÓSSEA DE RATO	39
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CTM	39
	5.2.1 Caracterização das CTM por citometria de fluxo	39
	5.2.2 Ensaio de diferenciação das CTM em linhagens mesenquimais	41
5.3	DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS CTM EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA	44
	5.3.1 Cultivo e expansão em estado indiferenciado	44
	5.3.2 Diferenciação <i>in vitro</i> das CTM em células produtoras de insulina	44
5.4	ISOLAMENTO DOS <i>CLUSTERS</i>	47
5.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA	48
5.6	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	51
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	62
8	REFERÊNCIAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ng	– nanograma
nm	– nanômetro
µg	– micrograma
µL	– microlitro
µm	– micrômetro
BSA	– Bovine Serum Albumin
CD	– Cluster of Differentiation
cDNA	– complementary Deoxyribonucleic Acid
cm	– centímetro
CM	– Células mononucleares
cm ²	– Centímetro quadrado
CO ₂	– Dióxido de carbono
CTM	– Célula-tronco Mesenquimal
DAPI	– 4', 6- diamino - 2 fenilindole
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	– Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	– Deoxynucleotide Triphosphate
e _i	– Dia de estado embrionário i
FACS	– Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	– Fluorescein Isothiocyanate
g	– grama
Gcg	– glucagon
Gck	– glicoquinase
H-DMEM	– High glucose - Dulbecco's Modified Eagle Medium
HEPES	– 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IAPP	– Islet amyloid polypeptide
Ins	– Insulina
INS-1	– linhagem de insulinoma de rato
ITS	– Insulina-Transferrina-Selênio
L-DMEM	– Low glucose - Dulbecco's Modified Eagle Medium

mg – miligrama
mL – mililitro
mM – milimolar
mRNA – messenger Ribonucleic Acid
N – nicotinamida
NeuroD1 – Neurogenic differentiation 1
Nkx2.2 – NK2 homeobox 2
Nkx6.1 – NK6 homeobox 1
Pax6 – Paired box gene 6
PBS – Phosphate Buffered Saline
PDX-1 – Pancreatic and duodenal homeobox gene 1
PE – Phycoerythrin
Ppy – Pancreatic polypeptide
PRL – Prolactina
PRL-R - Prolactin Receptor
Prlr α – Prolactin receptor isoform α
Prlr β – Prolactin receptor isoform β
RIN – Rat Insulinoma Line RIN-5AH-T2
RLT – RNeasy Lysis Buffer
rpm – rotações por minuto
rrPRL – rat recombinant Prolactin
RT-PCR – Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SFB – Soro Fetal Bovino
Sst – Somatostatina
TA – Temperatura Ambiente
TGF β – Transforming Growth Factor- β
UI – Unidade Internacional
xg – Força centrífuga relativa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais tipos celulares e hormônios das Ilhotas de Langerhans.....	08
Figura 2	Esquema geral da organogênese do pâncreas a partir do endoderme.....	14
Figura 3	Diagrama do desenvolvimento embrionário do pâncreas de camundongo.....	15
Figura 4	Esquema do modelo de desenvolvimento embrionário do pâncreas...	17
Figura 5	Roteiro das etapas de isolamento, cultivo e caracterização das CTM	28
Figura 6	Roteiro do protocolo de diferenciação em células produtoras de insulina e das etapas de análise.....	32
Figura 7	Perfil da expressão de marcadores de superfície, por citometria de fluxo, em células de 4 ^o subcultivo de medula óssea de rato.....	40
Figura 8	Diferenciação osteogênica de CTM de medula óssea de rato.....	41
Figura 9	Diferenciação adipogênica de CTM de medula óssea de rato.....	42
Figura 10	Diferenciação condrogênica de CTM de medula óssea de rato.....	43
Figura 11	Estágios de cultivo e diferenciação de CTM.....	45
Figura 12	Cultivo diferenciado de CTM de rato.....	47
Figura 13	Imunofluorescência indireta com anticorpo anti-somatostatina e conjugado FITC, em CTM no estágio final da diferenciação (estágio E3).....	49
Figura 14	Imunofluorescência indireta para glucagon e PDX-1 em CTM no estágio final da diferenciação (estágio E3), tratadas com PRL.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Efeito de diferentes concentrações de nicotinamida na viabilidade celular de cultivo de CTM. após 72 horas de incubação.....46
- Gráfico 2** Expressão do gene da somatostatina em três diferentes cultivos (R5, R6 e R8) de CTM diferenciadas.....52
- Gráfico 3** Expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário do pâncreas (*Pax6*, *Neurogenina 3*, *Isl1*, *NeuroD1*, *Nkx2.2* e *Nkx6.1*), em três diferentes cultivos (R5, R6 e R8) de CTM diferenciadas.....53
- Gráfico 4** Expressão da isoforma longa do R-PRL de rato, em CTM nos diferentes estágios da diferenciação.....54

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Anticorpos monoclonais (anti-rato) utilizados nos experimentos de fenotipagem das CTM por citometria de fluxo.....30
- Quadro 2** Anticorpos primários (Abcam) utilizados em imunofluorescência indireta para identificar marcadores de ilhotas pancreáticas nas CTM diferenciadas.....33
- Quadro 3** Genes analisados por PCR em tempo real nas amostras de CTM de rato diferenciadas e a respectiva seqüência dos *primers* utilizados.....36

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

restaurar a normoglicemia a longo prazo, mas pode ser oferecido só a um número limitado de pacientes, e apresenta uma morbidade importante. 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 é a única que tem aplicação clínica atualmente. O transplante celular oferece vantagens comprovadas como o baixo risco do procedimento por ser minimamente invasivo e uma intervenção quase ambulatorial, o que permite a realização de múltiplos transplantes. O transplante celular pretende evitar a necessidade do tratamento imunossupressor, investigando estratégias baseadas no uso de métodos para separar fisicamente as ilhotas do sistema imunológico (encapsulamento) ou na modificação das características imunogênicas do enxerto. Ao minimizar o risco associado ao tratamento imunossupressor, seria clínica e eticamente aceitável realizar o transplante nas fases iniciais da doença para restaurar a normoglicemia desde o diagnóstico da DM tipo1 e muito antes do aparecimento das complicações crônicas.

Alem dos avanços substanciais nas três últimas décadas do transplante de ilhotas, incluindo as mudanças no protocolo de digestão do pâncreas, maior número de ilhotas no transplante e imunossupressão livre de corticóides, ainda persistem dificuldades e limitações que impedem a sua aplicação generalizada no tratamento do diabetes. Por exemplo, a dificuldade técnica do processo de isolamento, a insuficiente quantidade de ilhotas disponíveis para o transplante e a perda da função e destruição das ilhotas uma vez transplantadas.

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

Este enfrenta um duplo desafio, a geração de uma massa suficiente de células produzindo quantidades adequadas de insulina e liberando-a em resposta a sinais aos fisiológicos, e protegendo-as da recorrência da auto-imunidade. Além de tudo, para ser clinicamente útil, a terapia celular tem que representar uma vantagem significativa e ser mais eficaz que o tratamento de administração de insulina.

A diferenciação celular para obter CPI a partir de CT como substituto biológico para restaurar a massa de células β perdida no DM tipo 1 implica aprofundar o conhecimento dos seus mecanismos moleculares e, inclusive, na interação entre as distintas populações que compõem as ilhotas pancreáticas. A viabilidade desta estratégia depende principalmente de três requisitos: a disponibilidade de células pluripotenciais com capacidade de auto-replicação e de gerar células diferenciadas; a caracterização dos sinais proliferativos que permitam expandir estes progenitores; e a identificação dos sinais que induzam a diferenciação destas células pluripotenciais em células funcionais que secretem insulina de maneira regulada em resposta às variações da glicemia. O processo de diferenciação *in vitro* de progenitores para ilhotas é de grande interesse e ainda constitui um grande desafio, o qual precisa vencer muitas limitações como a ativação/desativação efetiva de todos os fatores de transcrição, a ausência dos sinais existentes no entorno imediato do embrião, e a periodicidade da glicemia que estimula a sensibilidade à glicose. Os protocolos atuais têm conseguido alguns avanços, mas os níveis de insulina secretados pelas células diferenciadas estão abaixo dos níveis fisiológicos, quando comparados com a secreção de ilhotas isoladas e ainda não apresentam a necessária regulação da secreção em resposta às variações glicêmicas. É por isto que novos protocolos de diferenciação e principalmente estratégias para conseguir a maturação das células diferenciadas serão chave na evolução desta terapia. Diversos estudos têm estabelecido que os hormônios lactogênicos são responsáveis pelo desenvolvimento embrionário do pâncreas e possivelmente exercem um efeito na maturação das células β , com o que podem ajudar a esclarecer as maneiras de controlar a proliferação e diferenciação a partir de CT.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da prolactina (PRL) no processo de diferenciação das CTM da medula óssea de rato, em células com capacidade de produção de insulina. Para isto, serão empregadas técnicas de cultivo celular, imunofluorescência e PCR em Tempo Real.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar CTM da medula óssea de rato;
- Expandir as CTM da medula óssea de rato;
- Confirmar a identidade de CTM pela imunofenotipagem por citometria de fluxo e por diferenciação em osteócito, adipócito e condrócito;
- Avaliar a diferenciação de CTM em células produtoras de insulina, por PCR em Tempo Real e imunofluorescência indireta;
- Avaliar o efeito da PRL no processo de diferenciação das CTM, através da identificação de hormônios e genes diferencialmente expressos durante a indução de diferenciação, por PCR em Tempo Real e imunofluorescência indireta;

3. LITERATURA

3.1 ILHOTAS DE LANGERHANS

As ilhotas de Langerhans ou tecido endócrino do pâncreas são glândulas secretoras de hormônios que agem como importantes reguladores do metabolismo de carboidratos. No pâncreas humano existem entre 1 e 2 milhões de ilhotas de Langerhans, com cerca de 0,3 mm de diâmetro e organizadas ao redor de pequenos capilares (Fig. 1). Nomeadas em homenagem a Paul Langerhans, o cientista alemão que as descobriu em 1869, essas estruturas celulares se dispõem em aglomerados dispersos por todo o pâncreas, mas são mais abundantes na região da cauda. Em cortes de pâncreas corados com Hematoxilina e Eosina são observadas como cúmulos irregulares de cor rosa pálido, e distribuídas extensamente entre o tecido acinar pancreático, que é de cor mais escura. As ilhotas são formadas por pelo menos quatro tipos celulares diferentes (α , β , δ e PP) sendo cada tipo responsável pela secreção de um hormônio em particular. As células α secretam glucagon (GCG) e compõem aproximadamente 25% das células da ilhota, e as células β secretam insulina (INS) e constituem a população majoritária com 60% do total. As células δ são em torno de 3-10 % e produzem somatostatina (SST), enquanto as células PP produzem polipeptídeo pancreático (PPY) e perfazem em torno de 1% do total. Além das células endócrinas, também são encontradas células endoteliais e da matriz. A ilhota é altamente irrigada o que permite exercer com eficiência a sua função de sensor da glicemia e secretar os hormônios diretamente na circulação sanguínea. As células β estão dispostas principalmente no centro da ilhota enquanto as demais encontram-se em especial na periferia.

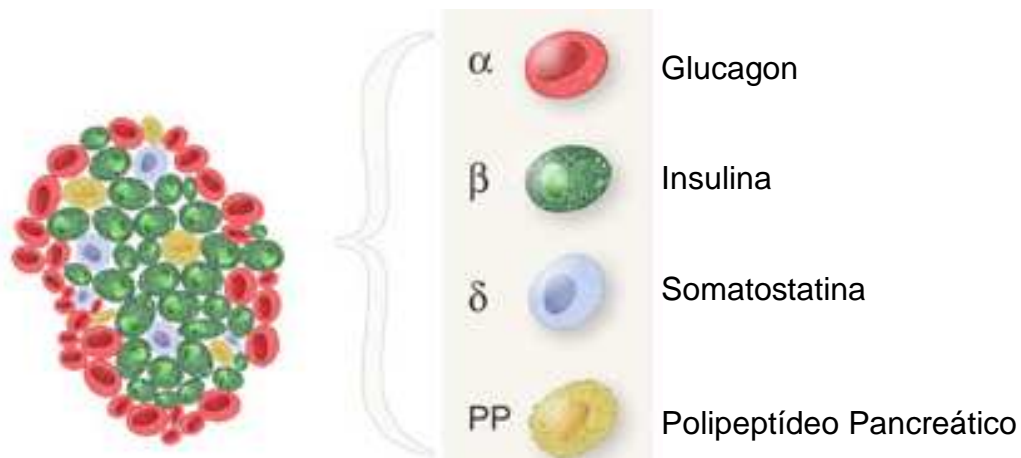


Fig. 1 - Principais tipos celulares e hormônios das Ilhotas de Langerhans

3.1.1 Insulina

A insulina é um hormônio peptídico anabólico de 51 aminoácidos que é secretado pelas células β das ilhotas. Consiste de duas cadeias (A e B) conectadas por pontes dissulfeto. Em humanos existe apenas um gene para insulina, enquanto em roedores são dois genes com 91% de homologia entre eles, Ins 1 e Ins 2. Sua principal função é permitir a captação da glicose circulante pelas células dos tecidos periféricos, como músculo e tecido adiposo. Deste modo, a insulina é o principal hormônio responsável pela regulação dos níveis de glicemia dentro de parâmetros fisiológicos normais. Exerce o seu mecanismo através da translocação do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT-4 – presente principalmente no músculo e tecido adiposo) desde vesículas intracelulares à membrana celular. No fígado, a insulina também regula muitas funções metabólicas, como estimular a síntese de glicogênio e inibir a gliconeogênese, controlando a glicemia(1).

3.2 DIABETES MELITO

3.2.1 Diabetes Melito

O DM é uma síndrome crônica que compreende um grupo heterogêneo de desordens caracterizadas por hiperglicemia e intolerância à glicose; com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, conseqüente a uma produção e/ou ação deficiente da insulina pelo organismo. A hiperglicemia manifesta-se por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva, ou por complicações agudas que podem levar a risco de vida: a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não-cetótica(2).

O DM é um grave problema de saúde tanto pela prevalência quanto pelas graves complicações crônicas que desenvolvem nos pacientes. A previsão para os próximos anos são pessimistas, já que segundo a Organização Mundial de Saúde, no ano de 2000 o número estimado de pacientes diabéticos no mundo era de 171 milhões de habitantes, com projeções de aumentar a 366 milhões no ano 2030. No Brasil foram diagnosticados, no ano de 2000, cinco milhões de pacientes diabéticos, mas este número poderá triplicar até o ano de 2030. Aproximadamente 5% das causas de mortes a cada ano a nível mundial são atribuídas ao DM(3). A

classificação do DM pode ser dividida em quatro grupos segundo o “*The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*”: a) DM do tipo 1; b) DM do tipo 2; c) Outros tipos específicos de Diabetes, incluindo Diabetes secundário ou associado a outras patologias e d) DM gestacional(4).

3.2.2 Diabetes Melito Tipo 1

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

Apesar de a etiologia ser pouco documentada, vários estudos mostram que uma predisposição genética em conjunto com fatores ambientais desencadeiam, na maioria destes pacientes, um processo auto-imune contra as células β , resultando na sua destruição(5, 6).

Em geral, quando pacientes são diagnosticados com a doença, entre 60% e 80% de suas células β já foram destruídas. Para seu controle é necessário o trabalho de equipe multidisciplinar. Está associada a várias outras doenças crônicas não transmissíveis como hipertensão arterial, doença coronariana e cerebrovascular, dislipidemias, retinopatia diabética, neuropatias periféricas e autonômicas, lesões renais, levando até a insuficiência renal crônica terminal. A sobrevida tem aumentado significativamente o que favorece o surgimento das complicações crônicas com custos econômicos e sociais elevados.

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

3.2.3 Tratamento do DM1

O tratamento convencional do DM1 baseia-se na reposição de insulina, geralmente realizada por meio de injeções subcutâneas. Os protocolos mais

modernos vêm introduzindo esquemas intensivos de reposição seja através de múltiplas aplicações diárias ou através de bombas de infusão contínua de insulina via subcutânea, com o objetivo de melhorar o controle glicêmico dos pacientes. Mesmo assim, como este tipo de terapia não consegue reproduzir fielmente o padrão fisiológico de secreção de insulina do pâncreas, os pacientes ficam expostos a descompensações metabólicas agudas como a hipoglicemia, com risco vital, e também a complicações crônicas graves como a nefropatia, retinopatia e neuropatia, entre outras(7, 8). Portanto, terapêuticas alternativas à insulino-terapia que se mostrem mais eficientes para a regulação normal da glicemia são de extrema importância.

Dentre as alternativas terapêuticas à insulino-terapia disponíveis atualmente, somente o transplante de pâncreas (órgão total) e o de ilhotas pancreáticas possibilitam a reconstituição do padrão fisiológico de secreção de insulina e do controle glicêmico(9).

Transplantes de pâncreas alogênicos vêm sendo realizados freqüentemente, na maioria das vezes associado ao transplante renal. O maior inconveniente desta técnica, além da necessidade de utilização de imunossupressores, é o fato de envolver um procedimento cirúrgico extenso. É uma cirurgia de grande porte, não isenta de complicações potencialmente sérias(9).

3.2.4 Terapia celular no DM1

Como uma alternativa para o tratamento de casos selecionados de DM1, o transplante de ilhotas isoladas de doadores cadavéricos vem se firmando, graças aos resultados do estudo de Shapiro *et al* (2000)(10). 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(11).

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(12).

