

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

THATIANA MARA DOS SANTOS

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

**CURITIBA
2009**

THATIANA MARA DOS SANTOS

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

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Rueda Faucz

**CURITIBA
2009**

Dedico esta dissertação a toda minha família, composta por meus verdadeiros mestres, modelos reais de perseverança, parceria, dedicação, paciência e ética. Em especial ao meu noivo e companheiro Érico Augusto Teodósio pelo amor, paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. Obrigada por acreditarem na ciência brasileira.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mayora Aita, minha eterna gratidão por aceitar a difícil tarefa de orientar e contribuir decisivamente com a qualidade desse trabalho. Pela paciente leitura tantas vezes realizada, pelas discussões, sugestões e indicações de caminhos.

Ao Prof. Dr. Fábio Rueda Faucz, bem como a Empresa Cryogene® - Criogenia Biológica Ltda., agradeço a oportunidade de ingresso no Programa de Pós-Graduação, sua ajuda foi fundamental na minha formação.

Ao Prof. Dr. Miguel Carlos Riella, pelo incentivo e apoio à formação de um grupo de pesquisadores na PUCPR, na área de transplante celular e diabetes.

Ao Prof. Dr. Fernando Henrique Lojudice da Silva, da USP pela paciência em ensinar as técnicas de isolamento de células-tronco.

À Prof^a. Dra. Andréa Novais Moreno, minha gratidão pela forma atenciosa em orientar o estudo de imunofluorescência.

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

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

Às queridas amigas de laboratório Patrícia, Carla, Aline, Ana Luiza, Irenice, Elaine, Andréa, Karina e Kharol, agradeço sinceramente a contribuição imprescindível na realização dos experimentos e é claro nas festinhas de aniversários.

A realização deste trabalho em muito se deve à colaboração e apoio de muitos outros colegas, os quais transmito os mais sinceros agradecimentos.

APOIO FINANCEIRO

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CRIOGENE – Criogenia Biológica

*“Antes de sentirnos que somos bons mestres,
estejamos seguros de que somos bons estudantes”.*

PITÁGORAS

RESUMO

Introdução: A busca de uma fonte renovável e de fácil obtenção de células com capacidade de produção e secreção de insulina de modo regulado, para reposição das células β perdidas no Diabetes Mellito tipo 1 (DM1), é um tema de enorme interesse e uma alternativa promissora para o tratamento desta doença. Para tanto, as células-tronco mesenquimais (CTM) da veia do cordão umbilical humano surgem como uma fonte capaz de diferenciar-se em alguns tipos de tecidos e apresentam uma vantagem em relação às células-tronco embrionárias ou adultas da medula óssea, devido a sua facilidade de obtenção, podendo ser coletada no momento do nascimento sem oferecer nenhum risco para a mãe ou bebê. **Objetivo:** Cultivar, expandir e diferenciar CTM da parede da veia do cordão umbilical humano em células endócrinas pancreáticas. **Métodos:** As CTM foram obtidas da parede da veia do cordão umbilical humano por digestão com solução de colagenase, caracterizadas por citoquímica e citometria de fluxo, e expandidas *in vitro*. A diferenciação das CTM foi realizada em meio contendo baixa concentração de glicose (5,5 mM), nicotinamida, exendina-4 e β -mercaptoetanol durante um período de até 4 meses. A expressão dos hormônios insulina, somatostatina e glucagon, e do fator de transcrição PDX-1 foi avaliada por imunofluorescência indireta. **Resultados:** As células isoladas do cordão e mantidas em cultivo aderente foram positivas para os marcadores CD105, CD166, CD29, CD90 e CD73, negativas para CD31, CD45, CD34 e CD14, diferenciaram-se em adipócitos e osteócitos, demonstrando se tratar de CTM. Por imunofluorescência indireta detectou-se a expressão de somatostatina, glucagon e PDX-1 nas CTM diferenciadas, porém não se observou a expressão de insulina. **Conclusão:** O processo de diferenciação empregado foi capaz de induzir a expressão de alguns marcadores endócrinos pelas CTM. Entretanto, as CTM não expressaram insulina, provavelmente devido a uma diferenciação incompleta, demonstrando que o protocolo empregado ainda precisa ser aprimorado.

Descritores: Diabetes Mellitus Tipo 1, Insulina, Células-Tronco Mesenquimais, Cordão Umbilical.

ABSTRACT

Introduction: The search for a renewable source of cells with insulin-producing capacity to replace β cells destroyed by the autoimmune process in Type 1 Diabetes Mellitus, is a very interesting subject and a promising therapeutic alternative for this disease. Mesenchymal stem cells (MSC) from human umbilical cord vein have a great potential for use in cell therapy due to its ease of isolation, expansion and differentiation, besides relative acceptance of the ethical point of view. They also have an advantage in relation to the embryonic or to the adult bone marrow MSC, because the umbilical cords are collected in the moment of the birth, without offering any risk to both mother and child. **Objective:** Isolate and promote *in vitro* expansion and differentiation of MSC from human umbilical cord vein into a pancreatic endocrine phenotype. **Methods:** MSC were obtained from human umbilical cord vein through collagenase digestion, characterized by cytochemistry and FACS, and *in vitro* expanded. MSC differentiation into a pancreatic endocrine phenotype was induced with low glucose (5,5 mM) media containing nicotinamide, exendin-4 and 2-mercaptoethanol, during a period of 4 months culture. Insulin, somatostatin, glucagon and PDX-1 expression was analyzed by immunofluorescence. **Results:** Human umbilical cord vein MSC were isolated and maintained in adherent cultures *in vitro*. As demonstrated by FACS, they were CD105, CD166, CD29, CD90 and CD73 positive and CD31, CD45, CD34 and CD14 negative. These cells were also able to differentiate into adipocyte and osteocyte lineages, confirming their MSC origin. Somatostatin, glucagon and PDX-1 expression by differentiated cells were demonstrated by immunofluorescence, although insulin was not expressed. **Conclusion:** The MSC differentiation protocol employed in this work induced expression of some endocrine markers. Insulin was not produced by these cells probably due to an incomplete differentiation induction, showing that the used protocol still needs to improved.

Key words: Diabetes Mellitus Type 1, Insulin, Mesenchymal Stem Cells, Umbilical cord

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | I |
| LISTA DE FIGURAS | III |
| 1 INTRODUÇÃO | 01 |
| 2 OBJETIVOS | 05 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 06 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 06 |
| 3 LITERATURA | 07 |
| 3.1 DIABETES MELITO | 08 |
| 3.2 DIABETES MELITO TIPO 1 | 08 |
| 3.3 TRATAMENTO DO DM1 | 09 |
| 3.4 TERAPIA CELULAR NO DM1 | 10 |
| 3.5 CÉLULAS-TRONCO | 11 |
| 3.5.1 Células-tronco mesenquimais | 12 |
| 3.5.2 Células-tronco da parede da veia do cordão umbilical humano | 14 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 4.1 COLETA DOS CORDÕES UMBILICAIS E CULTIVO CELULAR | 16 |
| 4.2 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO | 17 |
| 4.3 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO EM LINHAGENS MESENQUIMAIS | 18 |
| 4.4 DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA DAS CTM | 19 |
| 4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA | 20 |
| 5 RESULTADOS | 21 |
| 5.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO | 22 |
| 5.2 DIFERENCIAÇÃO DAS CTM DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO | 25 |
| 5.3 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO | 27 |
| 5.4 DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA PANCREÁTICA DAS CTM | 30 |
| 5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA | 33 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6 | DISCUSSÃO..... | 37 |
| 7 | CONCLUSÃO | 45 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 47 |
| 9 | ANEXOS | 55 |
| 9.1 | PARECER DO CEP – PUC-PR..... | 56 |
| 9.2 | TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE CORDÃO UMBILICAL..... | 59 |
| 9.3 | ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA TRANSPLANTATION PROCEEDINGS..... | 61 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA – Bovine serum albumin
- CPI – Células produtoras de insulina
- CT – Células-tronco
- CTA – Células-tronco adultas
- CTE – Células-tronco embrionárias
- CTH – Célula-tronco hematopoiética
- CTM – Célula-tronco mesenquimal
- DAPI – 4', 6- diamino - 2 fenilindol
- DM – Diabetes Melito
- DM1 – Diabetes Melito tipo 1
- DM2 – Diabetes Melito tipo 2
- DMEM – Dulbecco´s Modified Eagle Medium
- EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid, ou ácido etilenodiamino tetra-acético
- FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting
- FITC – Fluorescein Isothiocyanate
- GLP1 - Glucagon-like peptide-1
- H-DMEM – High glucose - Dulbecco´s Modified Eagle Medium
- HE – Hematoxilina e Eosina
- HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cell
- IDF - International Diabetes Federation
- L-DMEM – Low glucose - Dulbecco´s Modified Eagle Medium
- PARP - Poly ADP-ribose polymerase
- PBS – Phosphate buffered saline
- PDX-1 – Pancreatic and duodenal homeobox gene 1
- PFA – Paraformaldeído
- RT-PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction
- SFB – Soro Fetal Bovino
- TA – Temperatura Ambiente
- TR – Texas red
- xg – Força centrífuga relativa

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Potencial de diferenciação das CTM | 13 |
| Figura 2 | Ilustração das etapas do isolamento das CTM da parede da veia do cordão umbilical humano | 17 |
| Figura 3 | Técnica de isolamento de CTM da parede da veia do cordão umbilical humano | 23 |
| Figura 4 | Estágios de cultivo de CTM da veia do cordão umbilical | 25 |
| Figura 5 | Diferenciação das CTM da veia do cordão umbilical | 27 |
| Figura 6 | Imunofenotipagem de CTM da veia do cordão umbilical humano | 30 |
| Figura 7 | Diferentes estágios da diferenciação de CTM em células produtoras de insulina | 33 |
| Figura 8 | Imunofluorescência indireta para somatostatina em CTM diferenciadas do cordão umbilical | 36 |
| Figura 9 | Imunofluorescência indireta para glucagon em CTM diferenciadas do cordão umbilical | 36 |
| Figura 10 | Imunofluorescência indireta para PDX-1 em CTM diferenciadas do cordão umbilical | 37 |
| Figura 11 | Imunofluorescência indireta para insulina em CTM diferenciadas do cordão umbilical | 37 |

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, no mundo há cerca de 180 milhões de pessoas portadoras de Diabetes Melito (DM). No Brasil, segundo estimativas de 1996, o DM atingia aproximadamente 5,5 milhões de pessoas. A enfermidade apresenta incidência crescente e é responsável por 15% dos investimentos nacionais em saúde. Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), o DM tipo 1 (DM1) cresce cerca de 3% ao ano em crianças na fase pré-escolar. Já o DM tipo 2 (DM2) tem uma prevalência 10 vezes maior e está em constante crescimento a taxas alarmantes em crianças e adolescentes, como consequência da epidemia mundial de sedentarismo, da obesidade e de maus hábitos de consumo alimentar.