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

Apesar de alguns grupos relatarem casos de insulino-independência após isolamento e transplante de ilhotas obtidas a partir de um único doador, na maioria dos casos ainda são necessários de 2 a 3 isolamentos/transplantes por paciente. Além disto, mesmo que as técnicas de isolamento das ilhotas sejam aperfeiçoadas e se torne possível atingir níveis glicêmicos adequados após um único transplante, dificilmente haveria um equilíbrio entre o número de órgãos disponíveis e o de pacientes candidatos ao transplante. O número de doadores de pâncreas para transplante de ilhotas permaneceria aquém do necessário para o tratamento de milhões de indivíduos portadores de diabetes insulino-dependente(11).

Por isto, é de grande interesse a identificação de novas fontes de células renováveis para a geração de enxertos tanto morfológica como funcionalmente semelhantes às ilhotas, além de uma melhora na habilidade de induzir a proliferação das células *in vitro* e a sua permanência *in vivo*. Varias tentativas estão sendo feitas neste sentido. Dentre estas pode-se mencionar a expansão de células β *ex vivo*, pois existem evidências do dinamismo da massa de células β para compensar aumentos de demanda de insulina frente a certas condições fisiológicas e patológicas(13). Esta expansão *ex vivo* consiste em que as células β de cultivos de ilhotas pancreáticas podem se dediferenciar e expandir e, após atingir uma massa adequada, podem ser dirigidas para rediferenciar em células β . Outra alternativa consiste na diferenciação celular a partir de diferentes progenitores, como células embrionárias (CE) e CT progenitoras pancreáticas e não-pancreáticas. Na diferenciação de CT adultas, o seu potencial é mais limitado que o das CE, o que representa uma vantagem em termos de segurança em relação a um menor risco de proliferação descontrolada. Particularmente, para a terapia de substituição das

células β se requer que estas exibam algumas propriedades funcionais, como a expressão do gene da insulina, sua modificação e processamento pós-transcricional, a produção e liberação da insulina em resposta à glicose dentro dos limites fisiológicos, e uma fonte disponível ou com capacidade replicativa *in vitro*.

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

3.3 ORGANOGÊNESE DO PÂNCREAS ENDÓCRINO

3.3.1 Organogênese do pâncreas

As três linhagens celulares (exócrina, endócrina e ductal) que formam o pâncreas adulto procedem de um grupo comum de células precursoras de origem endodérmica (Fig. 2). A formação do pâncreas começa numa fase precoce durante o desenvolvimento embrionário. Em camundongos, o pâncreas inicialmente surge no dia embrionário 9.5 (e9.5) como dois brotos desde os sítios ventral e dorsal do tubo anterior e médio do intestino primitivo a partir do endoderme, e que vai dar lugar ao duodeno. Neste estágio, as células α aparecem como as primeiras células diferenciadas enquanto as células β aparecem em seguida. Indo ao dia 10.5 começa o crescimento e ramificação do epitélio dos dois primórdios pancreáticos. Conforme o intestino vai rodando, o broto ventral gira junto e começa a se fundir ao broto dorsal, dando origem a um órgão bipolar (Fig. 3). As células endócrinas continuam se formando como estruturas tipo ductos até o e14, quando começa a formação de ácinos e a diferenciação das células exócrinas(14). Ao mesmo tempo, há uma elevação dramática no nível de insulina e no número de células β a partir de precursores (neogênese), e pela primeira vez se observam células bastante diferenciadas com grânulos de insulina detectáveis. Estas mudanças na célula β são denominadas de “transição secundária”.

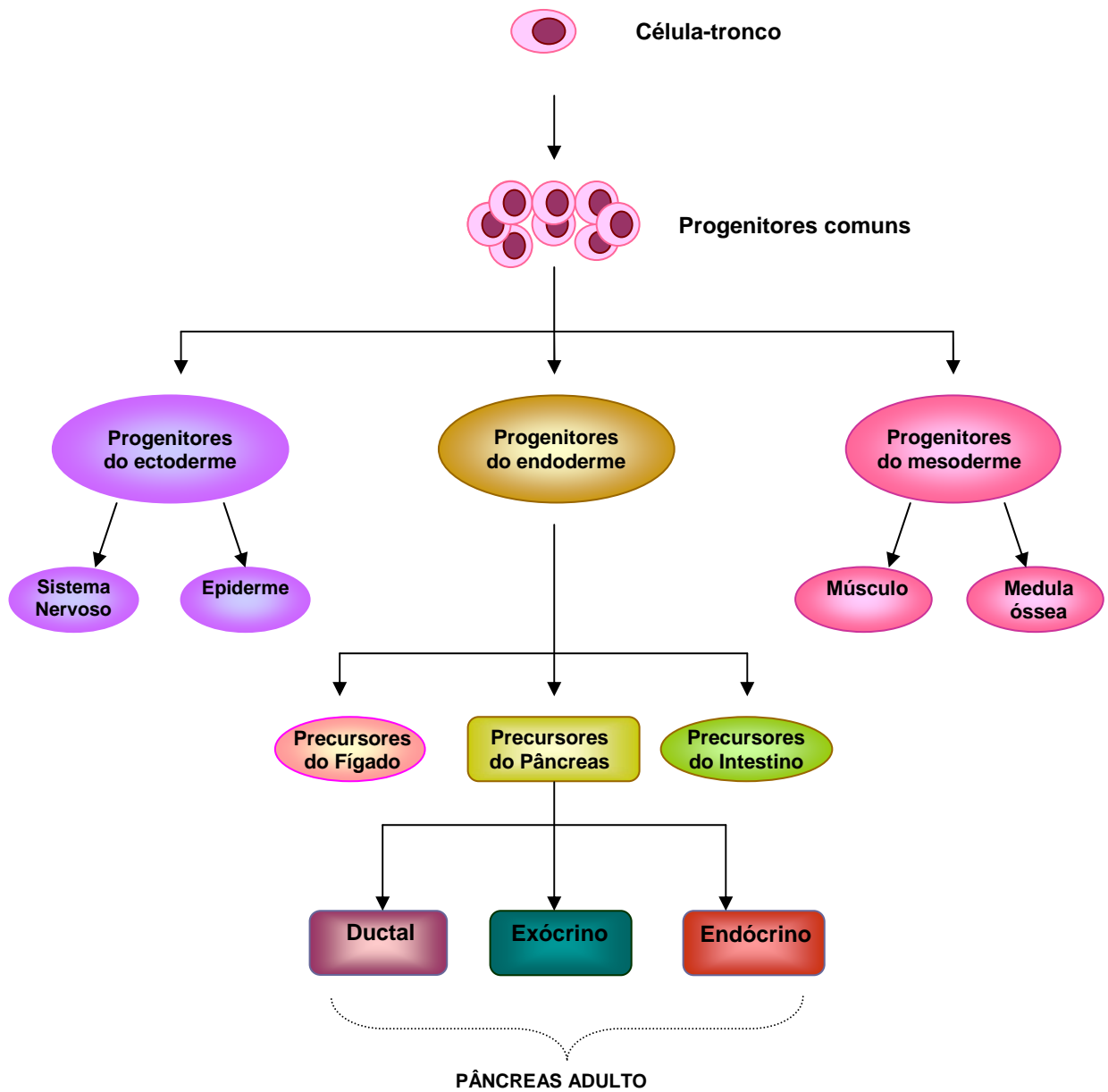


Fig. 2 - Esquema geral da organogênese do pâncreas a partir do endoderme

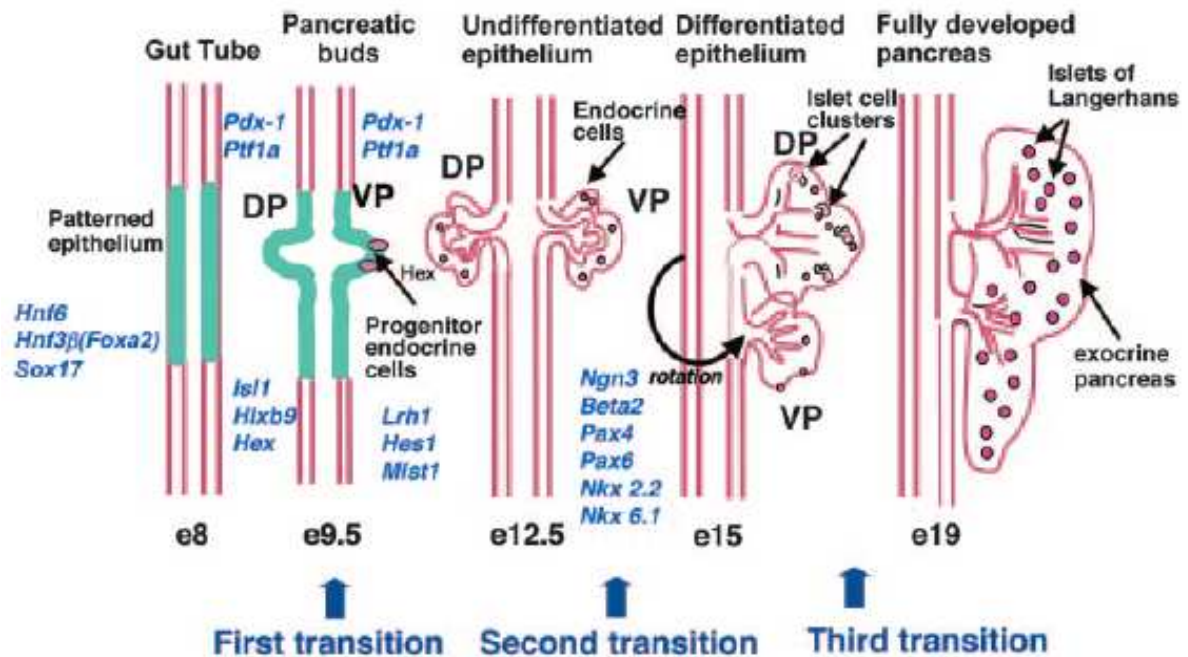


Fig. 3 - Diagrama do desenvolvimento embrionário do pâncreas de camundongo. Adaptado de Habener *et al* (2005)(14)

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

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

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

3.3.2 Controle transcricional do desenvolvimento pancreático

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

A informação obtida mediante técnicas de biologia molecular e em modelos genéticos em roedores tem permitido elaborar uma cascata de fatores de transcrição proposta na Figura 4. Porém, trata-se de um modelo ainda incompleto e possivelmente muito mais simples do que acontece na realidade. Como era de esperar, a presença e ausência destes fatores determinam muitos fenômenos que conduzem à progressão do desenvolvimento. Os primeiros fatores expressos no endoderme pré-pancreático antes da formação dos primórdios são PDX-1 e Hb9. Na ausência de Hb9 não se forma o primórdio dorsal, apenas o ventral. Na ausência de PDX-1 se inicia a formação de ambos os primórdios, mas seu crescimento e morfogênese ficam interrompidos nas primeiras etapas do desenvolvimento, tanto em roedores quanto em humanos. A importância de PDX-1 no desenvolvimento pancreático tem sido confirmada em estudos recentes onde se demonstra que todas as células pancreáticas derivam de células positivas para PDX-1. A expressão de PDX-1 e Hb9 cai após o e10.5 mas volta a reaparecer nas células β já diferenciadas.

A especificação da linhagem endócrina em precursores pré-pancreáticos é determinada pela expressão de fatores de transcrição pró-endócrinos. Neurogenina3 (Ngn3) é o fator pró-endócrino chave no pâncreas. Camundongos mutantes para o gene Ngn3 não possuem células endócrinas no pâncreas e morrem pouco após o nascimento. Ngn3 atua como interruptor da cascata transcricional. A sua expressão é transitória e depois de alcançar um ponto máximo aproximadamente no e15.5, cai a níveis indetectáveis no pâncreas do neonato. Os fatores ativados direta ou indiretamente por Ngn3 devem continuar e finalizar o processo de diferenciação

endócrina iniciado por Ngn3. Um destes fatores diretos é NeuroD1/BETA2. Este compartilha com o seu ativador a capacidade de promover o destino endócrino. Outros fatores de relevância regulados diretamente por Ngn3 são Pax4, Nkx2.2 e IA-1. O modelo vigente estabelece que a ação conjunta dos distintos fatores de transcrição que funcionam em paralelo com Ngn3 ou antes, são os responsáveis da determinação da linhagem endócrina específica (α , β , δ e PP). Assim, Pax4 e Arx são necessários para a especificação das linhagens β e α , respectivamente. A ausência simultânea destes dois fatores resulta na perda total destas células e no aumento das células δ . Também os fatores Nkx2.2 e Nkx6.1 tem um papel relevante na determinação da linhagem β . Animais mutantes para Nkx2.2 não tem células positivas para insulina, mas tem células endócrinas com outros marcadores de célula β e expressam o hormônio grelina. A ausência de Nkx6.1 impede a neogênese das células β durante a transição secundária(15).

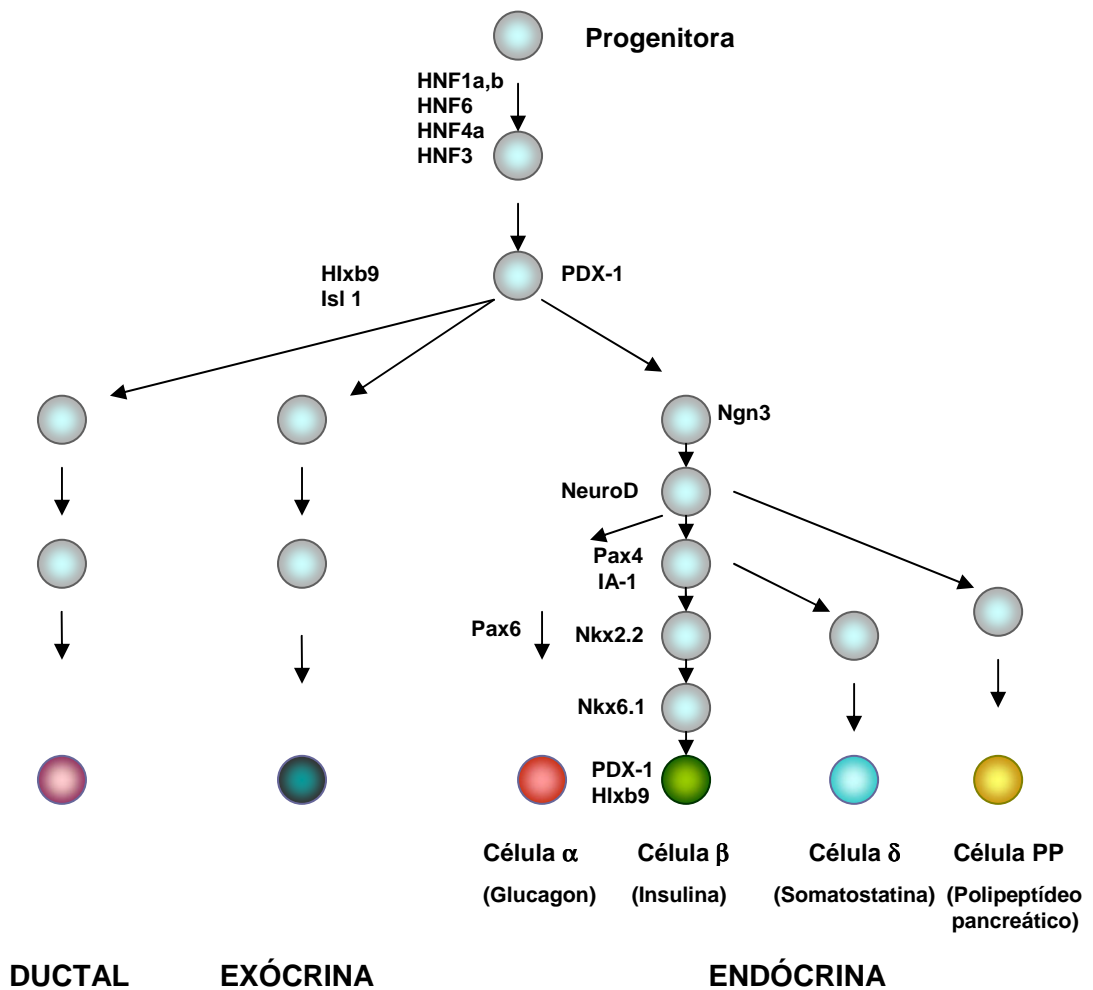


Fig. 4 - Esquema do modelo de desenvolvimento embrionário do pâncreas

3.3.3 Principais fatores de transcrição

PDX-1

Um dos genes mais intensamente estudados é o PDX-1 (*Pancreatic duodenal homebox-1*). Durante a organogênese, PDX-1 é amplamente expresso nas células precursoras endócrinas e exócrinas. Nas ilhotas de Langerhans adultas, a expressão de PDX-1 é restrita às células β , δ e algumas células do duodeno. PDX-1 regula a maioria dos genes responsáveis pela identidade e funcionalidade das ilhotas pancreáticas como a insulina, GLUT-2 (transportador de glicose tipo 2), polipeptídeo pancreático e somatostatina(16). Camundongos *knock-out* para PDX-1, apresentam ausência completa do pâncreas(17). Portanto, a expressão de PDX-1 em células precursoras é essencial para o sucesso da diferenciação.

Neurogenina 3

Ngn3 também é crucial para o desenvolvimento do pâncreas. É expresso por células pro-endócrinas durante a diferenciação do pâncreas e ativa a expressão do gene NeuroD1/BETA2. Em conjunto com outros fatores de transcrição endodermiais, ativa sinergisticamente os promotores dos genes Nkx2.2 e Pax4. Ngn3 reprime o seu próprio promotor e o conjunto de todas estas ações contribui à diferenciação da ilhota(18). Deleção do Ngn3 em camundongos resulta na perda completa das células endócrinas pancreáticas e na morte pós-natal por desenvolvimento de diabetes(19).

NeuroD1/BETA2

O gene que codifica NeuroD1/BETA2, uma proteína do tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH), está associado com a ativação do gene da insulina. Um estudo recente determinou que este gene interage fisicamente com PDX-1 para formar um complexo nucleoproteína no gene da insulina, que leva à formação de uma pequena alça de DNA com possível função reguladora(20). Durante a embriogênese, NeuroD1/BETA2 é expresso em uma subpopulação do epitélio pancreático de camundongos, até o dia embrionário e9.5, uma vez que posteriormente sua expressão é restrita somente às ilhotas(21). Camundongos deficientes em NeuroD1/BETA2 morrem entre 3-5 dias após o nascimento, com uma severa hiperglicemia e anormalidades nas ilhotas

Genes Pax

Os genes Pax são essenciais para a formação de vários tecidos de todas as linhas germinais no embrião mamífero. Pax4 e Pax6 são proteínas especificamente expressas no pâncreas endócrino em desenvolvimento, regulando a diferenciação e proliferação das ilhotas. Durante a embriogênese em camundongos, Pax6 está presente a partir do dia e9 em uma pequena subpopulação da endoderme pancreática. A expressão de Pax4 é observada a partir do dia e10 no broto pancreático. Ao final do desenvolvimento, os níveis de Pax4 diminuem enquanto os níveis de Pax6 permanecem elevados. Camundongos *knock-out* revelaram que animais Pax4^{-/-} não geram células β nem células δ , enquanto animais Pax6^{-/-} são incapazes de formar células α (22).

Isl1

Isl1 é expresso em células endócrinas e em uma subpopulação de neurônios adultos de ratos. Durante o desenvolvimento, Isl1 está presente a partir do dia e9 no epitélio pancreático dorsal de camundongos. No dia e11, Isl1 é detectado no epitélio pancreático ventral, que é necessário para a diferenciação de ilhotas. Em embriões mutantes para Isl1, o desenvolvimento de ilhotas é completamente ausente(14, 23).

Genes Nkx

A família do homeodomínio Nkx também está envolvida no desenvolvimento das ilhotas. A expressão de Nkx2.2 está presente nas primeiras células progenitoras no desenvolvimento do pâncreas e gradualmente fica restrita às células β , α e PP(24). Na ausência de Nkx2.2, as células β não conseguem se diferenciar e o número de células α e PP diminui. Em compensação, a população de células produtoras do hormônio grelina, repovoa as ilhotas em troca das células perdidas(25). Outro membro da mesma família é o fator de transcrição Nkx6.1. No pâncreas de camundongos em desenvolvimento, a expressão de Nkx6.1 é observada a partir do dia e10.5. A partir do dia e15.5 a expressão de Nkx6.1 torna-se restrita às células produtoras de insulina e às células ductais. Em estágios tardios, no pâncreas adulto, Nkx6.1 torna-se exclusivo das células produtoras de insulina. O rompimento do gene que codifica Nkx6.1 leva ao bloqueio da neogênese das células β , ao contrário dos outros tipos celulares da ilhota, que se desenvolvem normalmente(26).

Assim, o conhecimento adequado do padrão de expressão dos fatores de transcrição é essencial não só para as pesquisas com CT, mas, também para o entendimento da fisiopatologia do diabetes.

3.3.4 Sinalização e desenvolvimento pancreático

A formação do pâncreas requer uma série de sinais indutivos procedentes de tecidos adjacentes, que dirijam a sua diferenciação. Para a correta formação do pâncreas, são necessários sinais enviados por tecidos mesodérmicos situados próximos da endoderme pré-pancreática. A interação epitélio-mesênquima tem um papel crucial durante a organogênese do pâncreas. Os fatores solúveis produzidos pelo mesênquima atuam na proliferação e diferenciação dos progenitores pancreáticos. Em camundongo, o gene FGF10 (Fator de Crescimento de Fibroblato 10) é expresso no mesênquima adjacente aos primórdios do epitélio pancreático e é requerido para o desenvolvimento normal do pâncreas(27). Num modelo de co-cultivo de epitélio pancreático embrionário e mesênquima observou-se que este último incrementou a população de células β por ativação de progenitores pancreáticos PDX-1⁺, amplificou e prolongou a formação de progenitores endócrinos Ngn3⁺, e induziu a progressão da diferenciação das células β . No mesmo estudo, o fator FGF10 simulou o efeito do mesênquima, mas não produziu um crescimento completo do explante. Além do FGF10, o mesênquima gera sinais adicionais que são importantes para o desenvolvimento do pâncreas(28).

A notocorda envia sinais que reprimem a expressão do gene Sonic Hedgehog (Shh) na endoderme pré-pancreática dorsal, pré-requisito para a expressão do PDX-1 nesta região e o conseqüente desenvolvimento do pâncreas. A Activina B e o FGF2 (Fator de Crescimento de Fibroblasto 2) são duas moléculas secretadas pela notocorda, e mediadoras deste efeito. A especificação do pâncreas ventral acontece de maneira independente. PDX-1 é expresso na endoderme ventral, e os sinais provenientes do mesoderma cardíaco e do septo transversal não são necessários para induzir a expressão deste fator na região pré-pancreática, mas são capazes de inibir a sua expressão na região pré-hepática. Também as moléculas FGF2 e BMP4 (proteína morfogênica óssea 4) inibem a expressão do PDX-1 na região pre-hepática, permitindo assim o desenvolvimento do fígado. A região do pâncreas dorsal é induzida pelos mesmos morfógenos, mas com estratégias essencialmente

opostas. A interação com os vasos sanguíneos também é crítica para a diferenciação do pâncreas(29). Estudos têm demonstrado que os sinais provenientes do endotélio da aorta são necessários para induzir a expressão do PDX-1 e insulina na endoderme pré-pancreático dorsal. As moléculas mediadoras de tal efeito incluem membros da família FGF. Uma vez iniciada a formação dos primórdios, a proliferação e morfogênese do epitélio pancreático dependem de sinais provenientes do mesênquima circundante, sinais determinantes para estabelecer a proporção do tecido exócrino e endócrino.

3.4 CÉLULAS-TRONCO

3.4.1 Células-tronco

As CT possuem capacidade única de auto-renovação e de dar origem a tipos celulares especializados. Elas são encontradas em vários tecidos do corpo e funcionam como reservas. Toda vez que um órgão ou tecido sofre uma lesão, os sinais gerados induzem parte destes progenitores latentes para se desenvolver em uma célula especializada, cumprindo um papel na manutenção, reparo e reconstituição de tecidos. De um modo geral podemos classificá-las em dois tipos: as células-tronco embrionárias (CTE) e as células-tronco adultas (CTA)(30).

Segundo a classificação quanto ao seu potencial de diferenciação, as CT totipotentes são aquelas capazes de se diferenciar em qualquer um dos 216 tecidos do corpo. Estas são as primeiras células formadas pós-fecundação, teoricamente capazes de se diferenciar em todos os tipos de células e tecidos. As CT pluripotentes são aquelas capazes de se diferenciar em quase todos os tecidos, menos placenta e anexos embrionários. Estas correspondem às originadas do zigoto, especificamente de células da massa interna do blastocisto. Uma CT multipotente seria capaz de originar tipos celulares derivados das três camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) isto é, essencialmente todos os tipos celulares encontrados em um organismo adulto (Fig.2)(30).

As CTE são aquelas provenientes de um embrião de uma semana (blastocisto) pela retirada de uma massa microscópica de 50 a 100 células desde a massa interna do blastocisto.

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

As CT são candidatas ideais na medicina regenerativa porque são as únicas populações celulares precursoras, não-especializadas, com habilidade de se expandir por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, mas podendo diferenciar-se em células especializadas de um tecido particular em resposta a sinais apropriados(31).

Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de gerar CPI a partir de precursores de várias fontes incluindo pâncreas(32-34), fígado(35-37), epitélio intestinal(38), como também de CTE murinas e de origem humana(39-42). Apesar dos avanços destas descobertas, ainda persistem limitações como a dificuldade de obtenção, rejeição do enxerto, diferenciação de apenas uma porcentagem pequena da população em cultura, e secreção insuficiente de insulina frente ao estímulo da glicose.

3.4.2 Células-Tronco Mesenquimais

As principais fontes de CT adultas são a medula óssea, o sangue periférico, o sangue do cordão umbilical e órgãos e tecidos de indivíduos adultos. Na medula óssea, residem ao menos dois tipos de CT. Dentre elas, a chamada célula-tronco hematopoética (CTH), responsável pela geração de todos os tipos celulares de tecidos hematopoéticos(43). No estroma, existe um conjunto de células não-hematopoéticas referidas como células progenitoras mesenquimais ou célula-tronco mesenquimal (CTM), que podem ser expandidas *ex vivo* e induzidas a diferenciar se tanto *in vivo* quanto *in vitro* em pelo menos sete tipos celulares: osteócitos, condrócitos, adipócitos, tenócitos, miotubos, astrócitos e células estromais de suporte(44-47). CTM com características biológicas similares àquelas derivadas da medula óssea têm sido isoladas de vários outros órgãos e tecidos como sangue periférico(48), sangue de cordão umbilical(49) e membranas sinoviais(50), o que sugere a existência de uma extensa rede de CTM no organismo, que é abastecida quando necessário.

Os cultivos de CTM da medula óssea contêm uma população homogênea de células similares a fibroblastos, que formam colônias, duplicam-se em um período de 33 horas e exibem um grande potencial de expansão que varia com as condições de cultivo(44). O fenótipo antigênico das CTM não é único, compartilhando características de células mesenquimais, endoteliais, epiteliais e musculares(44, 51, 52). Elas são negativas para marcadores de linhagens hematopoéticas e endoteliais como CD34, CD45, CD14, CD31, CD133, e são positivas para CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166(53, 54).

As CTM têm um grande potencial para ser empregado em terapias celulares, visto sua facilidade de obtenção, expansão e diferenciação, além de relativa aceitação do ponto de vista ético(31, 55-58).

Quando as CTM são cultivadas *in vitro* em condições definidas, elas podem se diferenciar em células com capacidade de produzir insulina; este fato sugere que a medula óssea contém CT capazes de serem programadas em CPI. Alguns dos protocolos de diferenciação de CTM conseguem síntese *de novo* em resposta ao estímulo de glicose e até o restabelecimento da glicemia por implantação destas células em animais diabéticos, mas os níveis de insulina secretados pelas células diferenciadas estão abaixo dos níveis fisiológicos, quando comparados com a secreção de ilhotas isoladas(59-62).

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

3.5 AGENTES INDUTORES DE DIFERENCIAÇÃO A CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA

Alguns hormônios e fatores de crescimento são conhecidos por estimular a diferenciação e renovação das células β (63). A exendina-4, um agonista sintético do receptor do GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*), é um fator que estimula a proliferação, neogênese e sobrevivência das células β *in vivo*. Promove também a proliferação e

diferenciação desde células exócrinas ou progenitores imaturos a fenótipos mais diferenciados de células β (64). O receptor do GLP-1 (GLP-1R) tem sido detectado, usando RT-PCR e imunocitoquímica, em algumas subpopulações de precursoras de células β (nestina+) no interior das ilhotas, e em células ductais pancreáticas humanas(65, 66). A exendina-4 também tem sido usada com sucesso em protocolos de diferenciação para CPI(62).

Nicotinamida, também denominada niacina ou vitamina B3, pertence ao grupo de vitaminas do complexo B. Ela participa em muitos processos biológicos, incluindo a produção de energia, síntese de ácidos graxos, colesterol e esteróides, transdução de sinais e manutenção da integridade do genoma. O tratamento com nicotinamida previne o desenvolvimento do diabetes em modelos animais, e o tratamento de ilhotas fetais humanas – ricas em células indiferenciadas - com nicotinamida produz diferenciação morfológica e funcional a ilhotas maduras, provocando um aumento na síntese de DNA e na produção de insulina(67). Em protocolos de diferenciação de células β , a nicotinamida também tem sido usada com bastante sucesso(59, 62).

3.6 EFEITOS DA PRL

As mudanças adaptativas que ocorrem nas ilhotas pancreáticas durante a gravidez incluem aumento da síntese e secreção de insulina, e alterações morfológicas e proliferação das células β . A elevada atividade de hormônios lactogênicos - prolactina (PRL) e lactogênio placentário (LP) - na gestação é a principal responsável por estas mudanças na função das células β (68-70).

O hormônio PRL é sintetizado pela pituitária e tecidos extra-pituitários. A PRL exerce seus efeitos biológicos principalmente pelas vias de Janus kinase e do Signal transducer and activator of transcription-5 (JAK/STAT 5), e do fosfatidilinositol 3 kinase e MAP kinase. Estas vias participam no incremento da massa das ilhotas e na sua sensibilidade à glicose no período gestacional(71). A PRL aumenta a secreção de insulina principalmente por induzir a atividade da glucoquinase(72); tem também um efeito sinérgico com a glicose na expressão de GLUT2 em ilhotas neonatais de rato(73). O co-transplante de tecido da pituitária com ilhotas pancreáticas, na cápsula do rim de camundongos, melhorou significativamente a função endócrina, o conteúdo de insulina e a vascularização dos enxertos de

ilhas(74). Aproximadamente 92-97% da população celular da medula óssea de camundongos expressa níveis basais do receptor de PRL (PRL-R)(75). A expressão do PRL-R é induzida durante o processo de diferenciação adipogênica em uma variedade de tipos celulares, e está presente em níveis basais em células da linhagem mesenquimal da medula óssea(76). Estes dados sugerem que a PRL poderia ter um efeito de maturação e aumento da expressão de insulina na diferenciação das CTM em células produtoras deste hormônio.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

As CTM foram isoladas da medula óssea de ratos machos da linhagem Wistar, com aproximadamente dois meses de idade, pesando entre 270-300 g, obtidos do biotério da Universidade Federal do Paraná. Cada cultivo realizado neste estudo correspondeu a um pool de CTM obtidas a partir de um grupo de 4 ratos. A metodologia aplicada neste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUC-PR em junho de 2007 (protocolo nº 236).

4.2 COLETA DA MEDULA ÓSSEA

Os animais foram sacrificados com uma dose letal da combinação dos anestésicos ketamina/xilazina. Realizou-se a assepsia do animal na parte inferior do corpo utilizando álcool iodado e gaze, seguida de uma incisão na pele e a retirada dos músculos que envolvem o fêmur e a tíbia. Os fêmures foram retirados cuidadosamente para não romper as epífises dos ossos e lavados em PBS com 2% de antibiótico. Em ambiente de fluxo laminar, as duas epífises foram cortadas com alicate e a medula óssea foi coletada em tubo cônico de 50 mL. A coleta foi feita por lavagem do canal medular dos fêmures com auxílio de uma pinça e seringa com agulha 16G, com meio DMEM suplementado com antibiótico. Os grumos de medula foram desagregados pela passagem suave da suspensão celular através da agulha. A suspensão celular foi diluída com 10 mL de meio por fêmur e lavada duas vezes por centrifugação a 400 xg por 5 min a TA.

4.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

O isolamento das células mononucleares (CM) da medula óssea foi realizado de acordo com o método de Boyum modificado. A suspensão celular obtida da medula óssea foi disposta sobre um gradiente de densidade Histopaque 1.077 (Sigma-Aldrich) em tubo cônico de 15 mL, na razão de 2:1 (suspensão celular/gradiente), e centrifugada a 4°C por 30 min a 400 xg. Após a centrifugação, as CM foram coletadas por aspiração na interface entre o meio e o gradiente de

densidade, transferidas para tubo cônico de 15 mL, diluídas com DMEM e centrifugadas por 10 min a 400 xg. O sobrenadante foi removido, as células foram lavadas duas vezes com DMEM, centrifugadas por 10 min a 400 xg e o botão de células ressuspenso em meio DMEM suplementado. A concentração e a viabilidade celular foram verificadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de Tripan.

Alíquotas do material celular obtido foram cultivadas e expandidas *in vitro*, e utilizadas para demonstrar a sua origem mesenquimal, conforme roteiro apresentado na Figura 5. Os cultivos caracterizados como CTM foram utilizados para os experimentos de diferenciação em células β .