Embora o DM1 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. Atualmente, a sobrevivência dos pacientes tem aumentado significativamente o que favorece o surgimento das complicações crônicas, com custos econômicos e sociais elevados.

No DM1, a destruição das células β desencadeia uma redução absoluta da massa destas células. O DM1 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 DM1 (com injeções múltiplas ou bombas 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, podem-se 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 em 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, contemplam-se distintas possibilidades de obtenção de CPI, entre as quais estão ilhotas humanas de doador cadáver, expansão *in vitro* das ilhotas, CPI geradas por bioengenharia e as células-tronco (CT), que podem ser embrionárias (CTE) ou adultas (CTA), pancreáticas ou extra-pancreáticas. 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 com 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 DM1 e muito antes do aparecimento das complicações crônicas.

Além 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. Para que essas fontes se estabeleçam como técnica, há um duplo desafio, a

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

A diferenciação celular para obter CPI a partir de CT como substituto biológico para restaurar a massa de células β perdida no DM1 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 com capacidade de auto-replicação e de gerar células diferenciadas; a caracterização dos sinais proliferativos que permitam expandir estes progenitores; e a identificação dos sinais que induzam a diferenciação destas células pluripotenciais em células funcionais que secretem insulina de maneira regulada em resposta às variações da glicemia.

2. OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Isolar células-tronco mesenquimais (CTM) da parede da veia do cordão umbilical humano e induzir sua diferenciação para um fenótipo endócrino pancreático.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar CTM da parede da veia do cordão umbilical humano;
- Cultivar e expandir as CTM;
- Caracterizar as CTM através de imunofenotipagem por citometria de fluxo e pela sua capacidade funcional de diferenciação em adipócito e osteócito;
- Induzir *in vitro* a diferenciação endócrina das CTM;
- Analisar por imunofluorescência indireta a expressão de marcadores de diferenciação endócrina pelas CTM.

3. LITERATURA

3.1 - DIABETES MELITO

O DM é uma síndrome 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 (1).

O DM pode ser dividido em quatro grupos segundo o “*The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*”: a) Diabetes Melito tipo 1 (DM1); b) Diabetes Melito tipo 2 (DM2); c) Outros tipos específicos de Diabetes, incluindo Diabetes secundário ou associado a outras patologias e; d) DM gestacional (2).

3.2 - DIABETE MELITO TIPO 1

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

Apesar de a etiologia ser pouco conhecida, vários estudos mostraram 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 (3, 4).

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.

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

3.3 - 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 complicações crônicas graves como a nefropatia, retinopatia e neuropatia, entre outras (5, 6). 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 (7).

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 (7).

3.4 - TERAPIA CELULAR NO DM1

Como uma alternativa para o tratamento de casos selecionados de DM1, o transplante de ilhotas isoladas de doadores cadavéricos foi empregado, graças aos resultados do estudo de Shapiro *et al* (2000) (8). 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 (9).

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 (9).

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*. Várias tentativas estão sendo feitas neste sentido. Dentre estas, se podem 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 (10). Esta expansão *ex vivo* consiste em que as células β de cultivos de ilhotas pancreáticas podem proliferar até atingir uma massa adequada para o transplante. Outra alternativa consiste na diferenciação celular a partir de diferentes progenitores, como células-tronco embrionárias (CTE) e CT adultas pancreáticas e não-pancreáticas. Na diferenciação de CT adultas, o seu potencial é mais limitado que o das CTE, 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.

3.5 - CÉLULAS-TRONCO

As CT são células indiferenciadas, com capacidade única de auto-renovação e quando estimuladas dão 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) (11).

O zigoto fertilizado constitui a primeira célula-tronco totipotente, ou seja, uma célula com capacidade de formar qualquer célula existente no ser completamente formado e desenvolvido. Essa célula-tronco inicial se divide em duas, que se dividem em quatro, que se dividem em oito e assim sucessivamente até formar um conjunto de células que constitui o blastocisto. As células da camada interna dos blastocistos são as células-tronco embrionárias pluripotentes.

Uma célula-tronco pluripotente, tem a capacidade de desenvolver-se em qualquer tipo celular necessário ao desenvolvimento do feto, mas não pode desenvolver células próprias da gravidez, como a placenta, por exemplo (11).

As CTA 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 (12). 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 (12, 13).

Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de gerar CPI a partir de precursores de várias fontes incluindo pâncreas (14, 15), fígado (16, 17), epitélio intestinal (18), como também de CTE murinas e de origem humana (19, 20). 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.

3.5.1 - Células-tronco mesenquimais

As principais fontes de CTA são a medula óssea, o sangue periférico, o sangue do cordão umbilical e órgãos e tecidos de indivíduos adultos. Na medula óssea, residem ao menos dois tipos de CT. Dentre elas, a chamada célula-tronco hematopoiética (CTH), responsável pela geração de todos os tipos celulares de tecidos hematopoiéticos (21). No estroma, existe um conjunto de células não hematopoiéticas referidas como células progenitoras mesenquimais ou CTM. A Figura 1 mostra a capacidade de diferenciação das 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 (22, 23).

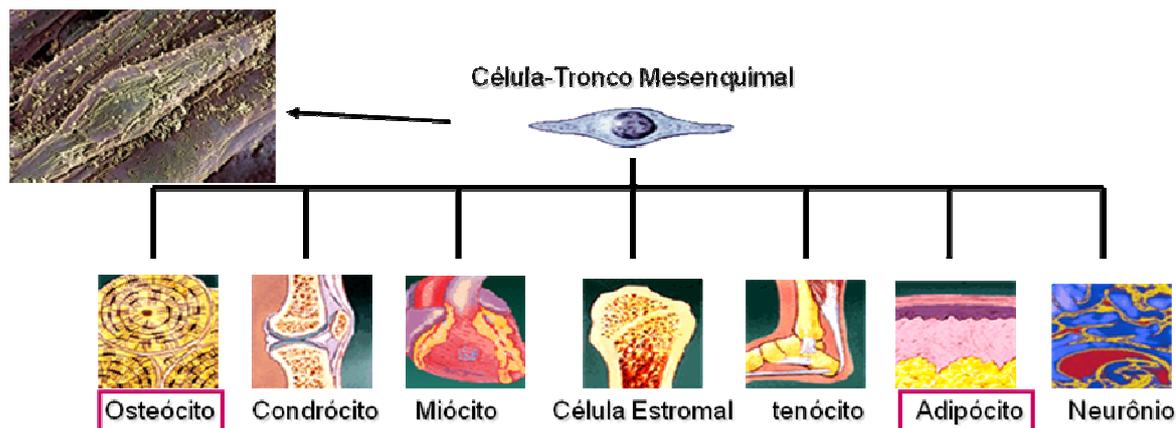


Figura 1: Potencial de diferenciação das CTM

As CTM com características biológicas similares àquelas derivadas da medula óssea têm sido isoladas de vários outros órgãos e tecidos como sangue periférico (24), sangue de cordão umbilical (25, 26), endotélio e subendotélio da veia do cordão umbilical (27-29) e membranas sinoviais (30), o que sugere a existência de uma extensa rede de CTM no organismo, que é abastecida quando necessário.

Nos cultivos de CTM adultas observamos uma população homogênea de células similares a fibroblastos, que formam colônias, duplicam-se em um período em torno de 33 horas e exibem um grande potencial de expansão que varia com as condições de cultivo (22). O fenótipo antigênico das CTM não é único, compartilhando características de células mesenquimais, endoteliais, epiteliais e musculares (22, 31, 32). 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 (33, 34).

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 (35-37).

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 as CTM são 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 (38, 39).

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 também têm estabelecido hormônios e fatores responsáveis pelo desenvolvimento embrionário do pâncreas, que poderão ajudar a esclarecer as maneiras de controlar a sua proliferação e diferenciação.

3.5.2 - Células-tronco mesenquimais da veia do cordão umbilical

O sangue do cordão umbilical é uma fonte adicional de CT com propósito experimental e potencialidade clínica. Entretanto, a presença de CTM no sangue do cordão umbilical humano é contestada por alguns autores (40, 41). Células derivadas da placenta também exibem um potencial de diferenciação em multi-linhagens de células assim como as CTM isoladas da medula óssea (42, 43).

O emprego de CTM isolada da parede da veia do cordão umbilical apresenta diversas vantagens em relação ao uso de medula óssea, entre elas: disponibilidade de doadores, aproveitamento de material biológico usualmente descartado, criopreservação de todas as amostras coletadas que sejam adequadas para transplante e uma alta capacidade proliferativa destas células.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - COLETA DOS CORDÕES UMBILICAIS E CULTIVO CELULAR

O desenvolvimento do projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR, conforme parecer nº 783/2004 (Anexo 1).

Os cordões umbilicais foram obtidos de partos normais e cesarianas realizados no Hospital e Maternidade Santa Cruz, sito na Avenida Batel, 1889, Curitiba, Paraná. A coleta realizou-se dentro dos padrões éticos de coleta de material biológico para estudo, tendo as mães e os pais assinado um termo de consentimento informado (Anexo 2).

Imediatamente após a coleta, os cordões foram imersos em tampão PBS e transportados até o laboratório. A veia do cordão umbilical foi canulada em suas duas extremidades e lavada internamente com solução de PBS (pH 7,4) contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco-BRL), depois completado com colagenase IA 0,2% (Sigma) em PBS. As extremidades foram pinçadas e o cordão foi mantido em incubadora durante 40 minutos a 37°C. A solução de colagenase e células foram colhidas e a veia lavada duas vezes com PBS (pH 7,4) e massageada suavemente para se colher o restante das células endoteliais e subendoteliais. Posteriormente, centrifugação a 600 xg, ressuspensão do aglomerado em meio de crescimento L-DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose*, Sigma), enriquecido com 20% de Soro Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum Standard) de lotes designados para cultivo de célula-tronco (Hyclone). As células foram distribuídas em placas de cultura aderentes na concentração de 10^5 / mL. Após 24 a 72 horas, todo o meio de cultivo foi trocado com o objetivo de remover as células não aderentes. Todo o processo está apresentado esquematicamente na Figura 2.