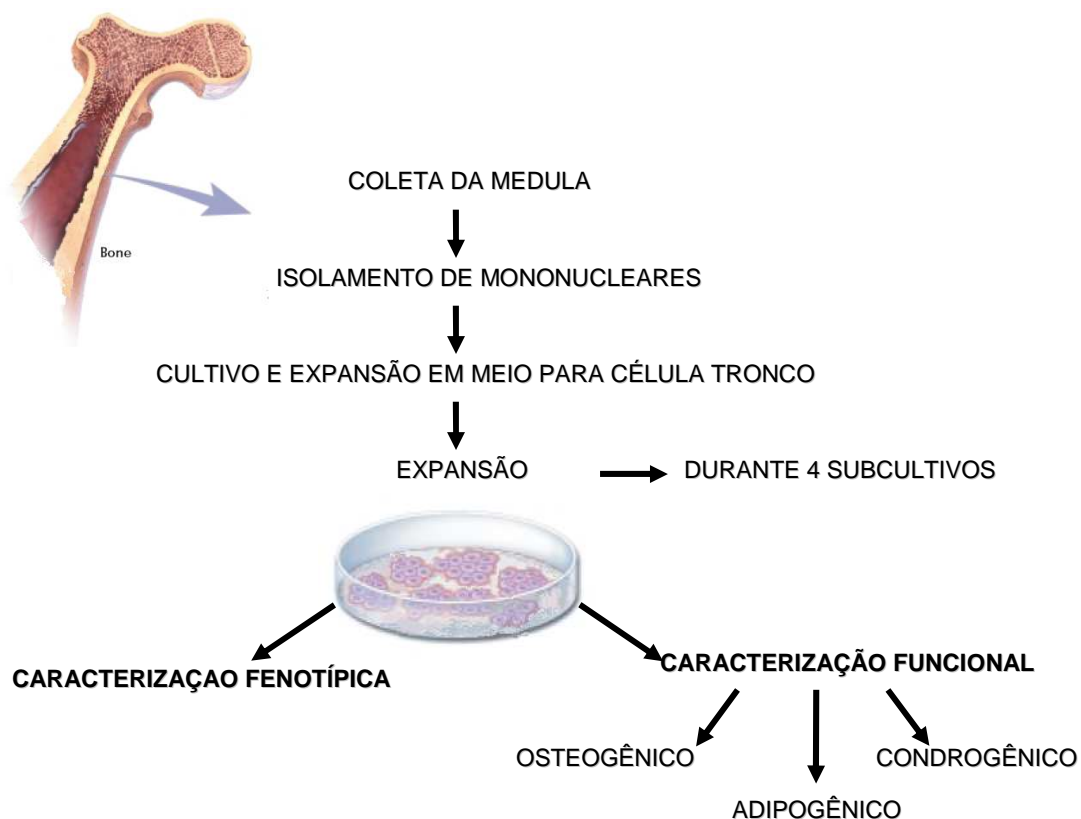


Fig. 5 - Roteiro das etapas de isolamento, cultivo e caracterização das CTM

4.4 CULTIVO E EXPANSÃO DAS CTM EM ESTADO INDIFERENCIADO

As células foram semeadas em garrafas de cultivo a uma densidade de 2×10^5 células/cm², em incubadora a 37°C, em atmosfera úmida com tensão de 5% de CO₂. Foi utilizado meio de cultivo com baixa concentração de glicose (L-DMEM 5,5 mM glicose) suplementado com 100 µg/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina, 10 mM de HEPES, e 10% de soro fetal bovino qualificado para o cultivo de CT (SFB-ES). Após 24-48 horas, as células não aderentes eram removidas na troca de meio. O meio foi trocado a cada 2-3 dias. As células foram observadas em microscópio óptico invertido diariamente com relação à sua morfologia e proliferação. Quando as células alcançavam confluência de aproximadamente 80%, procedia-se à dissociação celular, utilizando a enzima Tripsina (Invitrogen) e semeadas a uma densidade de 5×10^4 células/cm². Os cultivos foram expandidos até o quarto subcultivo, quando havia uma quantidade suficiente para caracterizar o seu fenótipo e semear o número de placas necessárias para realizar os diferentes tratamentos de diferenciação e as respectivas análises de biologia molecular e imunofluorescência.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS CTM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Ao final do 4º subcultivo, alíquotas das CT isoladas foram utilizadas para caracterização por citometria de fluxo. As células foram descoladas da placa com solução de tripsina/EDTA 0,25% a 37°C por 3 min, lavadas com PBS 1% de SFB e contadas em câmara de Neubauer. Em microtubos de centrifuga, foram distribuídas aproximadamente 3×10^5 células/tubo e procedeu-se à centrifugação a 400 xg por 5 min a 4°C. O sedimento celular foi ressuspenso 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): anti-CD29 e anti-CD45 conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), e anti-CD73 conjugado à ficoeritrina (PE). Nos 2 tubos restantes foram adicionados os controles isotípicos conjugados ao FITC e à PE (Quadro 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), e transferidas para tubos próprios para citometria de fluxo.

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

TUBO	ANTICORPOS
1	controle isotópico conjugado PE
2	controle isotópico 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 FACSCalibur (BD). O equipamento foi ajustado para as condições de análise de tamanho e complexidade celular, e o ajuste de fluorescência foi realizado com auxílio dos controles isotípicos FITC e PE. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra, e os dados foram analisados com auxílio do *software* CellQuest Pro (BD).

4.6 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO DAS CTM EM LINHAGENS MESENQUIMAIS

Para confirmar o potencial de diferenciação em linhagens mesenquimais (adipócito, condrócito e osteócito), as células (4^o subcultivo) de 5 cultivos diferentes foram cultivadas em microplacas de 24 poços, os quais foram previamente recobertos com lamínulas de vidro redondas (Sarstedt). As células foram plaqueadas nos poços contendo as lamínulas, numa concentração de 1×10^4 células/mL, e permaneceram até atingirem a confluência adequada para o início do tratamento de diferenciação. Foram utilizados meios especiais de diferenciação, segundo o

protocolo descrito por Pittenger *et al* (1999)(52), seguido de análise citoquímica para confirmação da diferenciação.

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

Para a diferenciação adipogênica, as células foram semeadas meio contendo alta concentração de glicose (H-DMEM, 25mM) e 10% SFB, 1 μ M dexametasona, 10 μ g/mL insulina e 100 μ 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 xg por 10 min e a seguir incubadas em meio contendo alta glicose (25mM) e 1% SFB, 0,01 μ M dexametasona, 10 ng/mL TGF β (Transforming growth factor- β), 1% de ITS (suplemento *Insulin-Transferrin-Selenium* - Invitrogen), 4 μ 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.

4.7 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DAS CTM EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA

O protocolo utilizado para a diferenciação das CTM em CPI foi adaptado da técnica utilizada por(62), e modificado pela adição de PRL no meio de cultivo, na última etapa do protocolo. Na Figura 6 está apresentado um roteiro do protocolo de diferenciação.

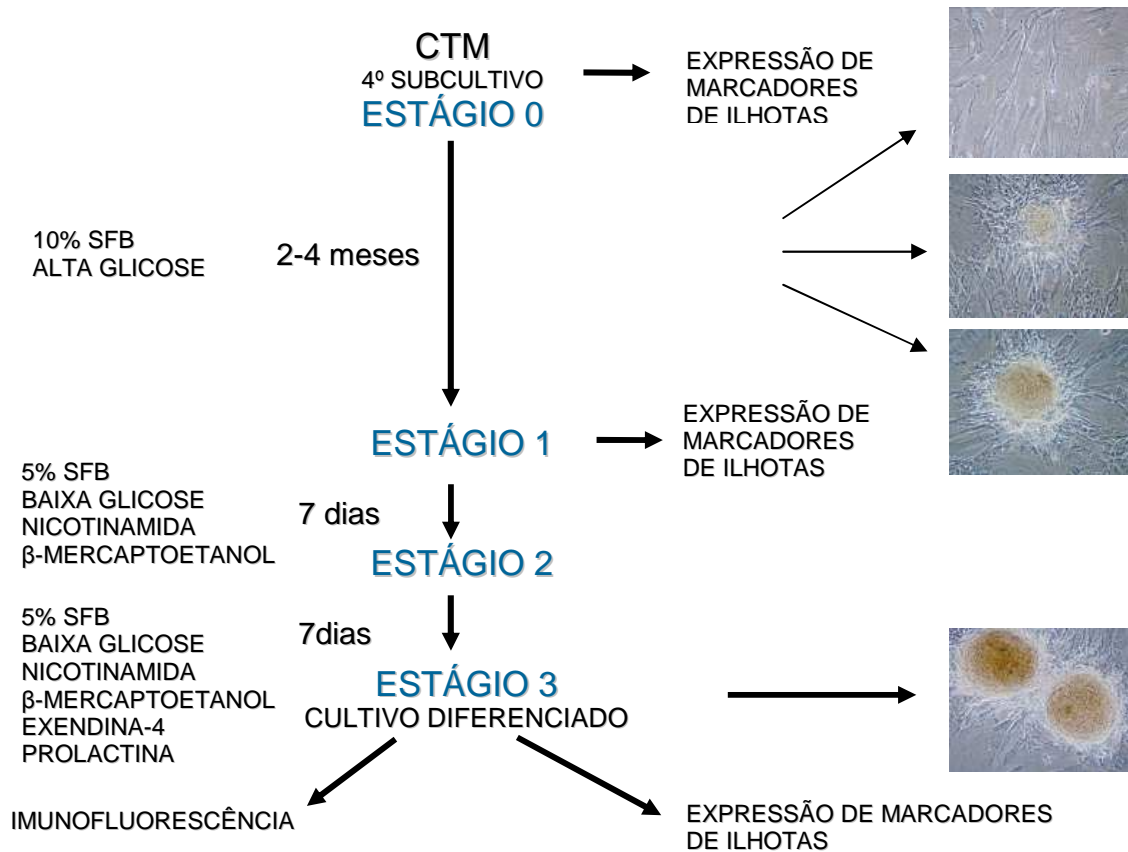


Fig. 6 - Roteiro do protocolo de diferenciação em células produtoras de insulina e das etapas de análise

Brevemente, a partir do quarto subcultivo, (estágio 0) as células foram cultivadas em meio com alta glicose (H-DMEM, 25 mM) suplementado com 10% SFB, durante aproximadamente 2-4 meses, até a aparição de *clusters* celulares (estágio 1). A seguir, os cultivos foram pré-incubados em meio com baixa glicose (L-DMEM, 5,5 mM glicose) suplementado com 5% SFB, 10 µM Nicotinamida e 1 mM β-mercaptoetanol, durante 7 dias (estágio 2). Nos 7 dias seguintes, os *clusters* eram reinduzidos com as condições anteriores, apenas adicionando-se 10 nM exendina-4 (Sigma) e 500 ng/mL rrPRL(77) (estágio 3). A rrPRL (prolactina recombinante de rato) utilizada nestes experimentos foi obtida do National Hormone & Peptide Program (NHPP) de Los Angeles, EUA). Amostras de RNA dos cultivos diferenciados e os respectivos controles sem tratamento e sem PRL foram extraídas nos estágios 0, 1 e 3.

4.8 IMUNOFLOURESCÊNCIA

Os cultivos da etapa final da diferenciação, tratados ou não com PRL, foram analisados por imunofluorescência indireta para verificar a expressão de fatores de transcrição e hormônios típicos de ilhotas pancreáticas. Os *clusters* foram desagregados com tripsina 0,25% por 5 min e as células foram resuspendidas a uma concentração de 30.000 células/mL para serem aderidas em lâminas, por *cytospin* em centrífuga Cytopro 7620 (Wescor) a 1000 rpm por 5 min. A seguir, foram fixadas em 4% PFA por 30 min e permeabilizadas em 1% Triton X 100 durante 30 min a TA. As lâminas foram então incubadas por 2 h a TA ou a noite toda a 4°C em solução de 1% BSA em PBS, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

Os anticorpos primários policlonais (todos Abcam, produzidos em coelho), diluídos em solução de bloqueio de acordo com as instruções do fabricante, foram adicionados às lâminas e incubados por 2 h a 37°C em estufa. O Quadro 2 apresenta a relação dos anticorpos primários utilizados e a respectiva diluição. A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 min com 0,05% PBS-Tween-20 0,05% e incubadas por 1 h a 37°C com anticorpo secundário anti-coelho (produzido em cabra) e conjugado com FITC (Abcam), diluído 1:1000 em solução de bloqueio. Nesta incubação também foi incluído DAPI, para visualização dos núcleos celulares. As lâminas foram lavadas mais 3 vezes por 5 min em PBS-Tween-20 0,05% e montadas em meio de montagem Vectashield para fluorescência (Vector Laboratories). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600, com registro de imagens digitais em câmara CoolSnap (Media Cybernetics).

Quadro 2. Anticorpos primários (Abcam) utilizados em imunofluorescência indireta para identificar marcadores de ilhotas pancreáticas nas CTM diferenciadas

ANTICORPO	DILUIÇÃO
Insulina	1:100
Somatostatina	1:100
Glucagon	1:100
PDX-1	1:500

4.9 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA

Amostras de RNA foram isoladas dos cultivos para avaliar, por PCR em Tempo Real, a expressão de marcadores de diferenciação. Para a extração e purificação do RNA total foi utilizado o RNeasy Mini kit (Qiagen). Amostras de três diferentes cultivos, em cada estágio da diferenciação (estágios 0, 1 e 3), e dos controles positivos (ilhotas de rato e linhagens celulares INS e RIN) foram lavadas duas vezes com PBS gelado. Imediatamente, foi adicionado à placa a solução de lise RLT (600 μ L) contendo 1% β -Mercaptoetanol. O lisado foi purificado na coluna do kit, seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi tratado com DNase para remover possível DNA contaminante. O RNA foi eluído da coluna com um volume de 30 μ L para que a amostra ficasse concentrada. A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro a uma absorvância de 260 nm. O grau de pureza foi determinado através da razão das medidas nos comprimentos de onda a 260 e 280 nm. As amostras foram armazenadas a -70°C , até o momento da análise.

4.10 SÍNTESE DE cDNA

O RNA total isolado dos cultivos foi utilizado como *template* para a síntese de cDNA em uma reação de transcrição reversa. Quando necessário, as amostras de RNA total foram concentradas em microcon (Millipore) para obter 1 μ g de RNA em até 8,6 μ L. Para cada amostra, a reação foi preparada com 2 μ g de RNA total, 1 μ L de Oligo dT 500 ng/mL (Ge Healthcare) e H₂O para um volume final de 20 μ L. As amostras foram incubadas a 70°C por 10 min e, em seguida, foram adicionados para cada amostra 4 μ L de tampão 5x ImProm II (Promega), 2,4 μ L de MgCl₂ (25 mM), 1 μ L de dNTPs (10 mM), 1 μ L de RNase Out (Promega) e 1 μ L de Transcriptase Reverse (Promega). A reação foi incubada em termociclador Perkin-Elmer 9700 por 2 h a 42°C. A seguir, foi adicionado 1 μ L de RNase H (Promega 2 U/ μ L) e incubado por 30 min a 37°C. Ao término da reação foram adicionados 400 μ L de água ultrapura e as amostras transferidas para a unidade filtrante microcon 30 (Millipore), sendo centrifugadas por 9 min a 10.000 rpm. O produto foi reconstituído em 400 μ L de água ultrapura, resultando numa concentração de 2,0 ng/mL de cDNA.

4.11 PCR EM TEMPO REAL

Os cDNAs de três cultivos diferentes foram comparados em três estágios de diferenciação (estágios 0, 1 e 3) e o estágio 3, foi comparado o tratamento com PRL e o seu controle. Como controle positivo da expressão foram utilizadas cDNAs de ilhotas pancreáticas de rato e dos insulinomas de rato RIN (células Rin-5mf) e INS. As amostras do estágio 3 contavam também com o controle sem adição de PRL. Foram realizadas diluições seriadas (1:5) das amostras para obter a curva de calibração. A concentração das amostras estava na faixa de 2,4 – 3,5 ng/μL. Todas as reações foram realizadas em triplicata, contendo 5 μL do cDNA, 1 μL de um mix dos *primers Forward* e *Reverse* (3,2 μM cada) e 10 μL de SYBR® Green. As reações de amplificação e quantificação dos produtos formados foram realizadas no termociclador *7500 Real Time PCR* (Applied Biosystems). Todas as reações foram montadas dentro do fluxo laminar para evitar contaminação. As condições da PCR foram ajustadas utilizando um programa de 1 ciclo de 10 min a 95°C e 45 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 58°C e 1 min a 72°C. O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados durante a amplificação foram realizados pelo programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems).

Os genes avaliados nesta análise de expressão diferencial e os respectivos *primers* estão descritos no Quadro 3.

Quadro 3. Genes analisados por PCR em tempo real nas amostras de CTM de rato diferenciadas e a respectiva seqüência dos *primers* utilizados

Gene	Seqüência	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
GAPDH	CGACTTCAACAGCAACTCCCCTC	CACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC
PRLr α	CTGGGCAGTGGCTTTGAAG	CCAAGGCACTCAGCAGCTCT
PRLr β	CTGGGCAGTGGCTTTGAAG	AAGGGCCAGGTACAGATCCA
Insulina 1	CCCTAAGTGACCAGCTACAATCATAG	TTTGACAAAAGCCTGGGCAGGCTT
Insulina 2	GGCTCCCAGAGGATGAGCAG	CTAAGTGACCAGCTACAGTCGGAA
PDX-1	GGATGAAATCCACCAAAGCTCAC	AGGCTGTACGGGTCCTCTTATTCT
GLUT-2	TGCTACACTTGGCTCAGCAGTT	TGCATACACAGGCTGGCTGAT
Isl1	CCTAGGAGCTGGAGACCCTCTCAGT	AGCTGGCTGCCTAGCGGAGAT
Glucagon	CTGGATTGTTTGTAAATGCTGGTACA	GTCTGGGAAGCTGGGAATGAT
Glicoquinase	CTACTATGAAGACCGCCAATGTGA	CTTCCACCAGCTCCACATTCT
Somatostatin	GTTGTCTCAGCCAGACCTCTGAT	TTCAATTTCTAACGCAGGGTCTAGT
PPY	GAAGGTAGGTGTCTGGGTCCAATA	CACCCAAGTGGATAGGAGAAACA
NeuroD1	CCTCGTCTCCTTTGTACAGACT	GATTCTGCTCAGGCAAGAAAGTC
Pax6	CGGAAGCTGCAGAGAAATAGAAC	ACATCTGGATAATGGGTCCTCTCA
Ngn3	AACCCGCAGCTCTCTGTTCTT	ACTCCACGCGGGACTAGAGTA
Nkx2.2	AGCAGCGACAACCCCTACACTACT	GGGACTTGGAGCTCGAGTCTTG
Nkx6.1	GGATGACGGAGAGTCAGGTCAA	TCTCCGAGTCCTGCTTCTTCTT
IAPP	CTCGGCCACTTGAGAGCTACA	AAGAAGTTTGCCAGACGTTGTGT
Hlxb9	GGAACACCAGTTCAAGCTCAACA	CGGTTCTGGAACCAAATCTTCA

4.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS DO 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 *Ct* (*Threshold cycle*

– o ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do background) da amostra analisada.

Foi utilizado um método de quantificação relativa para analisar os dados. Assim, para cada cDNA analisado eram realizadas duas reações, sendo uma utilizando *primers* para o gene analisado e outra utilizando *primers* para um controle interno (gene *housekeeping*). Neste caso, foi utilizado o gene GAPDH e a diferença entre os Cts dos dois genes foi definida como ΔC_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 ΔC_t das duas amostras(78). 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).

No nosso sistema, a amostra de referência correspondeu ao estágio indiferenciado (E0) e as amostras dos estágios E1, E3-PRL e E3+PRL foram analisadas com respeito ao primeiro E0. O branco foi incluído nos gráficos para comparar as amostras com o *background*.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados de PCR em Tempo Real, foi utilizado o *software* SPSS v.15.0 (SPSS Inc). Para a avaliação da diferença de expressão de cada gene entre os diferentes estágios de diferenciação, foi utilizada análise de variância unidirecional Anova seguida de teste de Tukey, que realiza uma comparação múltipla dois a dois das médias dos valores de níveis de expressão dos genes estudados. As diferenças com um $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

5. RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E CULTURA DE CTM DA MEDULA ÓSSEA DE RATO

Os cultivos de CTM de medula óssea de rato foram obtidos como descrito em Materiais e Métodos. O rendimento de células mononucleares totais a partir de dois fêmures foi de aproximadamente $5,02 \times 10^7 \pm 13,3 \times 10^7$ células/rato ($n = 5$). A viabilidade celular avaliada por azul de Tripán foi, em média, de $98,6\% \pm 0,2$. As células eram plaqueadas em baixa densidade em garrafas com meio L-DMEM contendo 10% soro fetal bovino e antibióticos e mantidas a 37°C por 24h. Após este período, as células não-aderentes eram descartadas e adicionava-se meio novo.

As células aderentes eram mantidas até atingir 80% de confluência, o que acontecia geralmente entre 1 e 2 semanas, quando eram então tripsinizadas e transferidas a uma placa nova em uma diluição 1:2. A aparência microscópica dos cultivos primários era de células arredondadas (Fig. 11A), e com o avanço das passagens tomavam um aspecto mais alongado semelhantes a fibroblastos.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTM

5.2.1 Caracterização das CTM por Citometria de Fluxo

Para caracterizar o fenótipo das células indiferenciadas, utilizamos citometria de fluxo para determinar a expressão de marcadores de superfície tanto hematopoéticos quanto mesenquimais. Entretanto, o fenótipo das CTM não é exclusivo, os marcadores geralmente utilizados para caracterizá-las são compartilhados com outros tipos celulares. Dentre os marcadores mesenquimais utilizados neste trabalho, o antígeno CD29 (cadeia $\beta 1$ de integrina; receptor de fibronectina) é expresso em vários tipos celulares, especialmente em fibroblastos, células epiteliais, plaquetas e leucócitos, enquanto o CD73 (molécula com atividade enzimática de 5'-nucleotidase) encontra-se em linfócitos B e T e células epiteliais. O marcador CD45 é uma proteína tirosina-fosfatase, expressa exclusivamente em células de linhagem hematopoética.

As células de três cultivos diferentes, na 4^a passagem, foram marcadas diretamente com anticorpos anti-CD29-FITC, CD45-FITC e CD73-PE, em tubos

separados. Em seguida, foram submetidas à citometria de fluxo em aparelho FACS Calibur e analisadas pelo software BD CellQuest Pro.

O resultado deste experimento está ilustrado na Figura 7. 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, como esperado. Apenas uma pequena porcentagem (aproximadamente 10%) mostrou-se positiva, possivelmente como um remanescente de células hematopoéticas ainda presentes no cultivo.

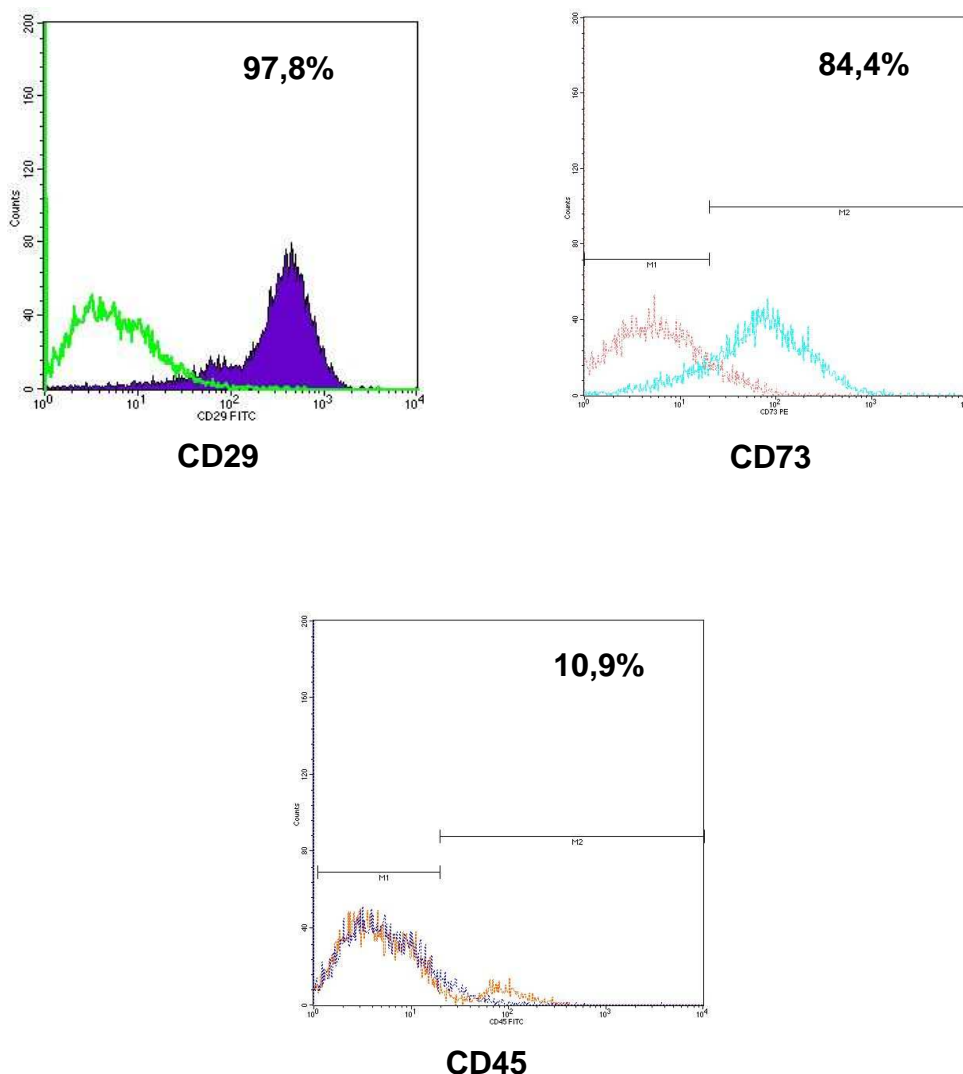


Fig. 7 - Perfil da expressão de marcadores de superfície, por citometria de fluxo, em células de 4^o subcultivo de medula óssea de rato (n=3)

5.2.2 Ensaio de diferenciação das CTM em linhagens mesenquimais

O potencial de diferenciação dos cultivos é confirmado quando as CTM são capazes de originar osteócitos, condrócitos e adipócitos. As células foram submetidas ao protocolo de diferenciação como descrito em Material e Métodos.

Para a diferenciação osteogênica, as culturas foram mantidas durante 21 dias com meio DMEM 10% SFB, contendo 0,1 μ M dexametasona, 10 mM β -glicerolfosfato e 0,2 mM ácido ascórbico 2-fosfato, enquanto os controles continham apenas DMEM 10% SFB. Para a detecção da diferenciação, as culturas foram coradas pelo método da Alizarin Red, que cora exclusivamente os cristais de fosfato de cálcio na matriz. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 8.

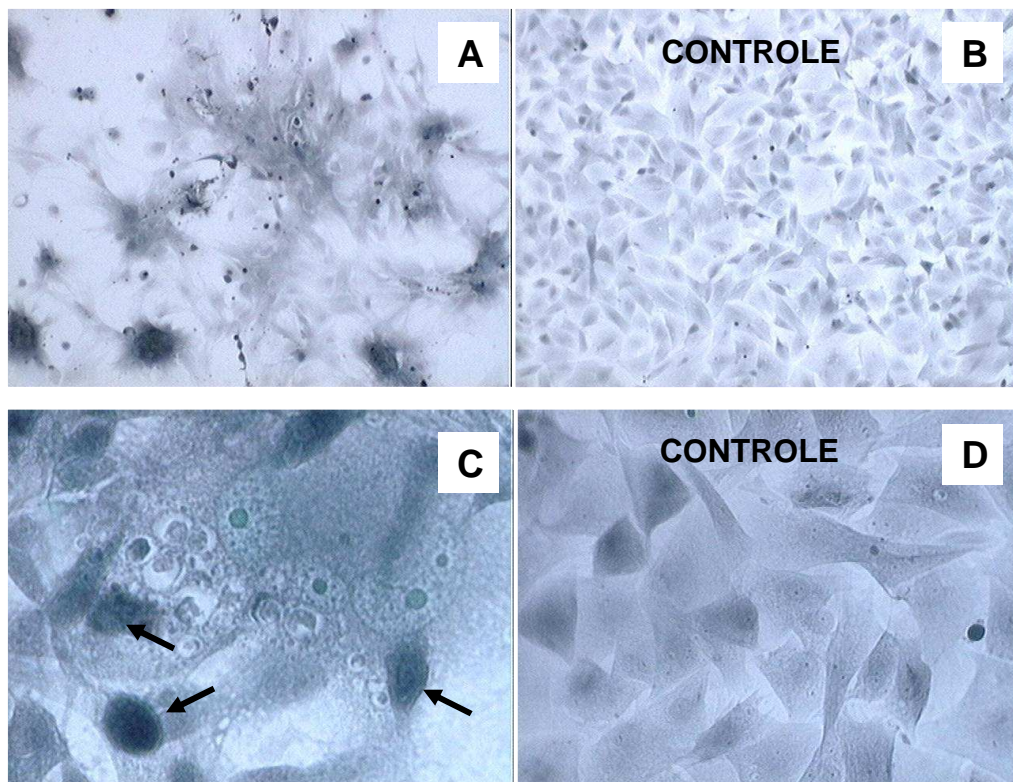


Fig. 8 - Diferenciação osteogênica de CTM de medula óssea de rato. (A) cultivo diferenciado, (B) controle, (100X); (C) cultivo diferenciado, (D) controle (1000X). Coloração com Alizarin red pH 4,2 e light Green Yellowish (n=5). As setas na figura indicam a localização de depósitos de cálcio

A calcificação aparece como regiões escuras quase pretas na matriz secretada. Várias regiões calcificadas foram observadas nos cultivos diferenciados, e não foi observada nos cultivos controle.

Para a diferenciação adipogênica, as culturas foram mantidas durante 21 dias em meio (H-DMEM) com alta concentração de glicose (25mM) e 10% SFB, contendo 1 μ M dexametasona, 10 μ g/mL insulina e 100 μ M indometacina, enquanto os controles continham apenas H-DMEM 10% SFB. Para a detecção da diferenciação, as culturas foram coradas com Oil red O, que cora os vacúolos lipídicos dentro das células. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 9.

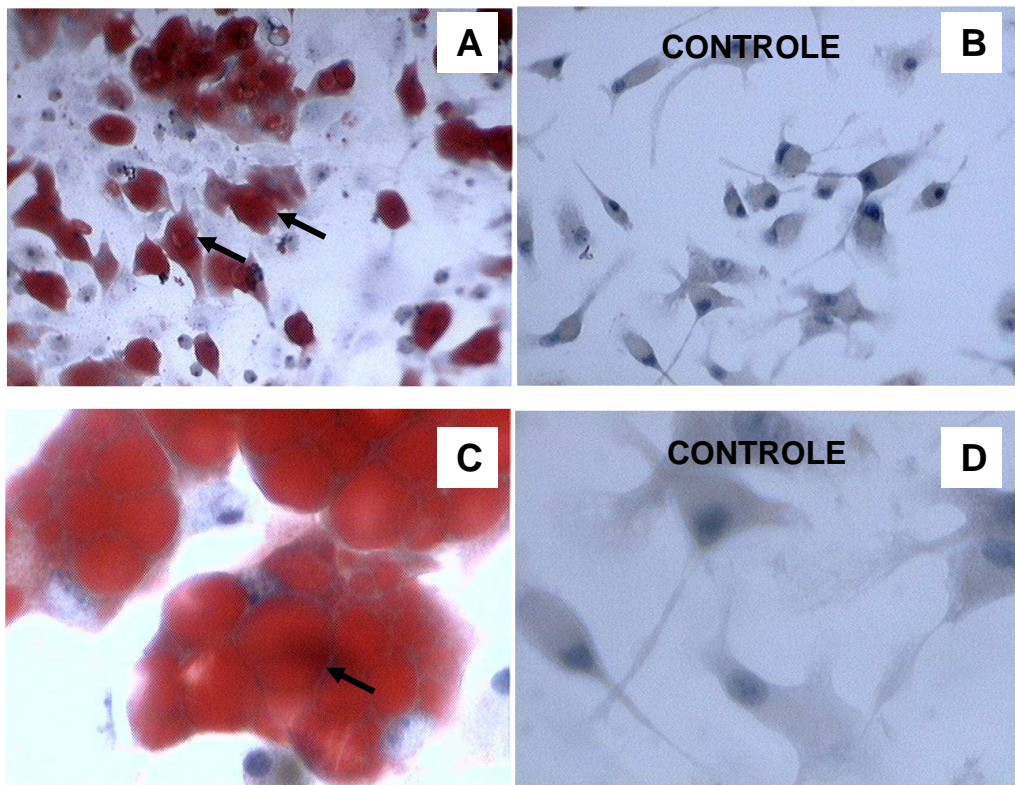


Fig. 9 - Diferenciação adipogênica de CTM de medula óssea de rato. (A) cultivo diferenciado, (B) controle, (200X); (C) cultivo diferenciado, (D) controle (1000X). Coloração dos vacúolos com Oil red O e dos núcleos com Hematoxilina (n=5). As setas na figura indicam a localização de vacúolos lipídicos

Uma fração significativa do cultivo apresentou células com múltiplos vacúolos lipídicos corados. Os vacúolos não foram observados nos cultivos controle.

Para a diferenciação condrogênica, as culturas foram mantidas em incubadora durante 21 dias em tubo cônico de 15 mL, em meio H-DMEM 1% SFB, 0,01 μ M dexametasona, 10 ng/mL TGF β , 1% de ITS, 4 μ g/mL ácido ascórbico 2P e 1 mM piruvato de sódio, enquanto os controles continham apenas H-DMEM 10% SFB. As células diferenciadas formavam uma massa arredondada a partir do *pellet*, a qual foi fixada com formalina 10%. submetida ao preparo de lâminas histológicas e coradas com Sirius red para detecção de colágeno. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 10.

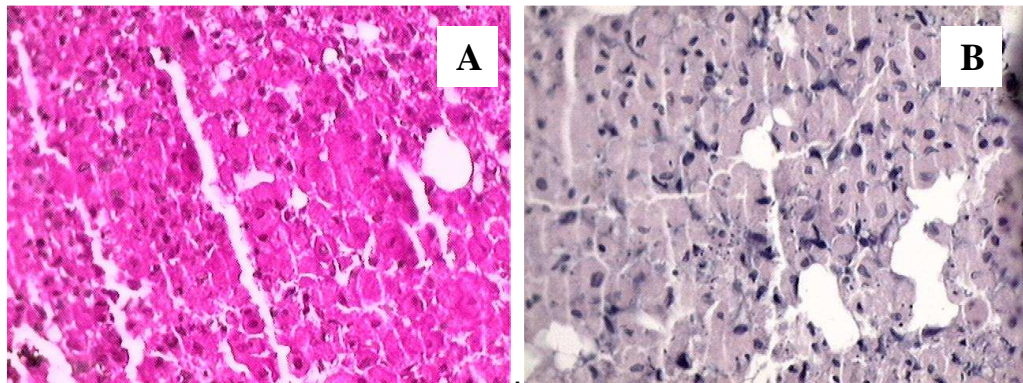


Fig. 10 - Diferenciação condrogênica de CTM de medula óssea de rato. Cultivo diferenciado. (A) colágeno corado com Sirius red, (B) condrócito corado com Hematoxilina eosina (HE), (400X) (n=3)

A presença de colágeno foi evidenciada em todo o cultivo, por coloração com Sirius red (Fig. 10A). A Figura 10B mostra o cultivo diferenciado 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).

Portanto, estas análises (realizadas em 5 cultivos diferentes) demonstram que os cultivos de medula óssea de rato apresentam potencial de diferenciação para osteócitos, adipócitos e condrócitos, comprovando sua origem mesenquimal.

5.3 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DAS CTM EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA

5.3.1 *Cultivo e expansão em estado indiferenciado*

As CTM obtidas da medula óssea de rato foram cultivadas, mantidas e expandidas em L-DMEM 10% SFB, em baixa concentração de células/cm², evitando confluência para mantê-las em estado indiferenciado (Fig 11A). Estas células exibiam morfologia similar a fibroblastos, expandiam facilmente *in vitro* e tinham a tendência para formar colônias.

5.3.2 *Diferenciação in vitro das CTM em células produtoras de insulina*

Para o processo de diferenciação de CTM de medula óssea de rato em CPI, foi utilizado o protocolo descrito em Tang *et al* (2004)(62) e detalhado no item 4.7 de Material e Métodos.