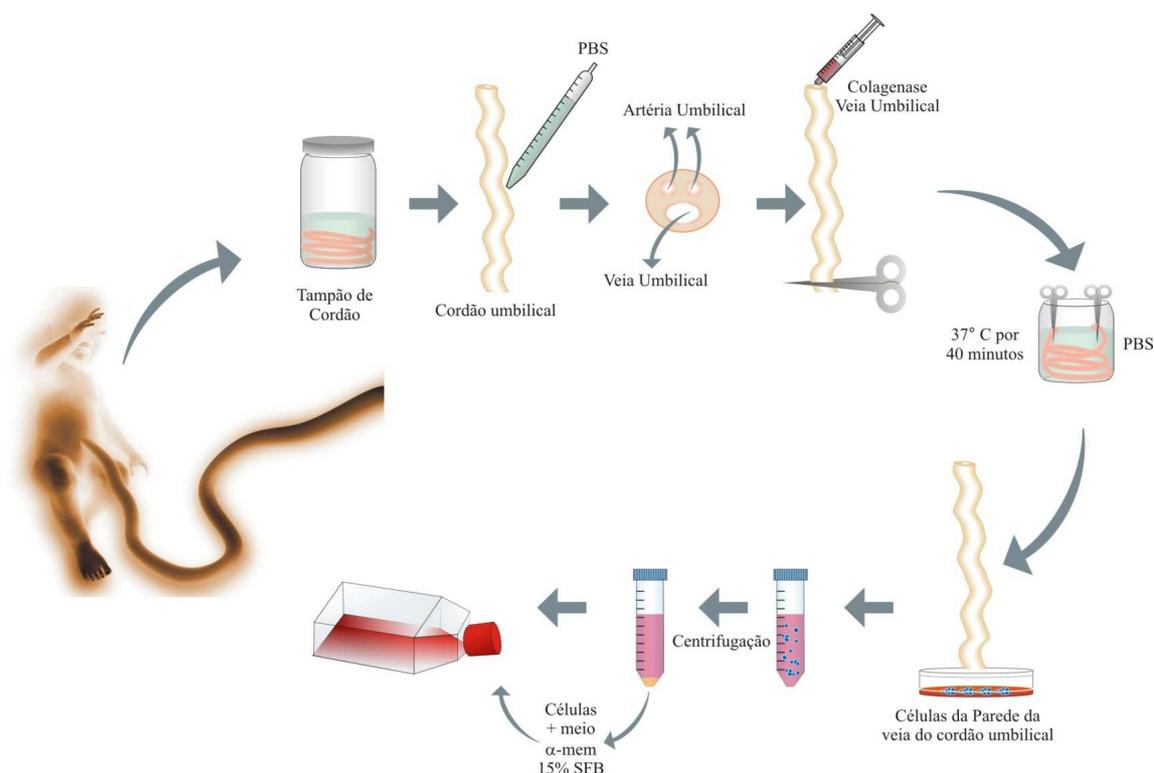


Figura 2: Ilustração das etapas do isolamento das CTM da parede da veia do cordão umbilical humano

Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, as células foram coletadas das garrafas com o uso de solução de tripsina-EDTA 1x (0,05% Tripsin 0,53 mM EDTA, Gibco-BRL), centrifugadas, ressuspensas e distribuídas em novas garrafas de cultivo.

O cultivo celular foi monitorado sob microscopia óptica e o meio trocado de 2 a 3 vezes por semana, de acordo com a necessidade da cultura.

4.2 - IMUNOFENOTIPAGEM 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 ressuspensão em 50 µL de PBS contendo 1% SFB.

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

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

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.

A análise das células foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD). O equipamento foi ajustado para as condições de análise de tamanho e complexidade celular, e o ajuste de fluorescência foi realizado com auxílio dos controles isotípicos FITC, PerCP, APC e PE. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra, e os dados foram analisados com auxílio do *software* CellQuest Pro (BD).

4.3 - ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO EM LINHAGENS MESENQUIMAIS

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

Pittenger *et al* (1999) (32), 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 em 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 tinge em vermelho os vacúolos lipídicos. As lâminas foram montadas em glicerol e seladas com esmalte.

Todos os experimentos de diferenciação foram realizados em triplicata.

4.4 - DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA DAS CTM

As CTM da veia do cordão umbilical humano expandidas *in vitro* foram utilizadas a partir do quarto subcultivo para o protocolo de diferenciação em células produtoras de insulina, conforme descrito em Tang *et al* (2004) (39). As células foram cultivadas em meio DMEM contendo alta concentração de glicose (H-DMEM, 25 mM) e 10% SFB, durante aproximadamente 2-4 meses, até o aparecimento de *clusters* celulares. A seguir, os cultivos foram pré-incubados em meio DMEM contendo baixa concentração de glicose (L-DMEM, 5,5 mM) suplementado com 5% SFB, 10 μ M Nicotinamida e 1 mM β -mercaptoetanol, durante 7 dias. Nos 7 dias seguintes, os *clusters* foram reinduzidos com as condições anteriores, apenas adicionando-se 10 η M exendina-4.

4.5 – IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Os cultivos da etapa final da diferenciação 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 ressuspensas a uma concentração de 3×10^4 células/mL para serem aderidas em lâminas. 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 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. 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 conjugado com FITC (Abcam), diluído 1:1000 em solução de bloqueio. Nesta incubação também foi incluído DAPI, para visualização dos núcleos celulares. Os controles para estes experimentos foram realizados em lâminas onde omitiram-se as incubações com os anticorpos primários, mantendo-se inalteradas as demais etapas do protocolo.

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).

Os anticorpos primários e secundários utilizados nestes experimentos, bem como as respectivas diluições e a procedência, estão descritos abaixo:

- anti-Somatostatina, diluição 1/200, policlonal de coelho (Abcam);
- anti-Glucagon, diluição 1/200, policlonal de coelho (Abcam);
- anti-Insulina, diluição 1/200, policlonal de cobaia (Abcam) ;
- anti-PDX-1, diluição 1/500, policlonal de coelho (Abcam);
- Anticorpo secundário policlonal de ovelha anti-IgG de coelho conjugado a FITC, diluição 1/1000 (Abcam);
- Anticorpo secundário policlonal de cabra anti-IgG de cobaia conjugado a Texas Red, diluição 1/1000 (Abcam).

5. RESULTADOS

5.1 - ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Os cultivos de CTM foram obtidos conforme descrito no item 4.1. Para a extração das CTM, foram colhidos 53 cordões umbilicais de partos normais e de cesáreas, realizados no Hospital Santa Cruz. Imediatamente após a coleta, os cordões foram imersos em tampão salino fosfato (PBS) e transportados até o laboratório, o tempo de transferência para o processamento no laboratório não excedeu 3-4 horas. A Figura 3 ilustra o método de obtenção das células.

As células foram cultivadas, na concentração de 100 cel/cm², em baixa densidade em garrafas com meio L-DMEM contendo 20% SFB e mantidas a 37°C por 24h. Após este período, o sobrenadante do cultivo era aspirado para remoção das células não aderentes e trocado por meio novo.

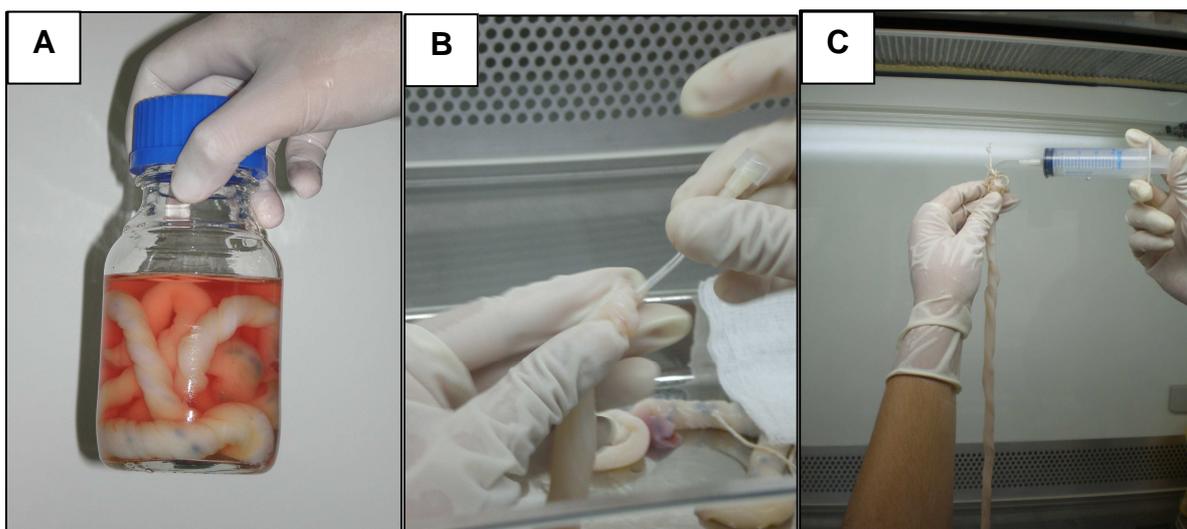


Figura 3: Técnica de isolamento de CTM da parede da veia do cordão umbilical humano. (A) coleta dos cordões umbilicais; **(B)** canulação das extremidades da veia do cordão; **(C)** lavagem com PBS e preenchimento com solução de collagenase.

Dos 53 cordões processados, em 8 foi possível obter cultivos adequados para a continuação dos experimentos. Nos demais, não houve crescimento, os cultivos contaminaram ou houve crescimento preferencial de linhagens não mesenquimais.

O meio dos cultivos foi trocado pela primeira vez geralmente depois de 1 a 3 dias pós o isolamento, e 2 tipos de células aderentes foram observadas: uma população pequena de células achatadas, morfologicamente similares as células endoteliais da veia do cordão umbilical humano, as HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (Figura 4A); e uma segunda população de células em forma de fuso, semelhantes a fibroblastos (Figura 4B). Depois da segunda passagem, os cultivos tornaram-se homogêneos e formaram uma monocamada (Figura 4C). Posteriormente, as células formaram colônias e expandiram, até que no final da segunda semana apresentaram predominância de células com aspecto de CTM (Figura 4D). Essa população de células com morfologia de fibroblastos e potencial proliferativo foi selecionada inicialmente das populações de células heterogêneas e cultivadas até a quarta passagem (Figura 4E e 4F).

Posteriormente, as células aderentes foram mantidas até atingir 80% de confluência, o que acontecia geralmente entre 1 a 3 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 e com o avanço das passagens tomavam um aspecto mais alongado semelhantes a fibroblastos (Figura 4F), provavelmente nessa fase ocorria uma seleção das CTM.