Após a caracterização da origem mesenquimal dos cultivos (na 4ª passagem), estes foram semeados a uma densidade de 2×10^5 células/cm² até se tornarem confluentes. Quando os cultivos eram induzidos com meio contendo 10% SFB e alta concentração de glicose (H-DMEM), as células atingiam confluência e começava a se evidenciar a aparição de *clusters* celulares, o qual não acontecia antes de um a dois meses de cultura (Fig 11B). Conforme o avanço do tempo de incubação em alta glicose, as células mudavam de aparência, tornando-se similares a fibroblastos. Com a proliferação das células, o cultivo se tornava cada vez mais confluyente e menos refringente. A partir do segundo mês de cultivo em alta glicose, observou-se a aparição de vários *clusters* celulares (Fig. 11C) os quais cresciam até formar esferas no quarto mês (Fig. 11D). Estes *clusters* aumentavam em tamanho e número com o passar do tempo. Nesta etapa, os *clusters* eram então induzidos inicialmente com 10 µM de nicotinamida e reinduzidos com 10 µM de nicotinamida, 500 ng/mL de PRL e 10 ηM de exendina-4. Os controles para os experimentos de indução com PRL foram cultivos nos quais apenas este hormônio não foi adicionado ao meio. No final dos últimos 14 dias da diferenciação com nicotinamida e os hormônios, os *clusters* cresceram, o cultivo ficou mais refringente e a monocamada

e células que não formava *cluster* começou a se perder. Só os *clusters* permaneceram aderidos (Fig. 11E). Não foram observadas diferenças significativas na aparência dos cultivos com e sem PRL no final do protocolo de diferenciação.

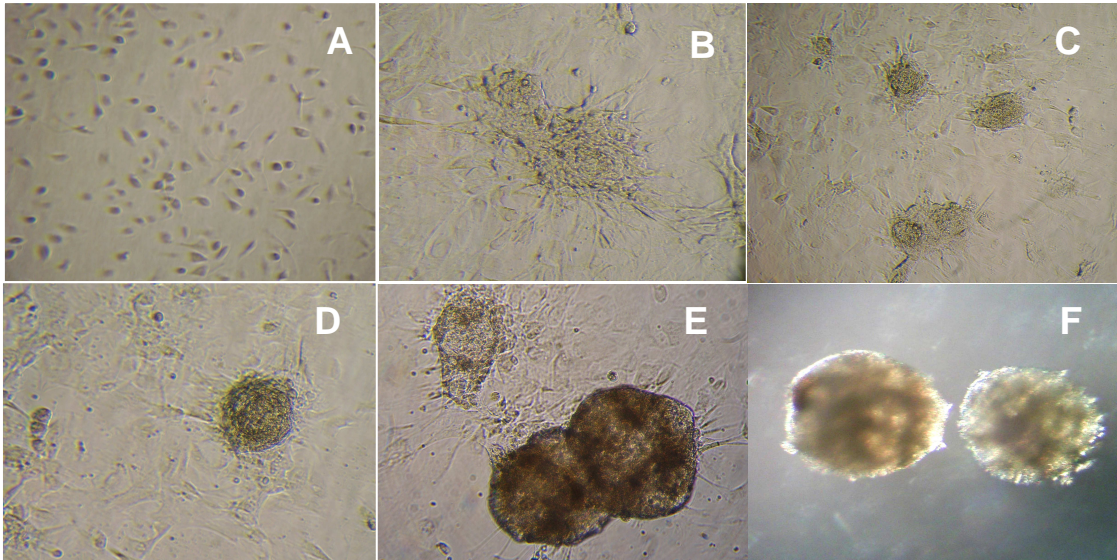


Fig. 11 - Estágios de cultivo e diferenciação de CTM. (A) Cultivo primário, 100X; (B) Formação de *clusters* após um mês de cultivo em alta glicose, 200X; (C) Formação de *clusters* após dois meses de cultivo em alta glicose 100X; (D) Formação de *clusters* após quatro meses de cultivo em alta glicose, 100X; (E e F) *Clusters* na etapa final da diferenciação com prolactina, 100X

As observações feitas durante o processo de diferenciação foram semelhantes às descritas no trabalho de Tang *et al* (2004), mas os resultados obtidos apresentavam diferenças, em especial após a adição de nicotinamida aos cultivos, quando foram observadas algumas dificuldades.

Após a geração dos *clusters* celulares no estágio 1 (no quarto mês de indução com alta glicose), as condições de cultura eram mudadas para baixa glicose e 10 mM de nicotinamida. Nesta fase, já no segundo dia de incubação observava-se que as células descolavam da placa, tanto as células que formavam monocamada quanto as que formavam *clusters*, e o cultivo terminava se perdendo por completo. No trabalho de Tang *et al* (2004), o tratamento com nicotinamida não ultrapassava duas semanas, e só ficavam com as células que permaneciam aderentes, uma

grande quantidade descolava da placa. A maioria dos trabalhos utiliza esta concentração (10 mM) de Nicotinamida, mas nenhum estudo informa sobre efeitos tóxicos observados durante o cultivo com nicotinamida. Imaginamos que o problema poderia estar no nosso cultivo em particular, na mudança um tanto drástica de restrição de nutrientes ou na própria concentração de nicotinamida. Para tentar dar uma explicação a este fenômeno observado, tratamos um cultivo de CTM com diferentes concentrações de nicotinamida por um período de 72 horas e observamos a viabilidade celular com azul de Tripán ao final do período. Neste teste utilizamos nicotinamida de dois lotes diferentes da marca Sigma (N1 e N2), e determinamos a viabilidade como porcentagem de células vivas do total (vivas mais mortas), em triplicata (Gráfico 1). Na concentração de 10 mM de nicotinamida, a proporção de células vivas atingiu aproximadamente 75% do total, valor bastante abaixo do obtido nas demais concentrações, sempre acima de 90%. Portanto, optamos por modificar o protocolo de diferenciação, utilizando nicotinamida na concentração de 0,01 mM, que aparentemente não produzia uma queda significativa na viabilidade celular.

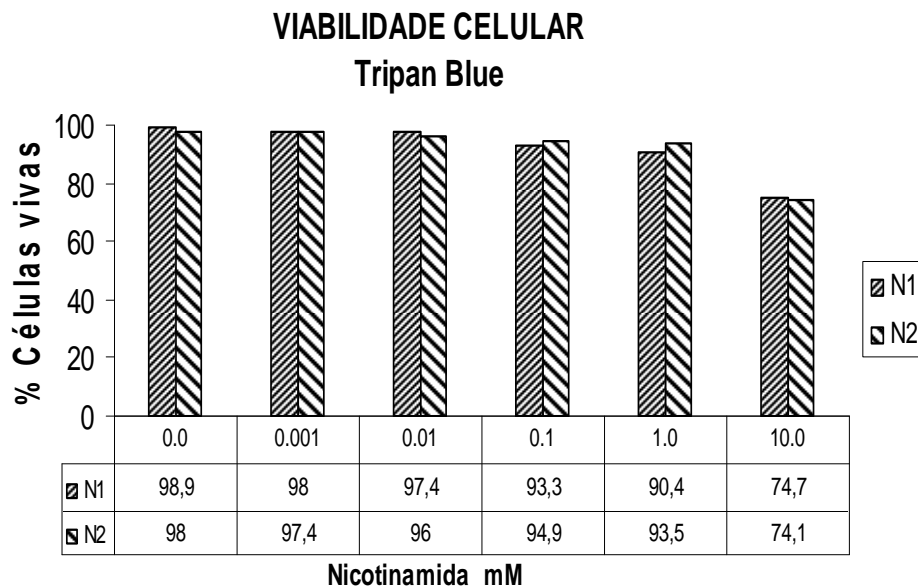


Gráfico 1 - Efeito de diferentes concentrações de nicotinamida na viabilidade celular de cultivo de CTM. após 72 horas de incubação

5.4 ISOLAMENTO DOS *CLUSTERS*

Como pode ser observado na figura 12A, o cultivo de CTM após indução da diferenciação é heterogêneo, apresentando muitas estruturas condensadas ou *clusters* celulares debilmente aderidos à placa e células de aspecto irregular ainda formando monocamada. Pelo fato destas células com aspecto irregular na monocamada possivelmente estarem ainda em um estágio indiferenciado ou quiescente, utilizamos de uma metodologia para isolar os *clusters* celulares, permitindo continuar os experimentos apenas com esta população e, deste modo, eliminando uma variável que poderia ocasionar interferências nos resultados. Para o isolamento destas estruturas, utilizamos um micromanipulador (MicroDissector PPMD, Eppendorf) e um microcapilar de 200 μm de diâmetro interno, acoplado a um aspirador eletrônico controlado, localizado no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). Com este equipamento foi possível introduzir o microcapilar nos cultivos, descolar e realizar suavemente a coleta dos *clusters*, para depois aspirá-los. Assim, previamente aos experimentos de extração de RNA e de imunofluorescência, os *clusters* diferenciados dos estágios 1 e 3 foram separados do restante do cultivo (que não formou *clusters*) (Figura 12B).

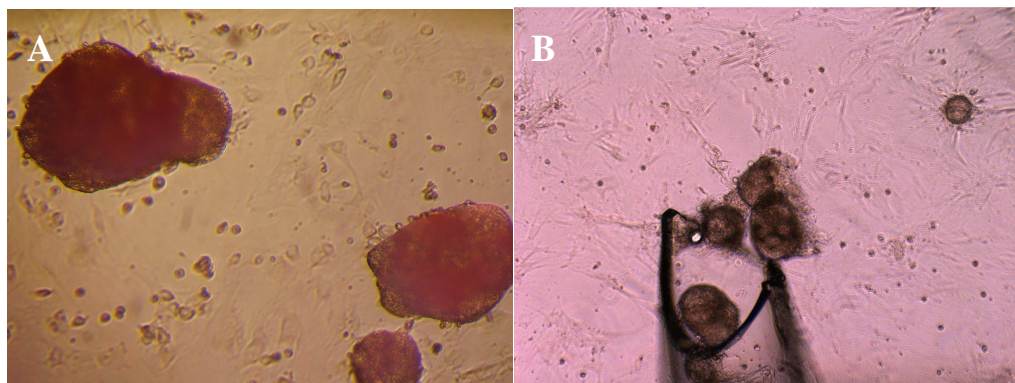


Fig. 12 - (A) Cultivo diferenciado de CTM de rato, de aspecto heterogêneo, 100X; (B) Aspiração mecânica dos *clusters* através do microcapilar, 40X

Os *clusters* coletados foram então lavados duas vezes com PBS, e imediatamente processados para os fins correspondentes (isolamento de RNA e imunofluorescência).

5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os *clusters* obtidos dos cultivos diferenciados, com auxílio do micromanipulador, foram desagregados por tripsinização e as células aderidas em lâminas de vidro através de *cytospin*. As células fixadas nas lâminas foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta para insulina, somatostatina, glucagon e PDX-1. Insulina, somatostatina e glucagon são os hormônios característicos de ilhotas e o PDX-1 é um fator de transcrição (nuclear) que é expresso durante a organogênese pancreática e nas células β e δ das ilhotas de Langerhans adultas, além de algumas células do duodeno.

A reação com os anticorpos primários foi evidenciada por meio do anticorpo secundário conjugado ao FITC (coloração em verde). O núcleo das células foi corado com DAPI. As Figuras 13 e 14 apresentam os resultados dos experimentos de imunofluorescência nas CTM diferenciadas.

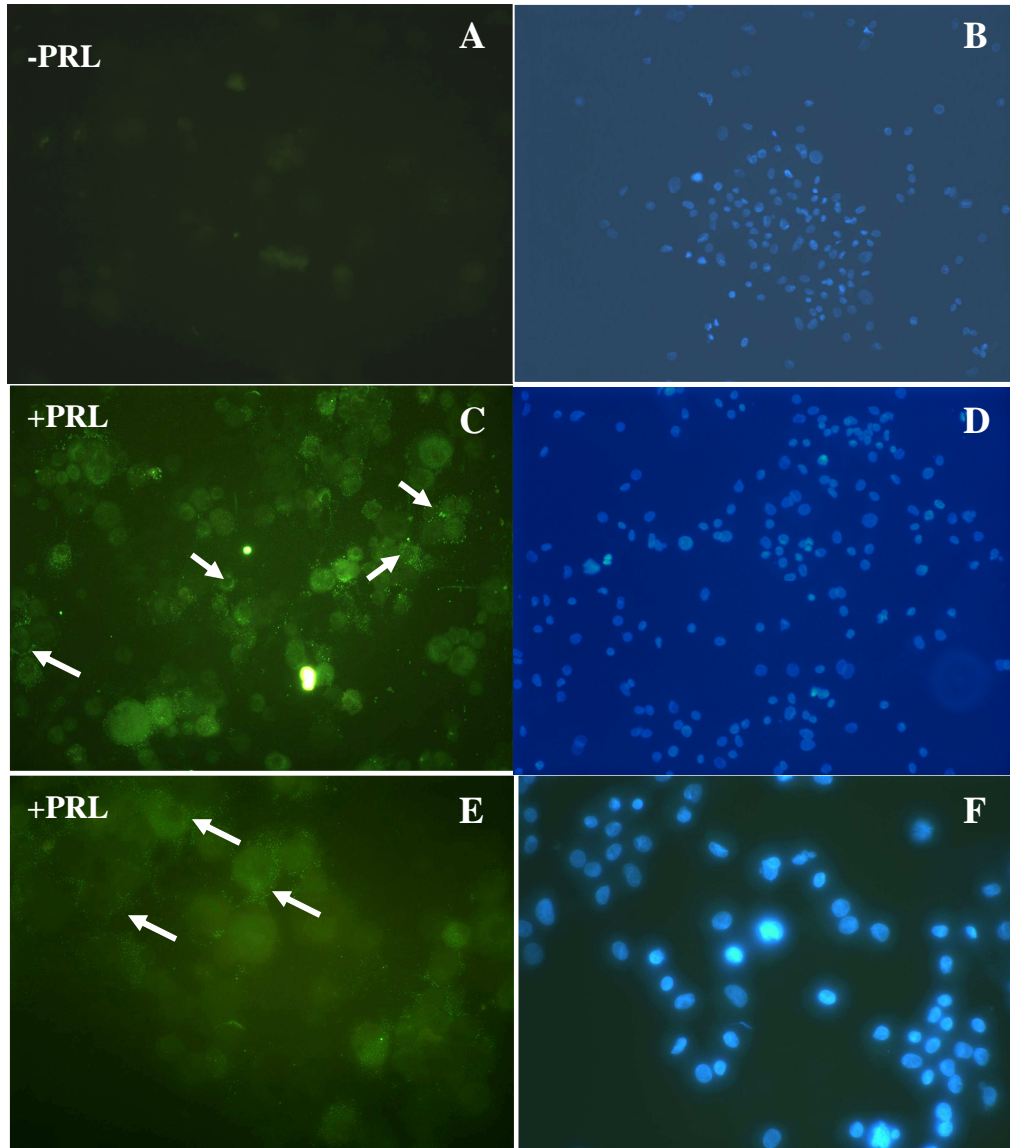


Fig. 13 - Imunofluorescência indireta com anticorpo anti-somatostatina e conjugado FITC, em CTM no estágio final da diferenciação (estágio E3). Cultivo diferenciado sem PRL, corado com FITC (A) e com DAPI (B), aumento 200X. Cultivo diferenciado com PRL, corado com FITC (C) e DAPI (D), aumento 200X. Cultivo diferenciado com PRL, corado com FITC (E) e com DAPI (F), 400X. As setas na figura indicam a presença de grânulos contendo somatostatina no citoplasma

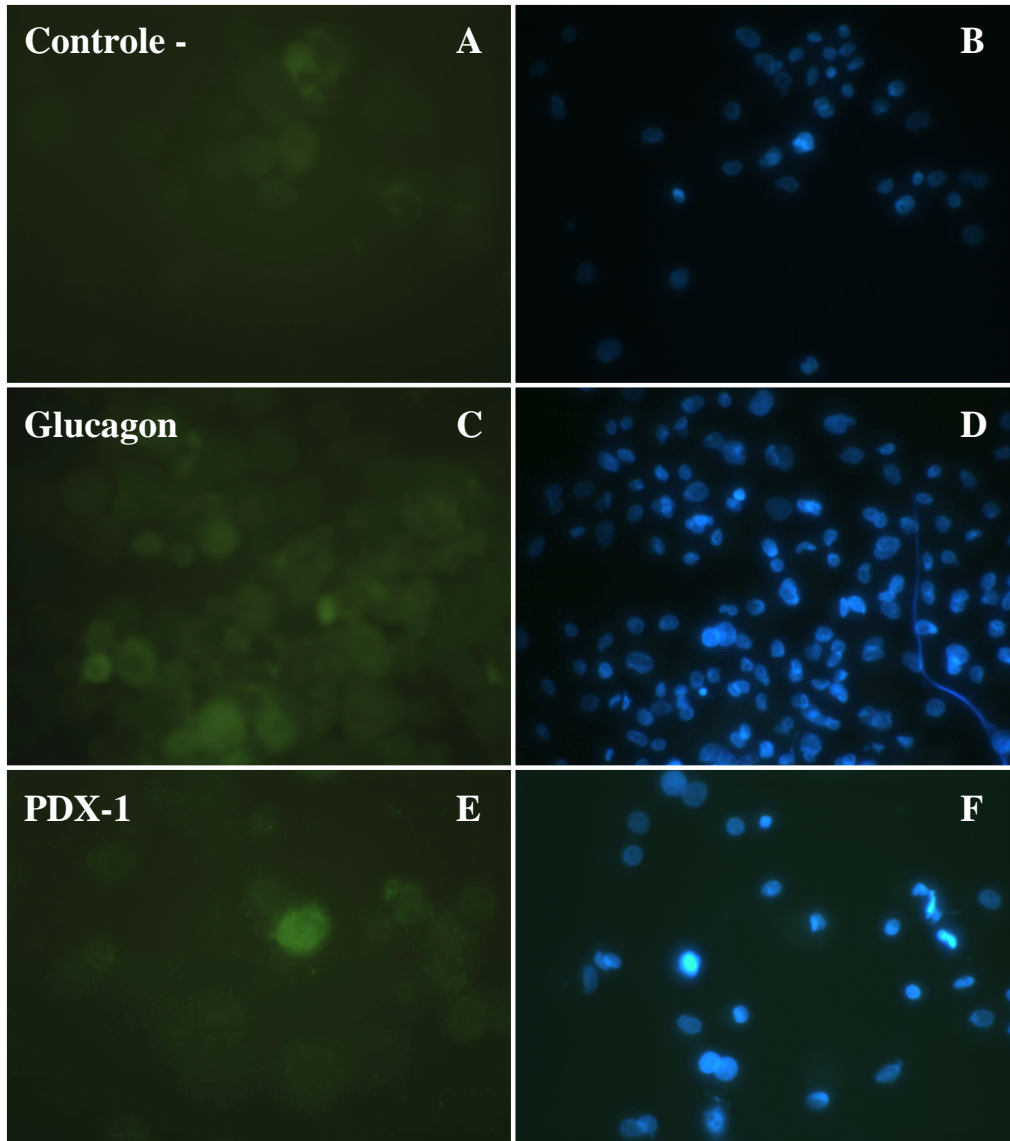


Fig. 14 - Imunofluorescência indireta para glucagon e PDX-1 em CTM no estágio final da diferenciação (estágio E3), tratadas com PRL. Controle negativo (incubação apenas com anticorpo secundário): em (A) FITC, em (B) DAPI. Células incubadas com anti-glucagon: em (C) FITC, em (D) DAPI. Células incubadas com anti-PDX-1: em (E) FITC, em (F) DAPI. Aumento 400X.