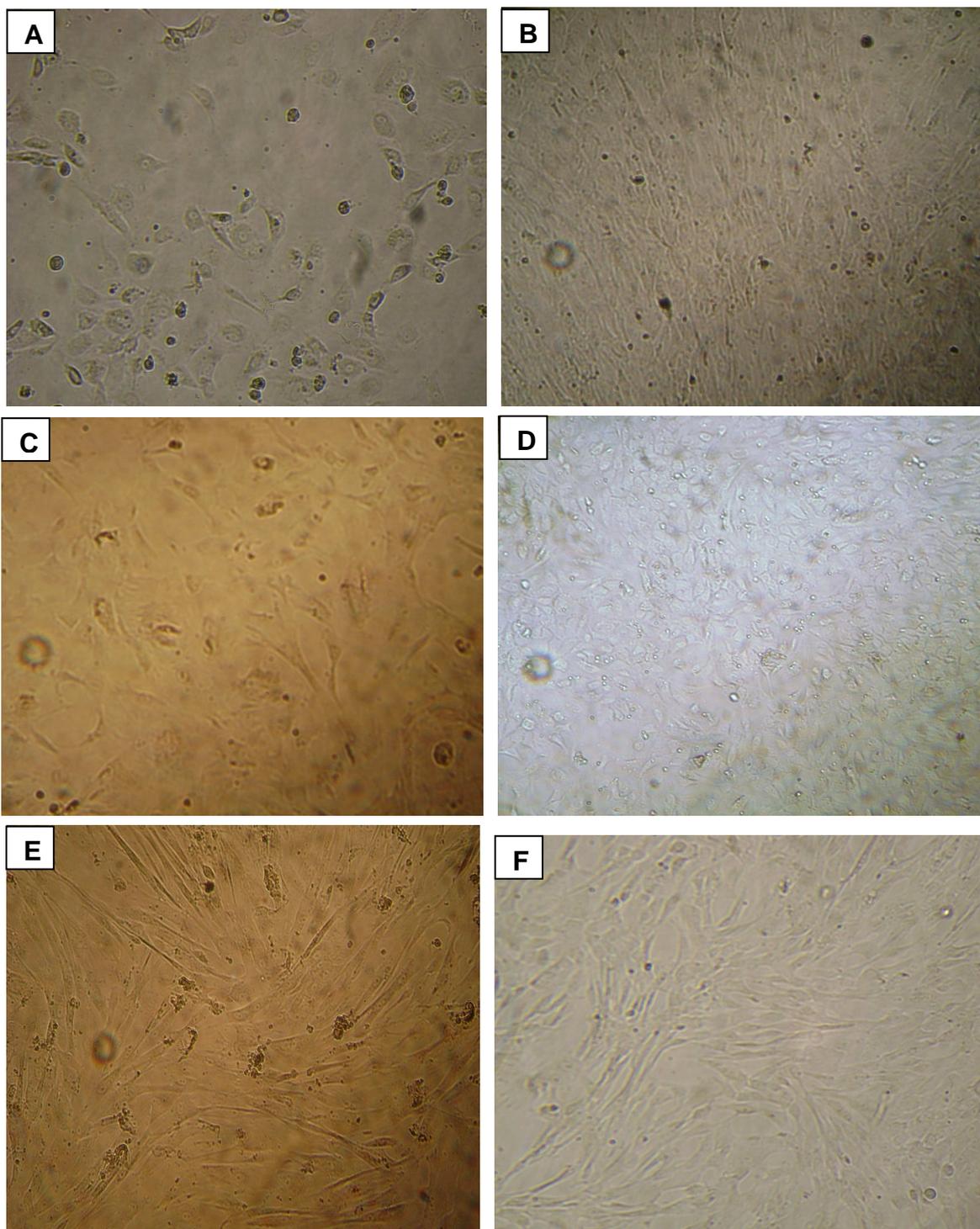


Figura 4: Estágios de cultivo de CTM da veia do cordão umbilical. Cultivos primários (24 horas) com predomínio de HUVEC (A) e CTM (B); em (C) segunda passagem com cultivos homogêneos formando monocamadas; em (D) células com morfologia semelhante a fibroblastos, formando colônias; em (E) e (F), população de células selecionadas e cultivadas até a quarta passagem. Aumento 100X.

5.2 - DIFERENCIAÇÃO DAS CTM DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

A avaliação da capacidade de diferenciação multipotencial das células-tronco de um cultivo constitui-se numa das estratégias empregadas para sua caracterização como sendo CTM. Os protocolos mais comumente utilizados avaliam a capacidade de diferenciação para osteócitos, adipócitos e condrócitos (32). Em nossos cultivos, avaliamos a sua capacidade para diferenciação em adipócitos e osteócitos, conforme o protocolo descrito no item 4.3 de 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 de Alizarin Red, que cora os cristais de fosfato de cálcio na matriz. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 5. Os depósitos de cálcio na matriz foram observados nos cultivos diferenciados, enquanto os cultivos controle não mostraram esta característica.

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 intracelulares. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 5. Nestes experimentos, uma fração significativa dos cultivos apresentaram células com múltiplos vacúolos lipídicos corados. Os vacúolos não foram observados nos cultivos controle.

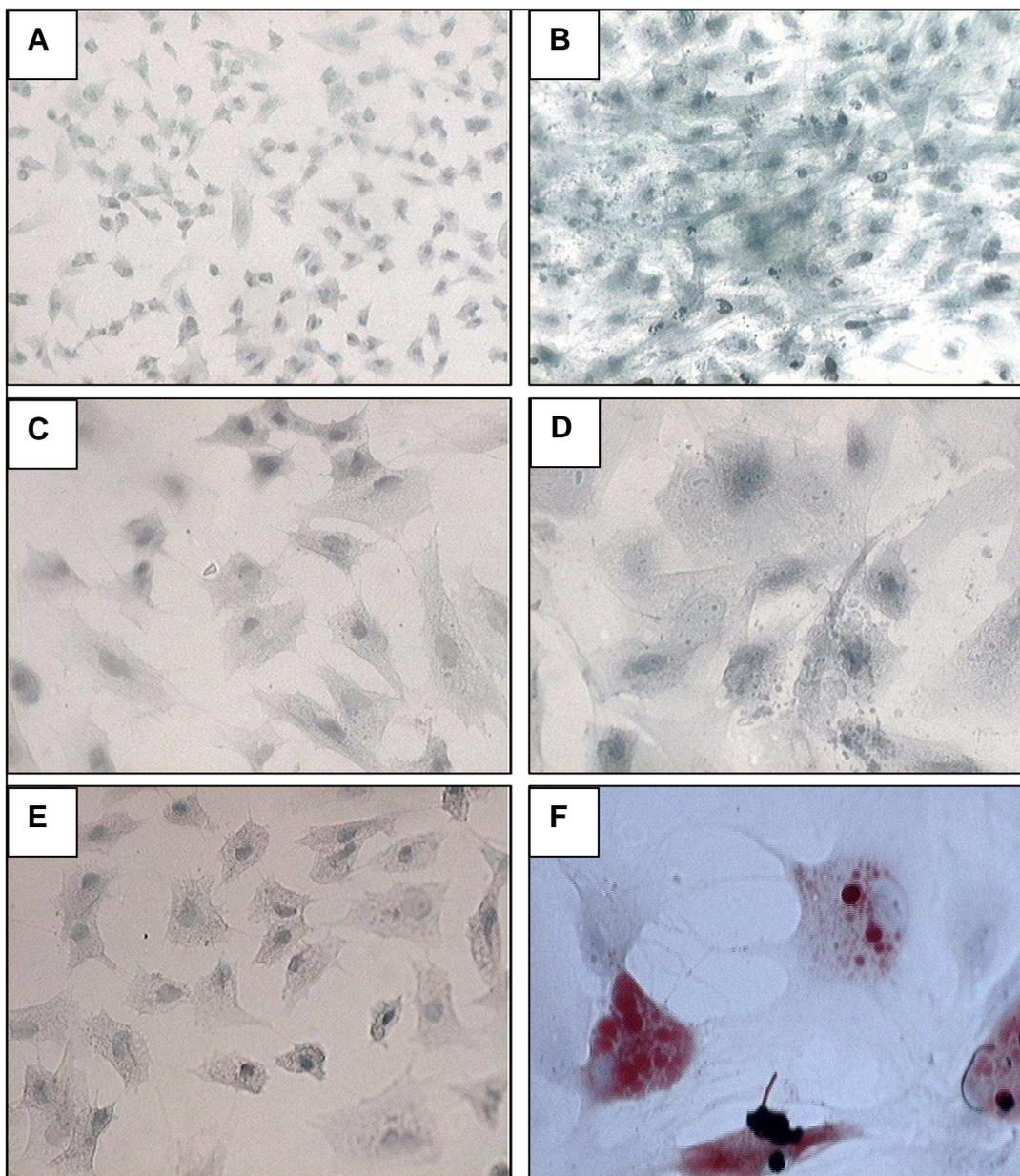


Figura 5: Diferenciação das CTM da veia do cordão umbilical. Diferenciação osteogênica: (A) e (C) controle, (B) e (D) células diferenciadas; coloração Alizarin red. **Diferenciação adipogênica:** (E) controle, (F) células diferenciadas; coloração Oil Red O. Em A e B aumento 100X; em C - F aumento 200X.

Nas culturas controle e experimentais o meio foi trocado duas vezes por semana. Foi notado em diversas amostras, que as células com tratamento em meio indutor vão mudando gradativamente a morfologia de fibroblastóide para arredondada e, a seguir, para uma célula com limites irregulares e prolongamentos finos. Com a estimulação repetida e cultivo por um maior período de tempo, o

número de células que vão se comprometendo com a diferenciação vai progressivamente aumentando. Estas etapas foram nitidamente percebidas nas células cultivadas por longo período. Por este motivo, o tempo médio aproximado de cultivo, em meio indutor de osteócitos e adipócito, foi de 21 dias.

Portanto, estas análises demonstram que os cultivos de células da veia do cordão umbilical humano apresentam potencial de diferenciação para osteócitos e adipócitos, comprovando sua origem mesenquimal.

5.3 - IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Ao contrário das células progenitoras hematopoiéticas, que expressam na superfície de sua membrana a proteína CD34, até hoje ainda não se conhece um marcador fenotípico exclusivo de CTM, capaz de diferenciá-las de outros tipos celulares. Por este motivo, para caracterização fenotípica das CTM costuma-se empregar um conjunto de anticorpos contra diversos marcadores presentes nestas células.

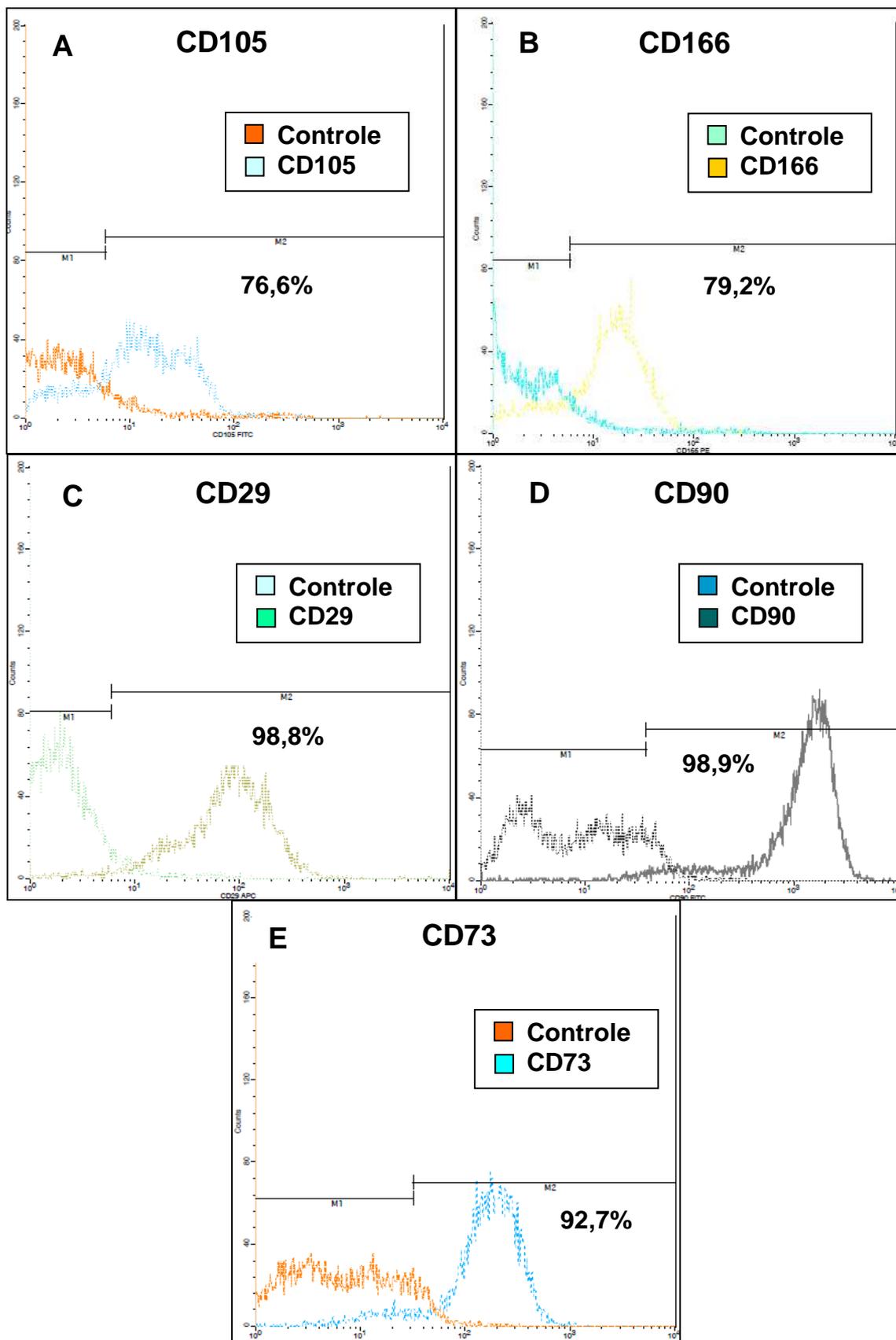
As células isoladas da veia do cordão umbilical humano e repicadas até o quarto subcultivo foram analisadas por citometria de fluxo quanto a granulação, tamanho e marcadores de superfície. A Tabela 1 mostra, resumidamente, os anticorpos utilizados e os principais tipos celulares onde eles são expressos, além de sua marcação em células mesenquimais.

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

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

As células na 4^a passagem foram marcadas diretamente com anticorpos anti-CD29 APC, CD73 FITC, CD90 PE, CD105 FITC, CD166 PE, CD14 APC, CD31 FITC, CD34 PE e CD45 PerCP. Como controle do experimento, amostras das células foram incubadas com os anticorpos isotípicos conjugados a FITC, PE, PerCP e APC. Em seguida, foram submetidas à citometria de fluxo em aparelho FACSCalibur e analisadas pelo software BD CellQuest Pro.

O resultado deste experimento está ilustrado na Figura 6. Pode-se observar que a grande maioria das células foi positiva para os marcadores CD105, CD166, CD29, CD73 e CD90, confirmando a origem mesenquimal. Em relação aos marcadores CD45, CD14, CD34 e CD31 aproximadamente 90% das células foram negativas, como esperado. Apenas uma pequena porcentagem (aproximadamente 10%) mostrou-se positiva, possivelmente como um remanescente de células hematopoiéticas e/ou endoteliais ainda presentes no cultivo.



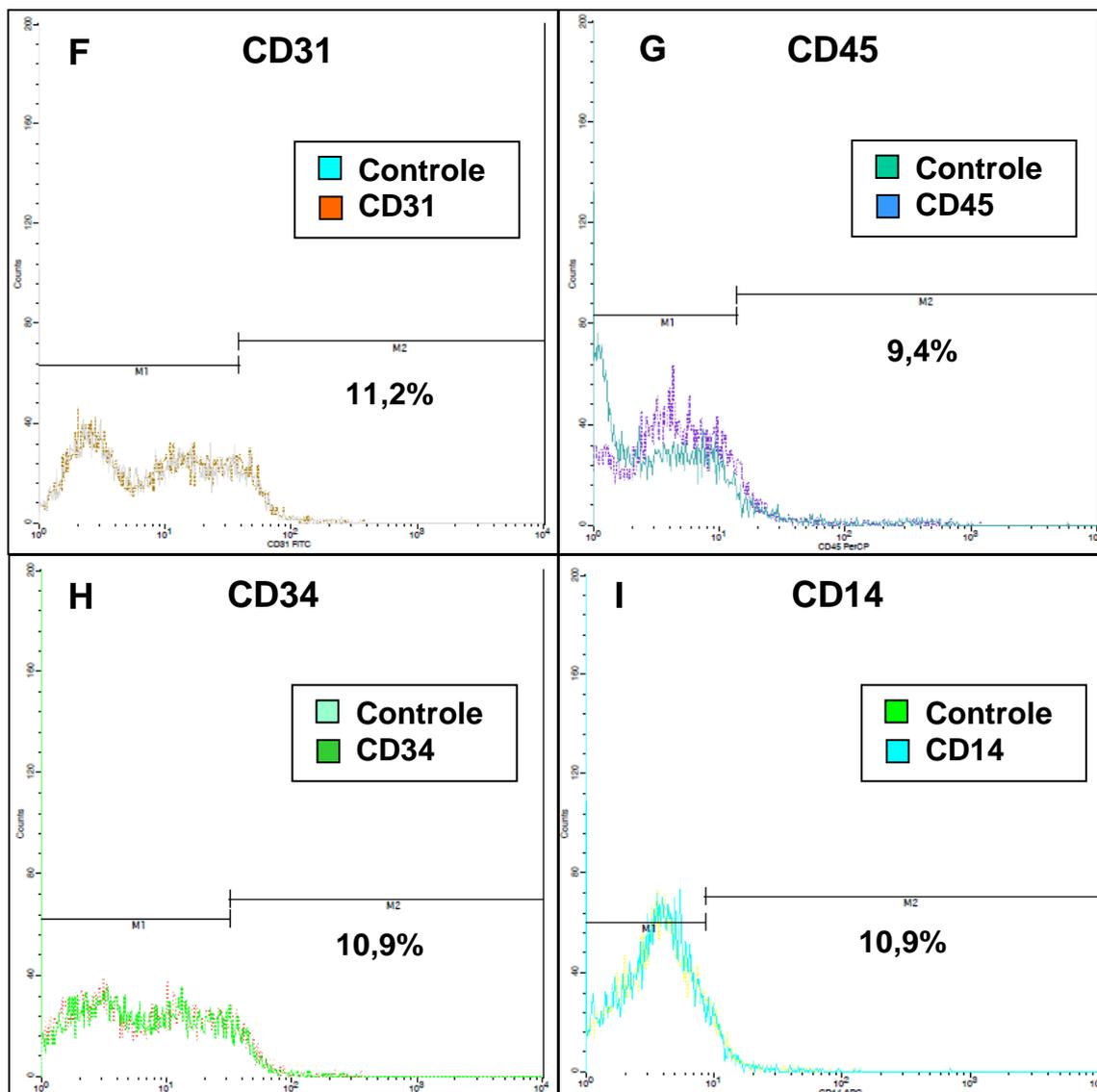


Figura 6: Imunofenotipagem de CTM da veia do cordão umbilical humano. Os histogramas apresentam a % de células reativas com os anticorpos testados. Em A, B, C, D e E a % de reatividade para os marcadores de superfície característicos de CTM CD105, CD166, CD29, CD73 e CD90, respectivamente. Em G, H, I e J a % de reatividade para marcadores de superfície endoteliais e hematopoiéticos CD31, CD45, CD34 e CD14, respectivamente.

5.4 - DIFERENCIAÇÃO ENDÓCRINA PANCREÁTICA DAS CTM

Após a caracterização da origem mesenquimal dos cultivos (na 4ª passagem), estes foram mantidas e expandidas em L-DMEM 10% SFB, evitando confluência

para mantê-las em estado indiferenciado (Figura 7A). Estas células exibiam morfologia similar a fibroblastos, expandiam facilmente *in vitro* e tinham a tendência para formar colônias.

Para o processo de diferenciação de CTM da parede da veia do cordão umbilical humano em células produtoras de insulina, foi utilizado o protocolo descrito no item 4.4 de Material e Métodos.

Quando os cultivos eram induzidos com meio contendo 10% SFB e alta concentração de glicose (25 mm H-DMEM), as células atingiam confluência e começava a se evidenciar o aparecimento de *clusters* celulares, o qual não acontecia antes de um a dois meses de cultura (Figura 7B). Conforme o avanço do tempo de incubação em alta glicose, o cultivo se tornava cada vez mais confluyente e menos refringente. A partir do segundo mês de cultivo em alta glicose, observou-se o aparecimento de vários *clusters* celulares (Figuras 7C e 7D) os quais cresciam até formar esferas no quarto mês (Figura 7E). Estes *clusters* aumentavam em tamanho e número com o passar do tempo. Nesta etapa, os *clusters* eram então induzidos em meio com baixa glicose com 10 μ M de nicotinamida, e reinduzidos com 10 μ M de nicotinamida e 10 η M de exendina-4. No final dos últimos 14 dias, os *clusters* cresceram, o cultivo ficou mais refringente e a monocamada de células que não formava *cluster* começou a se perder. Só os *clusters* permaneceram aderidos (Figura 7F).