Na Figura 13 pode-se observar que as células sem PRL (13A) foram negativas para somatostatina, enquanto as células tratadas com PRL (13C e 13E) apresentavam diversos grânulos no citoplasma. Os resultados da Figura 14 mostram que ao final da diferenciação, as células tratadas com PRL foram negativas para glucagon (14C) e PDX-1 (14E). As células diferenciadas sem PRL também foram

negativas para estes hormônios (dados não apresentados). Insulina também não foi expressa nestas células (dados não apresentados). O controle negativo da reação (apresentado na Figura 14A), no qual foi omitido o anticorpo primário, mostrou que não houve reação inespecífica com o anticorpo secundário conjugado ao FITC.

5.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Completado o processo de diferenciação a CPI, os *clusters* foram isolados com micromanipulador e amostras de RNA total foram extraídas destas células. RNA também foi obtido das células nos estágios iniciais e intermediários do cultivo, antes da indução de diferenciação, para controle do experimento. As amostras de mRNA nos diferentes estágios (E0, E1 e E3) de três cultivos diferentes (R5, R6 e R8) foram utilizadas para realizar análise de expressão diferencial de genes característicos de ilhotas pancreáticas ou do seu desenvolvimento embrionário (Quadro 3), por técnica de PCR em Tempo Real. A expressão de GAPDH foi utilizada como controle interno e todos os experimentos foram realizados em triplicata. Como controles positivos, e também para realizar a curva de concentração, foram utilizados cDNA sintetizados das linhagens celulares RIN e INS (insulinomas de rato). Para análise dos dados de diferença de expressão gênica nas diversas amostras foi utilizado o programa SPSS v15.0. Foi aplicada uma análise de variância unidirecional e, a seguir, um teste de Tukey, obtendo-se para cada gene as diferenças de expressão entre as amostras analisadas e a significância estatística de cada diferença.

Não foi observada expressão de alguns genes característicos e específicos de ilhotas como insulina, glucagon e polipeptídeo pancreático (dados não apresentados). Como o controle positivo das células RIN e INS teve boa expressão tanto para insulina 1 (Ins 1), insulina 2 (Ins 2), glucagon (Gcg) e polipeptídeo pancreático (Ppy), foi descartada a possibilidade de que o problema estivesse nos *primers*. O gene da somatostatina (*Sst*) foi o único gene representativo de células δ de ilhotas pancreáticas, onde foi observada indução no processo de diferenciação (Gráfico 2). A expressão do gene *Sst* teve um aumento significativo após o tratamento com alta glicose (E1) e uma queda drástica nos estágios finais da diferenciação em dois dos três cultivos analisados. Entretanto, não foram

observadas diferenças significativas entre o estágio final com e sem PRL, como observado na imunofluorescência.

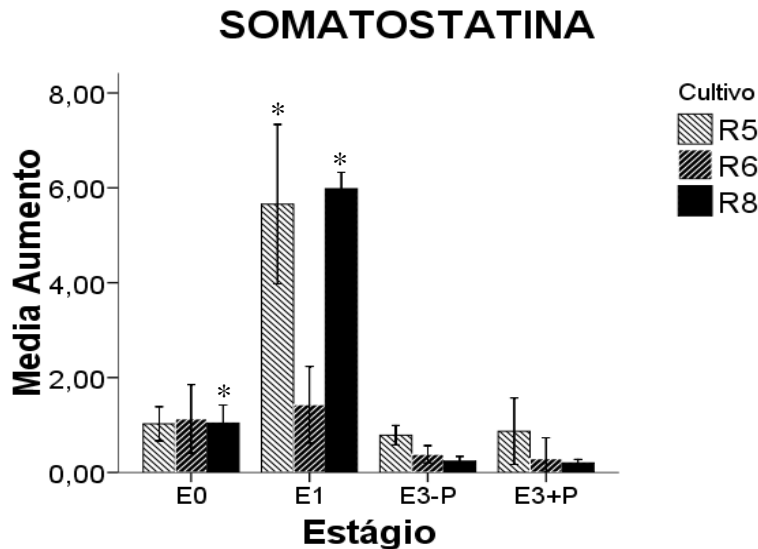


Gráfico 2 - Expressão do gene da somatostatina em três diferentes cultivos (R5, R6 e R8) de CTM diferenciadas. Em dois cultivos (R5 e R8) foram encontradas diferenças significativas entre os estágios. A máxima expressão foi observada no estágio E1 (* $p < 0.05$). A reação foi feita em triplicata.

Genes envolvidos no desenvolvimento embrionário do pâncreas, como Pax6, Nng3, Isl, NeuroD1, Nkx 2.2 e Nkx 6.1 tiveram algum grau de expressão e diferenças significativas entre os estágios (Gráfico 3). Não houve amplificação de PDX-1 nas amostras, porém isto possivelmente foi devido a problema com os *primers*, visto que o mesmo também ocorreu com as amostras dos controles positivos INS e RIN (dado não apresentado).

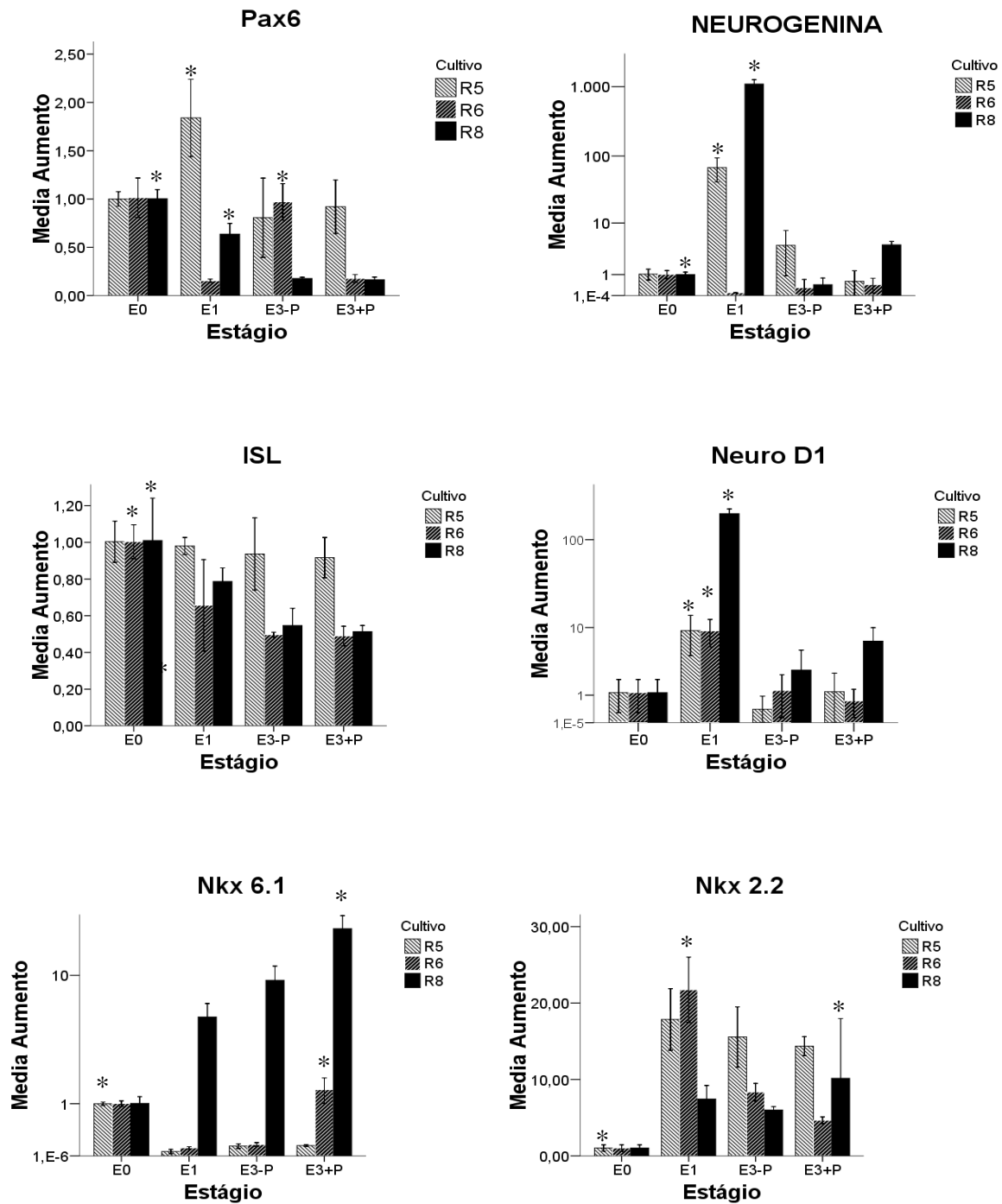


Gráfico 3 - Expressão de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário do pâncreas (*Pax6*, *Neurogenina 3*, *Isl1*, *NeuroD1*, *Nkx2.2* e *Nkx6.1*), em três diferentes cultivos (R5, R6 e R8) de CTM diferenciadas. A expressão relativa foi obtida utilizando-se os níveis do estágio E0 como 1. Cada barra corresponde a um experimento independente e seu valor é a media da triplicata. Foram encontradas diferenças significativas entre os estágios (* $p < 0.05$)

O receptor da PRL (R-PRL) em células de rato existe como duas isoformas, longa e curta, que só diferem no domínio citoplasmático, e são geradas pelo mesmo gene por *splicing* alternativo. Ambas isoformas têm diferentes graus de expressão dependendo do órgão ou tecido. No nosso sistema, só foi detectada a isoforma longa. O mRNA da isoforma curta do R-PRL não foi detectado na maioria dos estágios, com exceção de algumas amostras do E1 e no controle positivo (dado não apresentado). Alguns estudos têm mostrado que o hormônio PRL exerce certa regulação na expressão de seu próprio receptor(79). Também já se demonstrou que a expressão do R-PRL está presente em níveis basais em células do compartimento mesenquimal da medula óssea, e é induzida durante o processo de diferenciação adipogênica(76).

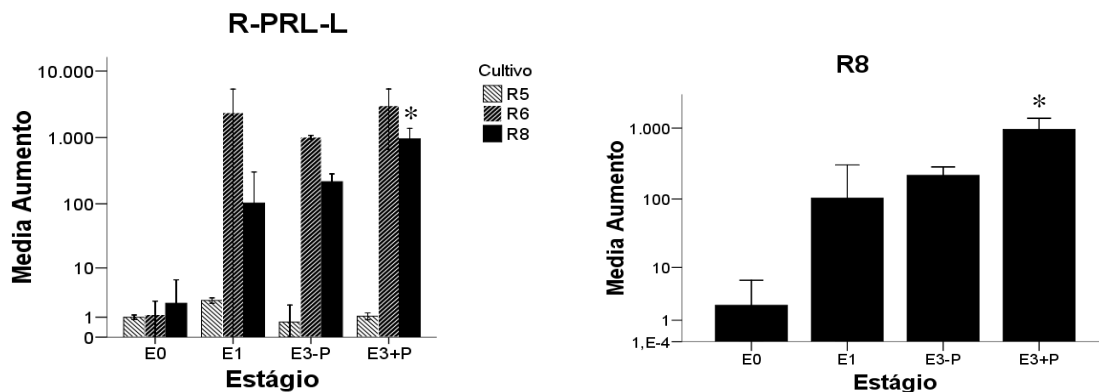


Gráfico 4 - Expressão da isoforma longa do R-PRL de rato, em CTM nos diferentes estágios da diferenciação. No cultivo R8 foram encontradas diferenças significativas entre os estágios E3-P e E3+P (* p<0.05)

No nosso sistema, a expressão da isoforma longa do R-PRL foi maior quando comparada com o estágio indiferenciado (E0). Em um dos três cultivos analisados (cultivo R8) a expressão do gene nas células tratadas com prolactina apresentou diferenças significativas com relação aos demais estágios (Gráfico 4).

6. DISCUSSÃO

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

Para tornar viável a sua aplicação clínica, qualquer terapia celular deve representar uma vantagem significativa em segurança e eficácia em relação ao tratamento convencional de administração de insulina. Trabalhos recentes têm mostrado a possibilidade de diferenciar células provenientes de diversas fontes em CPI. As propriedades das CT da medula óssea fazem destas candidatas ideais para a engenharia de tecidos, pelo fato de representarem uma fonte abundante de CT adultas, as quais podem ser expandidas e induzidas a se diferenciar em múltiplos tipos celulares. O potencial terapêutico das CT tem intensificado os esforços com o objetivo de desenvolver novos métodos para aumentar a massa das células β bem como para melhorar a regulação e secreção de insulina frente ao estímulo por glicose. Entretanto, ainda persistem limitações com estas células, em especial na diferenciação incompleta (maturação inadequada), nos baixos níveis de secreção de insulina e na falta de regulação da secreção. Em geral, a eficiência de diferenciação é relativamente baixa devido ao conhecimento incompleto dos processos, fatores e variáveis envolvidos na diferenciação de CT em CPI, os quais poderiam justificar os conflitos e diferentes resultados na área. Portanto, novas pesquisas são necessárias para a compreensão da seqüência de sinais e dos programas de expressão dos fatores de transcrição que são essenciais para o desenho de protocolos de diferenciação.

Nossos objetivos neste estudo foram isolar e expandir CTM de medula óssea de rato e, a seguir, avaliar o efeito do hormônio PRL na diferenciação destas células em CPI. Também avaliamos a indução da expressão de marcadores de diferenciação endócrina pancreática nestas células, durante o processo de diferenciação. 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 comprovamos a expressão nas células isoladas, dos antígenos CD29 e CD73, que são típicos de CTM, e a ausência de CD45, um marcador de CTH(80). Além disso, como os resultados foram claramente positivos nos ensaios funcionais de diferenciação em linhagens mesenquimais, concluímos que estas células tratavam-se realmente de CTM.

Após esta etapa de caracterização inicial, tentamos reproduzir um protocolo de diferenciação de CTM a CPI que fosse comumente usado, relativamente fácil e que estivesse a nosso alcance. Dentre as poucas alternativas existentes, escolhemos o protocolo descrito por Tang *et al* (2004)(62), que conseguiu diferenciar CTM de medula óssea de camundongo Balb/c em células que expressavam os genes *Ins 1*, *Ins 2*, *IAPP*, *GLUT-2*, glicocinase, *PDX-1*, *Pax6* e *nestina*. Também apresentavam razoável potencial de secreção de insulina em resposta ao estímulo de glicose, e que foram capazes de reverter a hiperglicemia de camundongos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ).

Assim, as CTM isoladas foram expandidas indiferenciadas e, a seguir, cultivadas por longos períodos em condições propícias à diferenciação em CPI, conforme o protocolo de Tang *et al* (2004)(62). Após períodos variáveis entre dois a quatro meses de tratamento em alta concentração de glicose, os cultivos tomavam a forma de *clusters* celulares e o meio era acrescido dos fatores finais de diferenciação, primeiro a nicotinamida e, a seguir, a exendina-4. Neste estágio também foi adicionada PRL em alguns cultivos, para analisar o efeito deste hormônio na diferenciação. Ao final do experimento, o processo de diferenciação das CTM para CPI foi analisado através de imunofluorescência indireta e PCR em Tempo Real. Estas análises foram realizadas em amostras de *clusters* isolados dos cultivos com auxílio de um micromanipulador, para tornar mais homogênea a população celular analisada.