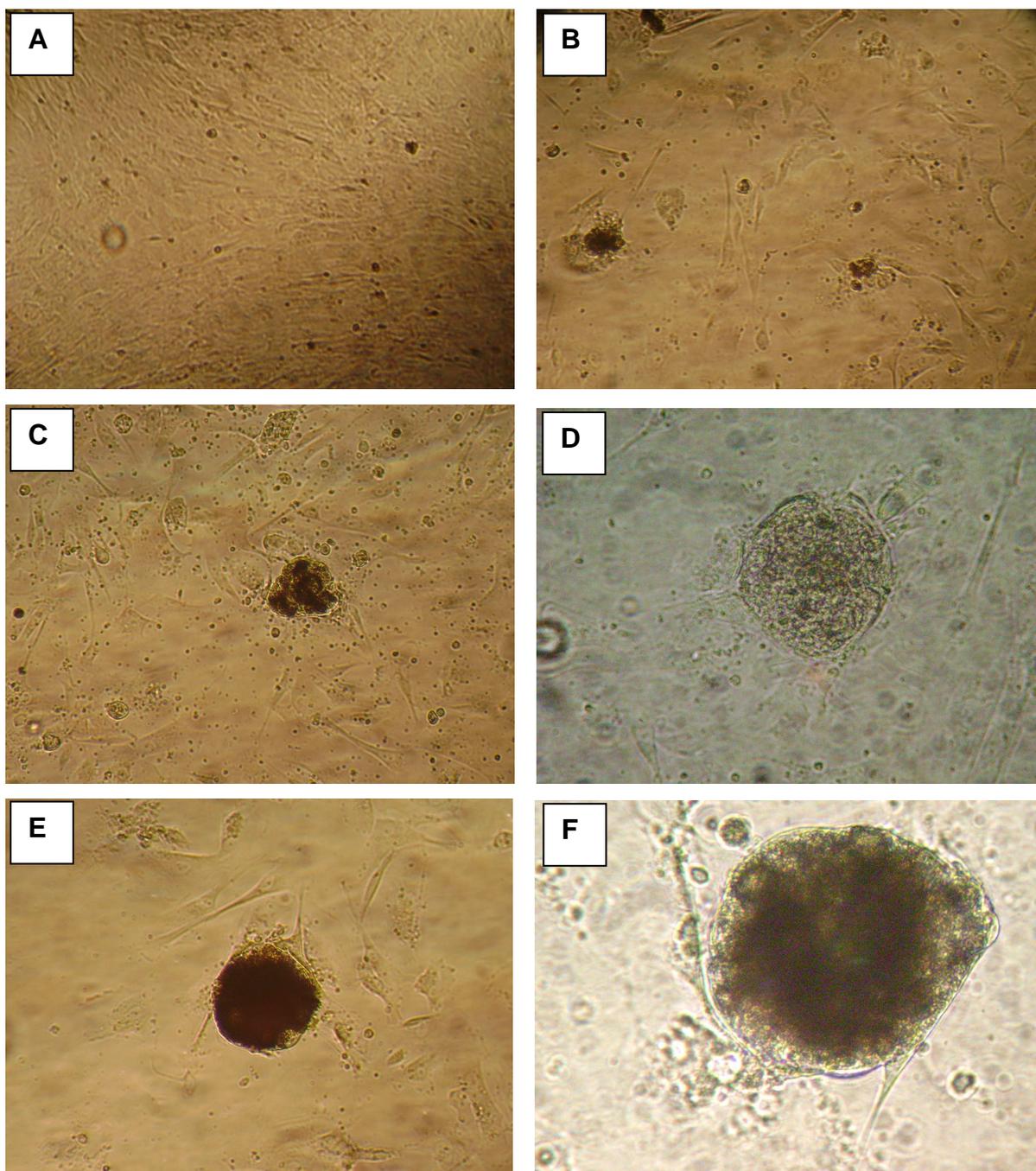


Figura 7: Diferentes estágios da diferenciação de CTM em células produtoras de insulina. (A) Cultivo primário, indiferenciado; **(B)** Cultivo com 3 semanas; **(C)** Formação de clusters após 2 meses de cultivo em alta glicose; **(D)** Formação de clusters após 4 meses de cultivo em alta glicose e nicotinamida; **(E)** Clusters após 4 meses de cultivo em alta glicose e adição de nicotinamida; **(F)** Clusters após 4 meses de cultivo, na etapa final da diferenciação, em baixa glicose com adição de nicotinamida e exendina-4. (A) – (B) aumento 40X; (C) – (F) aumento 100X.

Interessantemente, estas culturas de células sob estímulo de alta concentração de glicose e alta densidade por longos períodos, tiveram um aumento no número e no tamanho dos *clusters* formados, quando foi adicionado o tratamento com 10 mM de nicotinamida por 7 dias, seguido por mais 7 dias com 10 η M de exendina-4.

As observações feitas durante o processo de diferenciação foram semelhantes às aquelas descritas no trabalho de Tang *et al* (2004) (39), 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 quarto mês de indução com alta glicose, as condições de cultura eram mudadas para baixa glicose e 10 μ M de nicotinamida. Nesta fase, já no segundo dia de incubação observava-se que as muitas células descolavam da placa, tanto as células que formavam monocamada quanto as que formavam *clusters*, e muitas vezes o cultivo terminava se perdendo. No trabalho de Tang *et al* (2004) (39), 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 μ M) 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. Outra possibilidade poderia ser devido à qualidade do plástico usado nas garrafas dos cultivos, o que, conforme demonstrado por Sotiropoulou *et al* (2006), pode influenciar o crescimento e viabilidade das CTM em cultivo (44).

5.5 - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Os *clusters* obtidos dos cultivos diferenciados foram desagregados por tripsinização, as células foram aderidas em lamínulas de vidro e fixadas. As células fixadas nas lamínulas 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 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 para somatostatina, glucagon e PDX-1 foi evidenciada por meio de anticorpo secundário conjugado ao FITC, enquanto a marcação para insulina foi revelada com anticorpo secundário TR. Os núcleos das células foram corados com DAPI. As Figuras 8, 9, 10 e 11 apresentam os resultados dos experimentos de imunofluorescência nas CTM diferenciadas.

A expressão de somatostatina foi observada em diversos grânulos no citoplasma das células diferenciadas (Figura 8B), mas não nos controles (Figura 8A). O mesmo foi encontrado no experimento de glucagon, com grânulos presentes no citoplasma das células diferenciadas (Figura 9B), enquanto o controle foi negativo (Figura 9A). O anticorpo anti-PDX-1 também demonstrou a expressão deste fator de transcrição no citoplasma das células após a diferenciação (Figura 10B), mas não nos controles (Figura 10A). Entretanto, não foi possível confirmar a sua presença no núcleo, possivelmente devido à baixa sensibilidade da técnica empregada.

Com relação à insulina, não foi observada produção por estas CTM diferenciadas, obtidas da parede da veia do cordão umbilical. O tom avermelhado encontrado nas lâminas das células incubadas com o anticorpo anti-insulina (Figura 11B) comparado ao controle (Figura 11A) possivelmente foi devido a uma reatividade inespecífica, pois apresentava características difusas ao invés de limitado a grânulos no citoplasma.

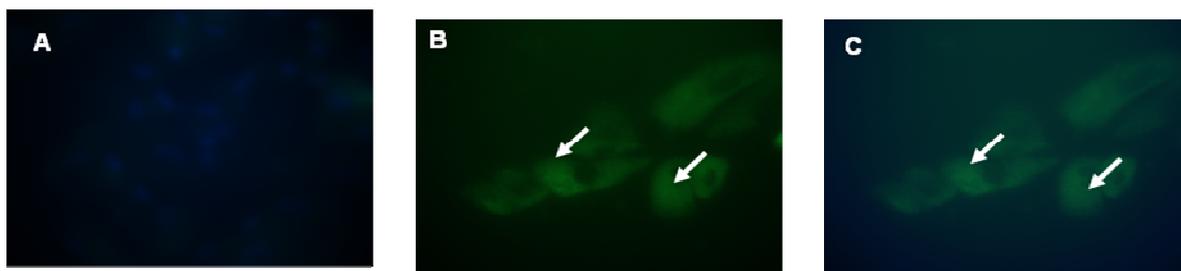


Figura 8: Imunofluorescência indireta para somatostatina em CTM diferenciadas do cordão umbilical. (A) Controle; (B) Anticorpo primário anti-somatostatina. (C) Anticorpo primário anti-somatostatina com anticorpo secundário conjugado FITC; coloração dos núcleos com DAPI. As setas indicam marcação de grânulos de somatostatina. Aumento 400X.

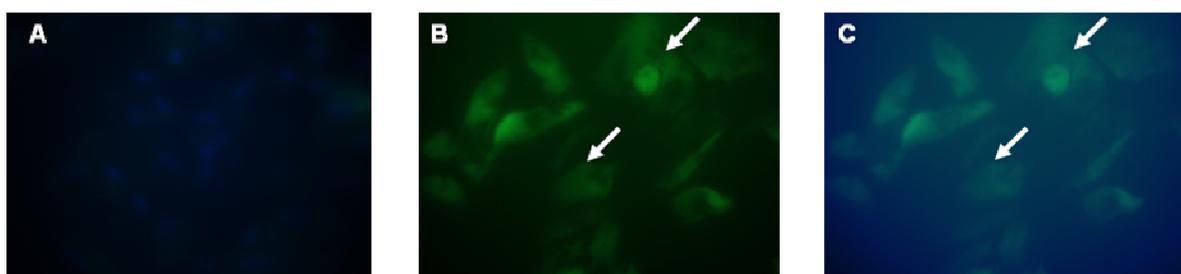


Figura 9: Imunofluorescência indireta para glucagon em CTM diferenciadas do cordão umbilical. (A) Controle; (B) Anticorpo primário anti-glucagon. (C) Anticorpo primário anti-glucagon com anticorpo secundário conjugado FITC; coloração dos núcleos com DAPI. As setas indicam marcação de grânulos de glucagon no citoplasma. Aumento 400X.



Figura 10: Imunofluorescência indireta para PDX-1 em CTM diferenciadas do cordão umbilical. (A) Controle; (B) Anticorpo primário anti-PDX-1. (C) Anticorpo primário anti-PDX-1 com anticorpo secundário conjugado FITC; coloração dos

núcleos com DAPI. As setas indicam a expressão de PDX-1 no citoplasma. Aumento 400X.



Figura 11: Imunofluorescência indireta para insulina em CTM diferenciadas do cordão umbilical. (A) Controle; (B) Anticorpo primário anti-insulina. (C) Anticorpo primário anti-insulina com anticorpo secundário conjugado TR; coloração dos núcleos com DAPI. Aumento 400X.

6. DISCUSSÃO

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

Embora grandes avanços tenham sido alcançados com o “Protocolo de Edmonton” e modificações da técnica original, diversos aspectos ainda necessitam aperfeiçoamento para possibilitar a indicação do transplante de ilhotas a uma parcela mais ampla de pacientes com DM1. Para lidar com as principais dificuldades ainda enfrentadas (a técnica de isolamento de ilhotas, a disponibilidade de tecido produtor de insulina, a rejeição e o uso de drogas imunossupressoras), diversas linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos.

O principal obstáculo a ser vencido é a necessidade do uso crônico de imunossupressores para evitar a rejeição do enxerto. Portanto, atualmente, ao se considerar a realização deste tipo de transplante, deve-se pesar os possíveis benefícios (estabilização metabólica, diminuição das complicações crônicas, abolição das injeções de insulina) em relação aos potenciais efeitos colaterais destas drogas (maior susceptibilidade a infecções, maior incidência de tumores malignos e toxicidade em órgãos como os rins e as próprias células das ilhotas). Estudos visando a imunoproteção das ilhotas, a indução de tolerância ao transplante e o desenvolvimento de novos imunossupressores são fundamentais nesta área (45, 46).

Em relação à disponibilidade de ilhotas para transplante, diversos aspectos da técnica de isolamento de ilhotas vêm sendo trabalhados com o objetivo de melhorar sua eficiência, visto que ainda são necessários de 2 a 3 doadores de órgãos para obtenção de ilhotas suficientes para tratamento de 1 único paciente (47). Atualmente, a maior esperança concentra-se na possibilidade de geração de tecido produtor de insulina a partir de uma fonte renovável como as CT, tanto embrionárias quanto adultas (48).

A descoberta de métodos para isolar e cultivar CTE humanas em 1998, por Thomson *et al* (1998), renovou as esperanças de médicos, pesquisadores e pacientes diabéticos e suas famílias de uma cura para o DM1 e, possivelmente, até mesmo para o DM2 (49). Em teoria, CTE podem ser cultivadas e tratadas para se diferenciarem em qualquer tecido/célula do corpo, até mesmo em células β pancreáticas produtoras de insulina. Com um suprimento adequado de CPI, cultivadas *in vitro*, haveria massa suficiente para transplante, para que a terapia celular do diabetes pudesse ser aplicada amplamente em pacientes diabéticos.

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

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

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

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.

No sangue do cordão umbilical humano estão presentes células progenitoras hematopoiéticas e também endoteliais (50, 51). Entretanto, os dados sobre a presença de CTM no sangue do cordão são controversos. Enquanto alguns autores descrevem a obtenção de CTM a partir do sangue do cordão (26), outros afirmam que estas células não são isoladas com sucesso a partir desta fonte (52). Ao mesmo tempo, resultados obtidos por Panepucci *et al* (2004) e Mareschi *et al* (2001) sugerem que as CTM estão presentes em vários órgãos fetais e circulam simultaneamente com precursores hematopoiéticos no sangue de fetos prematuros (52, 53). Acreditando na hipótese que as CTM derivadas das camadas do endotélio e subendotélio da veia do cordão umbilical humano apresentam propriedades similares as CTM retiradas da medula óssea, como originariamente descrito por Friedenstein *et al* (1974) (54), neste trabalho realizamos o isolamento destas células conforme descrito por Romanov *et al* (2003) e Covas *et al* (2003) (28, 55).

Os objetivos neste estudo foram isolar e expandir CTM do endotélio e subendotélio da veia do cordão umbilical humano e, a seguir, avaliar a 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 do endotélio e subendotélio da veia do cordão umbilical humano 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.

Inicialmente, do isolamento das células, obteve-se uma cultura heterogênea de células, rica em HUVEC e CTM. Depois, com as passagens a cultura mostrou-se homogênea e praticamente livre de contaminação endotelial. Deste modo, como resultado do processo de digestão enzimática e cultivo aderente, temos a possibilidade de obter uma população de células positivamente diferenciadas quando comparadas com outras isoladas de fontes alternativas como medula óssea e lipoaspirado (56). Outras células que compõem a parede da veia estão ausentes nas suspensões celulares que foram incubadas num período curto com colagenase, permanecendo intactas as camadas mais profundas. O pericito, que está presente em processos de lipoaspiração e aspirado de medula óssea, é um componente de microvasos e está ausente em grande veias (57).

Os resultados dos estudos morfológicos mostraram que as células isoladas da parede da veia do cordão umbilical têm muita semelhança com as culturas de CTM obtidas de medula óssea e outras fontes. Entretanto, observamos que conforme as passagens e o tempo de cultivo, as células soltavam da garrafa e o cultivo era perdido. Nosso dados iniciais nestes cultivos vão de encontro aos obtidos por Sotiropoulou *et al* (2006), mostrando que a qualidade do plástico pode influenciar na proliferação e produção de CT em escala clínica (44). Estes autores encontraram um aumento de 3 a 4 vezes mais CT ao final da terceira passagem, dependendo do fabricante das garrafas de cultivo.

A multipotencialidade das CTM isoladas em nosso experimento foi comprovada através da diferenciação em linhagens adipogênicas e osteogênicas. O trabalho de Pittenger *et al* (1999) descreve que as CTM de medula óssea e do cordão umbilical apresentam características morfológicas e imunofenotípicas similares (32). Entretanto, Panepucci *et al* (2004) compararam a expressão de genes entre as CTM dessas duas fontes e constataram que um conjunto de genes relacionados a atividade antimicrobiana e osteogênese são mais evidentes em CTM da medula óssea (bioglycan, TSC22, CD44, vitronectina, colagenase tipo 1, fibronectina e laminina). Já as CTM derivadas de cordão umbilical mostraram uma expressão aumentada de genes que participam em vias de angiogênese e remodelamento de matriz (CXCL6, IL-8, IL1RL1LG, MMP1, ITGA3, CXCL1) (53). Essas diferenças poderiam ser explicadas pela origem das CTM. Isso implica que CTM a partir de uma fonte específica pode ser mais eficiente para diferenciação em células-alvo específicas e, também, poderiam ser mais úteis para uma determinada terapêutica em particular.

Por técnica de citometria de fluxo comprovamos a expressão nas células isoladas, dos antígenos CD105, CD166, CD29, CD90 e CD73, que são típicos de CTM, e a ausência de CD31, CD45, CD34 e CD14. 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 ao nosso alcance. Dentre as poucas alternativas existentes, escolhemos o protocolo descrito por Tang *et al* (2004), que conseguiu diferenciar CTM de medula óssea de camundongo Balb/c em células que expressavam os genes *Ins 1*, *Ins 2*,

IAPP, GLUT-2, glicoquinase, PDX-1, Pax6 e nestina (39). Também apresentavam razoável potencial de secreção de insulina em resposta ao estímulo de glicose, e foram capazes de reverter a hiperglicemia de camundongos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ).

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 (58, 59). 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) (60, 61) e também para induzir a diferenciação em ilhotas pancreáticas e a secreção de insulina (62). Exendina-4 é um agonista do *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1), que estimula a proliferação, neogênese e sobrevivência das células β *in vivo* (14). Deste modo, optamos por utilizar no meio de cultivo em nosso modelo experimental uma combinação de glicose em baixa concentração (5,5 mM), exendina-4 e nicotinamida.

Assim, as CTM isoladas foram expandidas indiferenciadas e, a seguir, cultivadas por longos períodos em condições propícias à diferenciação em CPI conforme o protocolo de Tang *et al* (2004) (39). Após períodos variáveis entre dois a quatro meses de tratamento em alta concentração de glicose, os cultivos tomavam a forma de *clusters* celulares e o meio era acrescido dos fatores finais de diferenciação, primeiro a nicotinamida e, a seguir, a exendina-4. Ao final do experimento, o processo de diferenciação das CTM para CPI foi analisado através de imunofluorescência indireta.

Embora ainda seja necessário aperfeiçoar todos os protocolos baseados em CTE e CTA, todas estas evidências sugerem fortemente que as CT são uma fonte potencial de tecidos para terapias regenerativas no futuro. A diferenciação de células β a partir de CT é direcionada por determinantes ainda desconhecidos, que incluem interações célula-célula, sinais da matriz extracelular e a presença da combinação de fatores de crescimento, hormônios, citocinas e nutrientes.

O principal desafio é obter um produto celular capaz de mimetizar o mais próximo possível as características básicas de uma célula β pancreática. As vias de detecção de nutrientes, processamento de insulina e sua exocitose regulada, somados ao padrão de expressão do gene da insulina, devem ser traços fenotípicos

chave na obtenção de um produto celular final capaz de restaurar a perda de função no organismo.

A imunofluorescência indireta mostrou a presença de somatostatina, glucagon e do fator de transcrição PDX-1 no citoplasma das células tratadas, mas não nos controles. O hormônio insulina não foi observado nestas amostras, revelando uma diferenciação incompleta. Não foi possível no nosso estudo determinar o motivo para esta diferenciação incompleta, entretanto, a qualidade do plástico utilizado nos cultivos poderia ser um dos fatores, conforme sugerido nos trabalhos de Sotiropoulou *et al* (2006 e 2007) (44, 63). Em relação ao estudo de Tang *et al* (2004) (39), 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 imunomarcagem com partículas de ouro, revelando a presença de grânulos de insulina nestas células, embora em pequena quantidade.

O desenvolvimento do pâncreas endócrino está sob o fino controle de vários fatores de transcrição (64). 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 (65). Portanto, a expressão de PDX-1 em células precursoras é essencial para o sucesso da diferenciação.

As dificuldades no tratamento do DM (por exemplo, a necessidade de várias injeções diárias de insulina para o controle glicêmico), a ocorrência de complicações crônicas da doença e o risco de hipoglicemias graves em pacientes com DM1, já justificam, por si só, a pesquisa por estratégias terapêuticas alternativas à aplicação de insulina exógena. Além dos vários tipos de pesquisas que buscam soluções alternativas para o tratamento desta doença, atualmente é verificada uma ênfase em estudos que aprofundem o entendimento da patogenia desta enfermidade. Os modelos animais têm-se mostrado bastantes úteis para este fim. Os camundongos NOD, desde a sua descoberta há 20 anos atrás, oferecem uma imensa percepção

dentro dos complexos processos que envolvem as doenças auto-imunes, e representam o melhor modelo animal para o estudo do DM1 (66-69).

Embora ainda seja necessário otimizar todos os protocolos baseados em CTE e CTA, estas evidências sugerem fortemente que as CT são uma fonte potencial de tecidos para terapias regenerativas no futuro. A diferenciação de células β a partir de CT é direcionada por determinantes ainda desconhecidos, que incluem interações célula-célula, sinais da matriz extracelular e a presença da combinação de fatores de crescimento, hormônios, citocinas e nutrientes. O principal desafio é obter um produto celular capaz de mimetizar o mais próximo possível as características básicas de uma célula β pancreática. As vias de detecção de nutrientes, processamento de insulina e sua exocitose regulada, somados ao padrão de expressão do gene da insulina, devem ser traços fenotípicos chave na obtenção de um produto celular final capaz de restaurar a perda de função no organismo.

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

7. CONCLUSÃO

- As células-tronco da parede da veia do cordão umbilical humano foram isoladas, cultivadas e expandidas *in vitro* em estado indiferenciado;
- As células-tronco isoladas foram caracterizadas como CTM, tanto por citometria de fluxo quanto pelo seu potencial de diferenciação em adipócito e osteócito;
- As CTM isoladas foram capazes de diferenciar para fenótipo endócrino pancreático, mostrando expressão intracelular dos hormônios somatostatina, glucagon e do fator de transcrição PDX-1, como demonstrado pela imunofluorescência indireta. Entretanto não apresentou expressão do hormônio insulina.
- Artigo publicado à Revista Transplantation Proceedings: Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal stem cells from human umbilical cord vein.