A imunofluorescência mostrou em três cultivos diferentes a presença de grânulos contendo somatostatina no citoplasma das células tratadas com PRL, mas não nos controles. Os hormônios insulina e glucagon e o fator de transcrição *PDX-1* não foram observados nestas amostras, revelando uma diferenciação incompleta. Por PCR em Tempo Real, também não houve amplificação de *PDX-1* nas amostras, porém isto possivelmente foi devido a problema com os *primers*, visto que o mesmo

fato ocorreu com as amostras dos controles positivos INS e RIN. Entretanto, como a expressão de PDX-1 é necessária tanto para a embriogênese normal do pâncreas quanto para a expressão de insulina e somatostatina, é bastante provável que este gene tenha sido induzido em algum momento durante a diferenciação(16).

Na análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real, encontramos aumento da expressão de somatostatina após o tratamento com alta concentração de glicose (estágio E1), e uma diminuição nos estágios seguintes, em dois dos três cultivos analisados. Entretanto, não encontramos diferença na expressão deste gene com a adição ou não de PRL no estágio final da diferenciação (E3), como foi observado na análise por imunofluorescência. Uma hipótese para explicar este dado pode estar no fato de que a imunofluorescência tenha detectado nas células no estágio E3 a presença da proteína sintetizada e armazenada em grânulos, mas talvez naquele momento o gene já não estivesse mais sendo induzido e, por isso, o PCR em Tempo Real não mostrou diferença. Na análise por imunofluorescência não tínhamos amostras do estágio E1 para fazer uma comparação com o dado de PCR em Tempo Real. Por estes motivos, e pela indisponibilidade de ferramentas adequadas para obtenção de dados adicionais, não temos como chegar a uma conclusão definitiva para explicar o resultado encontrado.

Assim como na imunofluorescência, também não foi observada por PCR a expressão de alguns genes característicos e específicos de ilhotas como insulina, glucagon e polipeptídeo pancreático. Como o controle positivo das células RIN e INS teve boa expressão para insulina 1 (Ins 1), insulina 2 (Ins 2), glucagon (Gcg) e polipeptídeo pancreático (Ppy), foi descartada a possibilidade de que o problema estivesse nos *primers* utilizados na reação de PCR. Estes resultados reforçaram a hipótese de que a indução de diferenciação nestas células não foi completa. Alguns genes envolvidos no desenvolvimento embrionário do pâncreas e na diferenciação endócrina e de células β , como Pax6, Nng3, Isl1, NeuroD1, Nkx2.2 e Nkx6.1 tiveram algum grau de expressão e diferenças significativas entre os estágios (Gráfico 3). O tratamento das células com prolactina promoveu aumento de expressão do gene Nkx6.1 em dois (R8 e R6) de três cultivos testados (aumento de 2 vezes, $p < 0,01$; e de 8,6 vezes, $p < 0,00001$, respectivamente).

Outros genes de diferenciação, como o Hlxb9, não foram expressos no nosso sistema. Hlxb9 é um gene *homeobox* que codifica para um fator de transcrição envolvido tanto na embriogênese do pâncreas como no direcionamento final da

diferenciação endócrina(81, 82). A não expressão deste gene nas células dos nossos cultivos pode ser um dos fatores que contribuíram para uma diferenciação incompleta.

Em relação ao estudo de Tang *et al* (2004)(62), estes utilizaram RT-PCR para avaliar a expressão dos genes de diferenciação. A produção de hormônios nas CTM diferenciadas foi avaliada utilizando técnicas bastante sensíveis como microscopia de deconvolução e microscopia eletrônica com imunomarcção com partículas de ouro, revelando a presença de grânulos de insulina nestas células, embora em pequena quantidade.

Diferentes protocolos têm sido empregados para induzir CT a se diferenciar em CPI *in vitro*. Tratamento com meio contendo alta concentração de glicose é considerado um potente indutor para a diferenciação e expressão de genes típicos de células β (62, 83). No primeiro estágio de diferenciação (E1) de nosso experimento, a glicose em alta concentração não foi capaz de induzir por si só a diferenciação completa de CTM a CPI, mas promoveu a expressão de alguns genes que são essenciais para a organogênese do pâncreas como Ngn3, NeuroD1, Pax6, Nkx2.2 e Nkx6.1. A Nicotinamida tem sido usada para preservar a viabilidade e função das ilhotas pancreáticas em cultivo, possivelmente através da atividade da enzima *poly ADP-ribose polymerase* (PARP)(84), e também para induzir a diferenciação em ilhotas pancreáticas e a secreção de insulina(59, 62, 67). Exendina-4 é um agonista do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1), que estimula a proliferação, neogênese e sobrevivência das células β *in vivo*(64). PRL estimula a proliferação e a maturação de células β (68, 85), induz a transcrição do gene da insulina(86) e a secreção deste hormônio(87) e de vários outros genes ligados ao mecanismo de “sensor de glicose” da célula β , que é o principal responsável pela expressão do gene e secreção de insulina(88, 89).

Alguns estudos sugerem que as mudanças adaptativas que ocorrem nas células β das ilhotas pancreáticas durante a gravidez são influenciadas pela elevada atividade dos hormônios PRL e lactogênio placentário (LP) neste período. A PRL produz um incremento na massa de células β e na sua sensibilidade à glicose durante a gestação, sugerindo que sua utilização em protocolos para diferenciação de CTM poderia exercer um efeito benéfico na maturação e na produção de insulina por estas células(70, 85).

O reconhecido papel da PRL sobre as células β foi o principal motivo que gerou o interesse, neste trabalho, de avaliar o seu efeito na diferenciação de CTM em CPI. Aproximadamente 92-97% da população celular da medula óssea de camundongo expressa níveis basais do receptor da PRL(75), sugerindo que as CTM de medula poderiam ser suscetíveis à ação deste hormônio. Deste modo, optamos por utilizar no meio de cultivo em nosso modelo experimental uma combinação de glicose em alta concentração (25 mM), exendina-4, nicotinamida e PRL.

Conforme descrito anteriormente, a PRL estimulou a produção de somatostatina pelas CTM nos estágios finais. Assim, numa análise ainda preliminar do efeito da PRL sobre a diferenciação das CTM de medula óssea de rato, aparentemente o efeito foi apenas parcial, pois as células não produziram insulina nem glucagon. Alguns cultivos tratados com PRL também mostraram expressão de genes relacionados com o desenvolvimento pancreático, como Pax6, Ngn3, NeuroD1, Nkx2.2, Nkx6.1 e Isl1, embora sem causar diferença em relação ao controle. Assim, possivelmente houve um efeito intermediário, com a indução da expressão de alguns genes relacionados ao processo de diferenciação, levantando a possibilidade de que estas células possam ser encaminhadas a um estágio final de diferenciação. O aumento da expressão da isoforma longa do R-PRL nas CTM tratadas com PRL em relação ao estágio indiferenciado e ao seu controle sugere uma indução do receptor pelo próprio hormônio, conforme proposto no estudo de Amit *et al* (1985)(79). Este dado também indica que a PRL utilizada no experimento aparentemente era funcional.

No nosso estudo, não detectamos a presença de PDX-1, por imunofluorescência indireta nas CTM tratadas. Quanto à análise por PCR em Tempo Real, o experimento não pôde ser validado, pois nos controles também não houve expressão. Por este motivo, a avaliação de PDX-1 neste estudo foi incompleta, sendo necessária uma confirmação destes dados. O desenvolvimento do pâncreas endócrino está sob o fino controle de vários fatores de transcrição(14). Dentre estes fatores, PDX-1 tem um papel crucial na formação do pâncreas, na diferenciação e na manutenção da função de células β maduras. A presença do fator de transcrição PDX-1 determina a organogênese do pâncreas endócrino e exócrino. Nas ilhotas de Langerhans adultas, a expressão de PDX-1 é restrita às células β , δ e algumas células do duodeno. PDX-1 regula a maioria dos genes responsáveis pela identidade e funcionalidade das ilhotas pancreáticas como a insulina, GLUT 2, polipeptídeo

pancreático e somatostatina(16). A sua ausência, como demonstrado em camundongos *knock-out* para PDX-1, leva à completa ausência do pâncreas (Jonsson et al., 1994). Portanto, a expressão de PDX-1 em células precursoras é essencial para o sucesso da diferenciação.

7. 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;
- As CTM, na presença de fatores de diferenciação para células β , formaram cultivos heterogêneos com a presença de estruturas esféricas de aspecto similar a ilhotas pancreáticas;
- A análise por PCR em Tempo Real das CTM diferenciadas mostrou a indução, em diferentes estágios do cultivo, de genes como Ngn3, NeuroD1, Pax6, Nkx2.2 e Nkx6.1, que são essenciais no desenvolvimento e maturação das células do pâncreas endócrino;
- A adição de PRL ao protocolo de diferenciação das CTM induziu a expressão de somatostatina e do receptor de PRL nas células analisadas por imunofluorescência e PCR em Tempo Real. Porém, como insulina e glucagon não foram expressos, não foi possível determinar um efeito significativo deste hormônio na diferenciação das CTM em células produtoras de insulina;
- Os resultados obtidos sugerem que o protocolo utilizado foi capaz de promover uma diferenciação apenas parcial, visto que insulina não foi expressa. Por outro lado, a indução de somatostatina e de vários genes relacionados à organogênese pancreática sugerem que as CTM de medula óssea têm potencial de sofrer diferenciação para um fenótipo endócrino.

8. REFERÊNCIAS

1. Pittman IV I, Philipson LH, Steiner DF. Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships. Journal [serial on the Internet]. 2004 (Chapter 3): Available from: http://www.endotext.org/Diabetes/diabetes3_new/diabetes3.htm.
2. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva: World Health Organization, 1999.
3. World Health Organization. Fact Sheet N^o 138; 2002.
4. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2000;23 Suppl 1:S4-19.
5. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet. 2001;358(9277):221-9.
6. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. BMJ. 2004;328(7442):750-4.
7. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001;414(6865):813-20.
8. Ritz E, Schomig M. The diabetic patient with renal failure. Nefrologia. 2000;20 Suppl 3:16-24.
9. Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. Clin Transplant. 2005;19(4):433-55.
10. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med. 2000;343(4):230-8.
11. Robertson RP. Pancreatic islet transplantation for diabetes: successes, limitations, and challenges for the future. Mol Genet Metab. 2001;74(1-2):200-5.

12. Eliaschewitz FG, Aita CA, Genzini T, Noronha IL, Lojudice FH, Labriola L, et al. First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc.* 2004;36(4):1117-8.
13. Bonner-Weir S, Weir GC. New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol.* 2005;23(7):857-61.
14. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology.* 2005;146(3):1025-34.
15. Kim SK, MacDonald RJ. Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(5):540-7.
16. McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia.* 2001;44(10):1203-14.
17. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature.* 1994;371(6498):606-9.
18. Watada H. Neurogenin 3 is a key transcription factor for differentiation of the endocrine pancreas. *Endocr J.* 2004;51(3):255-64.
19. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(4):1607-11.
20. Babu DA, Chakrabarti SK, Garmey JC, Mirmira RG. Pdx1 and BETA2/NeuroD1 participate in a transcriptional complex that mediates short-range DNA looping at the insulin gene. *J Biol Chem.* 2008;283(13):8164-72.
21. Chu K, Nemoz-Gaillard E, Tsai MJ. BETA2 and pancreatic islet development. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:23-46.
22. Mansouri A, St-Onge L, Gruss P. Role of *Pax* Genes in Endoderm-derived Organs. *Trends Endocrinol Metab.* 1999;10(4):164-7.
23. Muller YL, Yueh YG, Yaworsky PJ, Salbaum JM, Kappen C. Caudal dysgenesis in Islet-1 transgenic mice. *FASEB J.* 2003;17(10):1349-51.
24. Sussel L, Kalamaras J, Hartigan-O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL, et al. Mice lacking the homeodomain transcription factor

- Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development*. 1998 Jun;125(12):2213-21.
25. Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):2924-9.
 26. Henseleit KD, Nelson SB, Kuhlbrodt K, Hennings JC, Ericson J, Sander M. NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas. *Development*. 2005;132(13):3139-49.
 27. Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thiery JP, Czernichow P, Bellusci S, et al. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development*. 2001;128(24):5109-17.
 28. Attali M, Stetsyuk V, Basmaciogullari A, Aiello V, Zanta-Boussif MA, Duvillie B, et al. Control of beta-cell differentiation by the pancreatic mesenchyme. *Diabetes*. 2007;56(5):1248-58.
 29. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med*. 2003;9(6):661-8.
 30. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg*. 2004;139(1):93-9.
 31. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;95(5):209-14.
 32. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):7999-8004.
 33. Peck AB, Cornelius JG, Schatz D, Ramiya VK. Generation of islets of Langerhans from adult pancreatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002;9(6):704-9.
 34. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med*. 2000;6(3):278-82.

35. Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, et al. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem.* 2003;278(34):31950-7.
36. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med.* 2000;6(5):568-72.
37. Horb ME, Shen CN, Tosh D, Slack JM. Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr Biol.* 2003;13(2):105-15.
38. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5034-9.
39. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):998-1003.
40. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(25):16105-10.
41. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001;292(5520):1389-94.
42. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes.* 2000;49(2):157-62.
43. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(10):589-95.
44. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999;181(1):67-73.

45. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-9.
46. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Aug;33(8):881-7.
47. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(6):507-20.
48. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001;153(5):1133-40.
49. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(2):135-42.
50. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1928-42.
51. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 1993;82(1):66-76.
52. 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.
53. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med*. 2007;140:67-81.
54. Harting M, Jimenez F, Pati S, Baumgartner J, Cox C, Jr. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2008;10(3):243-53.
55. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol*. 2003;31(8):723-32.

56. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004;8(3):301-16.
57. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest.* 2004;114(6):795-804.
58. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol.* 2004;32(12):1212-25.
59. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol.* 2004;10(20):3016-20.
60. Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(4):1299-305.
61. Shakhov VP, Popov SV, Kokarev OV, Afanas'ev SA. In vitro formation of mesenchymal bone marrow islets. *Bull Exp Biol Med.* 2004;137(6):625-7.
62. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes.* 2004;53(7):1721-32.
63. Nielsen JH, Galsgaard ED, Moldrup A, Friedrichsen BN, Billestrup N, Hansen JA, et al. Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes.* 2001;50 Suppl 1:S25-9.
64. Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol.* 2003;17(2):161-71.
65. Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology.* 2002;143(8):3152-61.
66. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets

- differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 2001;50(3):521-33.
67. Otonkoski T, Beattie GM, Mally MI, Ricordi C, Hayek A. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *J Clin Invest*. 1993;92(3):1459-66.
 68. Boschero AC, Crepaldi SC, Carneiro EM, Delattre E, Atwater I. Prolactin induces maturation of glucose sensing mechanisms in cultured neonatal rat islets. *Endocrinology*. 1993;133(2):515-20.
 69. Moldrup A, Petersen ED, Nielsen JH. Effects of sex and pregnancy hormones on growth hormone and prolactin receptor gene expression in insulin-producing cells. *Endocrinology*. 1993;133(3):1165-72.
 70. Sorenson RL, Brelje TC, Roth C. Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology*. 1993;133(5):2227-34.
 71. Amaral ME, Cunha DA, Anhe GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, et al. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol*. 2004;183(3):469-76.
 72. Shao J, Qiao L, Friedman JE. Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286(2):E304-10.
 73. Crepaldi-Alves SC, Carneiro EM, Bosqueiro JR, Boschero AC. Synergistic effect of glucose and prolactin on GLUT2 expression in cultured neonatal rat islets. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(3):359-61.
 74. Davalli AM, Scaglia L, Brevi M, Sanvito F, Freschi M, Cavallaro U, et al. Pituitary cotransplantation significantly improves the performance, insulin content, and vascularization of renal subcapsular islet grafts. *Diabetes*. 1999;48(1):59-65.
 75. Gagnerault MC, Touraine P, Savino W, Kelly PA, Dardenne M. Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J Immunol*. 1993;150(12):5673-81.

76. McAveney KM, Gimble JM, Yu-Lee L. Prolactin receptor expression during adipocyte differentiation of bone marrow stroma. *Endocrinology*. 1996;137(12):5723-6.
77. Brelje TC, Stout LE, Bhagroo NV, Sorenson RL. Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans. *Endocrinology*. 2004;145(9):4162-75.
78. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
79. Amit T, Barkey RJ, Gavish M, Youdim MB. Induction of prolactin receptors by prolactin in the rat lung and liver: demonstration of separate receptor and antibody entities. *Mol Cell Endocrinol*. 1985;39(1):21-9.
80. 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.
81. Harrison KA, Thaler J, Pfaff SL, Gu H, Kehrl JH. Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in Hlxb9-deficient mice. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):71-5.
82. Li H, Arber S, Jessell TM, Edlund H. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlxb9. *Nat Genet*. 1999;23(1):67-70.
83. Zalzman M, Gupta S, Giri RK, Berkovich I, Sappal BS, Karnieli O, et al. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7253-8.
84. Kolb H, Burkart V. Nicotinamide in type 1 diabetes. Mechanism of action revisited. *Diabetes Care*. 1999;22 Suppl 2:B16-20.
85. Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, et al. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*. 1993;132(2):879-87.

86. Fleenor DE, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene transcription: roles of glucose and signal transducer and activator of transcription 5. *Endocrinology*. 2001;142(7):2805-10.
87. Sorenson RL, Brelje TC, Hegre OD, Marshall S, Anaya P, Sheridan JD. Prolactin (in vitro) decreases the glucose stimulation threshold, enhances insulin secretion, and increases dye coupling among islet B cells. *Endocrinology*. 1987;121(4):1447-53.
88. Petryk A, Fleenor D, Driscoll P, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene expression: the roles of glucose and glucose transporter-2. *J Endocrinol*. 2000;164(3):277-86.
89. Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol*. 2007;193(3):367-81.