8. REFERÊNCIAS

1. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998 Jul;15(7):539-53.
2. 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.
3. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001 Jul 21;358(9277):221-9.
4. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 2004 Mar 27;328(7442):750-4.
5. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
6. Ritz E, Schomig M. The diabetic patient with renal failure. *Nefrologia*. 2000;20 Suppl 3:16-24.
7. Sutherland DE, Gruessner R, Kandswamy R, Humar A, Hering B, Gruessner A. Beta-cell replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabetes mellitus: an integrated approach. *Transplant Proc*. 2004 Jul-Aug;36(6):1697-9.
8. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000 Jul 27;343(4):230-8.
9. Robertson RP. Pancreatic islet transplantation for diabetes: successes, limitations, and challenges for the future. *Mol Genet Metab*. 2001 Sep-Oct;74(1-2):200-5.
10. Guo T, Hebrok M. Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy. *Endocr Rev*. 2009 May;30(3):214-27.
11. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg*. 2004 Jan;139(1):93-9.

12. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):144-60.
13. Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells.* 2004;6(4):369-74.
14. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 5;97(14):7999-8004.
15. 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 Mar;6(3):278-82.
16. Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, et al. Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem.* 2003 Aug 22;278(34):31950-7.
17. Horb ME, Shen CN, Tosh D, Slack JM. Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr Biol.* 2003 Jan 21;13(2):105-15.
18. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5034-9.
19. 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 Feb 4;100(3):998-1003.
20. 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 Feb;49(2):157-62.
21. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci.* 2006 Oct;31(10):589-95.
22. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999 Oct;181(1):67-73.

23. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001 Jun;226(6):507-20.
24. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001 May 28;153(5):1133-40.
25. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int*. 2003 Feb;72(2):135-42.
26. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med* (Maywood). 2008 Jul;233(7):901-13.
27. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One*. 2008;3(1):e1451.
28. Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Sep;36(9):1179-83.
29. Zucconi E, Vieira NM, Bueno DF, Secco M, Jazedje T, Ambrosio CE, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Canine Umbilical Cord Vein - A Novel Source for Cell Therapy Studies. *Stem Cells Dev*. 2009 Mar 16.
30. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001 Aug;44(8):1928-42.
31. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 1993 Jul 1;82(1):66-76.
32. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

33. Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Med*. 2007;140:67-81.
34. Harting M, Jimenez F, Pati S, Baumgartner J, Cox C, Jr. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2008;10(3):243-53.
35. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol*. 2003 Aug;31(8):723-32.
36. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004 Nov;95(5):209-14.
37. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol*. 2004 Dec;32(12):1212-25.
38. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*. 2004 Oct 15;10(20):3016-20.
39. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*. 2004 Jul;53(7):1721-32.
40. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004;22(4):625-34.
41. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-301.
42. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells*. 2004;22(5):649-58.

43. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Mar;194(3):664-73.
44. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006 Feb;24(2):462-71.
45. Aita CA, Sotta ED, Silva IC, Percegon L, Riella MC. Islet cell transplantation. *Port J Nephrol Hypert.* 2007;21(3):193-200.
46. Shapiro AM, Nanji SA, Lakey JR. Clinical islet transplant: current and future directions towards tolerance. *Immunol Rev.* 2003 Dec;196:219-36.
47. Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress. *N Engl J Med.* 2004 Feb 12;350(7):694-705.
48. Serup P, Madsen OD, Mandrup-Poulsen T. Islet and stem cell transplantation for treating diabetes. *Bmj.* 2001;322(7277):29-32.
49. Thomson JA, Marshall VS. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol.* 1998;38:133-65.
50. Senegaglia AC, Brofman PR, Aita CA, Dallagiovanna B, Rebelatto CL, Hansen P, et al. In vitro formation of capillary tubules from human umbilical cord blood cells with perspectives for therapeutic application. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2008 Dec;23(4):467-73.
51. Smith AR, Wagner JE. Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2009 Oct;147(2):246-61.
52. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica.* 2001 Oct;86(10):1099-100.

53. Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(7):1263-78.
54. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92.
55. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003;21(1):105-10.
56. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.
57. Sims DE. Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000 Oct;27(10):842-6.
58. 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 Dec;128(24):5109-17.
59. 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.
60. Burkart V, Blaeser K, Kolb H. Potent beta-cell protection in vitro by an isoquinolinone-derived PARP inhibitor. *Horm Metab Res*. 1999 Dec;31(12):641-4.
61. Heller B, Burkle A, Radons J, Fengler E, Jalowy A, Muller M, et al. Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1994 Sep;375(9):597-602.
62. Vaca P, Berna G, Araujo R, Carneiro EM, Bedoya FJ, Soria B, et al. Nicotinamide induces differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells. *Exp Cell Res*. 2008 Mar 10;314(5):969-74.

63. Sotiropoulou PA, Perez SA, Papamichail M. Clinical grade expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2007;407:245-63.
64. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1025-34.
65. McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia.* 2001 Oct;44(10):1203-14.
66. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:447-85.
67. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity.* 1997 Dec;7(6):727-38.
68. Lang J, Bellgrau D. Animal models of type 1 diabetes: genetics and immunological function. *Adv Exp Med Biol.* 2004;552:91-116.
69. Rosmalen JG, Leenen PJ, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2002 Jul;13(5):209-14.

9. ANEXOS

9.1 – PARECER DO CEP – PUCPR



PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer nº: 400/07 CEP PUCPR
Registro do projeto no CEP: 1639

Título do Projeto: CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DE CELULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO EM CELULAS
PRODUTORAS DE INSULINA

Grupo: 3

Pesquisador responsável: Carlos Alberto Moroya AitaInstituição: PUC PR

Objetivos: Os objetivos deste trabalho são cultivar e diferenciar células tronco mesenquimais da parede da veia do cordão umbilical humano, em células produtoras de insulina, para tanto os pesquisadores pretendem isolar estas células das paredes vasculares, cultivar e expandir as células, diferenciá-las in vitro em células capazes de produzir insulina e por ultimo analisar a expressão e secreção de insulina por estas células já indizadas à diferenciação.

Comentários: O trabalho em questão é um dos subprojetos do projeto "Novas perspectivas em transplante renal e de ilhotas com células tronco-mesenquimais", contemplado no edital CT-Biotecnologia do CNPq, sob número 024/2005. Trata-se de um trabalho experimental relacionado com o mestrado da aluna Thatiana Mara dos Santos, que está sendo realizado nesta instituição, sob orientação do pesquisador responsável por este projeto, Prof. Dr. Carlos Alberto M. Aita.



Considerações: Não foram encontrados impedimentos ou inadequações de ordem ética nesta terceira versão do protocolo experimental, particularmente naquilo que diz respeito à metodologia proposta. O pesquisador fornece um modelo de termo de autorização a ser assinada pelo responsável pelo Hospital Santa Cruz (Curitiba), instituição de onde se pretende coletar os cordões umbilicais a serem usados na pesquisa. Tal procedimento está de acordo com as exigências do CEP PUC PR. Por outro lado, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ainda está inadequado, sendo que as pendências éticas do documento serão relatas em seguida.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado

Recomendações: Nenhuma

Conclusões: As correções feitas tornam o projeto sem nenhuma inadequação de ordem ética.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: 8/8/2007, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto.

Situação: PROJETO APROVADO

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos



adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 14 de agosto de 2007



Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUC PR

9.2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE CORDÃO UMBILICAL

Eu _____, RG _____ nº _____, estou sendo convidado a participar do estudo denominado “**Cultivo e diferenciação de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano em células produtoras de insulina**”, cujo objetivo é transformar células-tronco encontradas no cordão umbilical em células produtoras de insulina. Para tanto, o cordão que seria descartado, será coletado no hospital após o parto, e no laboratório as células serão isoladas, cultivadas e transformadas em células capazes de produzir insulina. As células que por algum motivo e em qualquer etapa do trabalho, não venham a ser usadas serão desprezadas seguindo padrões legais de descarte de material biológico. Os resultados dessa pesquisa poderão contribuir para o estabelecimento de tratamentos alternativos para pacientes diabéticos, com o intuito de tentar diminuir a dependência destes ao uso da insulina.

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso aceite participar desta pesquisa eu serei questionada a respeito da doação do cordão umbilical, sendo este coletado por uma equipe especializada através de padrões clínicos, que não oferecem riscos à minha saúde ou do bebê, bem como não afeta o procedimento obstétrico.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, nem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são, Carlos Alberto Mayora Aita e Thatiana Mara dos Santos, com quem poderei manter contato pelo telefone: (41) 3271-1239.

Estão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li, portanto, este termo, fui orientado quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a

participar. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

Mãe _____

Pai _____

Pesquisador responsável _____

Curitiba _____ **de** _____ **de** _____.

9.3 – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA TRANSPLANTATION PROCEEDINGS

EXPRESSION OF PANCREATIC ENDOCRINE MARKERS BY MESENCHYMAL STEM CELLS FROM HUMAN UMBILICAL CORD VEIN

Authors:

| | |
|--------------------------------|--|
| Thatiana Mara dos Santos (1) | thatimarabio@yahoo.com.br |
| Luciana Soares Percegoni (1) | percegoni@hotmail.com |
| Patricia González (1) | pattybqg@gmail.com |
| Aline Calil (1) | alinecalil@hotmail.com |
| Carla Corradi Perini (1) | ccorradiperini@yahoo.com.br |
| Fábio Rueda Faucz (1) | fabio.faucz@pucpr.br |
| Niels Olsen Saraiva Câmara (2) | niels@icb.usp.br |
| Carlos Alberto Mayora Aita (1) | c.aita@pucpr.br |

Institutions:

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

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

Financial support:

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

Correspondence and reprint requests should be directed to:

Carlos Alberto Mayora Aita

Tel/Fax +55 (41) 3271-2135 / 3271-1657 - * E-mail: c.aita@pucpr.br

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Rua Imaculada Conceição, 1155

Curitiba (PR) Brazil

80215-901

* The author agrees with his E-mail being published

The article contains 1 Figure.

*Abstract***Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal stem cells from human umbilical cord vein**

Mesenchymal stem cells (MSC) from human umbilical cord vein have a great potential for use in cell therapy due to its ease of isolation, expansion and differentiation, besides relative acceptance of the ethical point of view. The umbilical cord are collected at the moment of birth without offering any risk to both mother and child. Our intention was to isolate and promote in vitro expansion and differentiation of MSC from human umbilical cord vein into cells with a pancreatic endocrine phenotype. MSC were obtained from human umbilical cord vein through collagenase digestion, characterized by cytochemistry and FACS and in vitro expanded. MSC differentiation into an endocrine phenotype was induced with high glucose (23 mmol/L) media containing nicotinamide, exendin-4 and 2-mercaptoethanol. Insulin, somatostatin, glucagon and PDX-1 expression was analyzed by immunofluorescence. Cells isolated from the umbilical cord vein were MSC as confirmed by FACS and cytochemistry. Somatostatin, glucagon and PDX-1 expression by differentiated cells were demonstrated by immunofluorescence, although insulin was not expressed. The MSC differentiation protocol employed in this work induced expression of some endocrine markers. Insulin was not produced by these cells probably due to an incomplete differentiation induction, showing that the used protocol still needs to be improved.

Introduction

The search for a renewable source of cells with β -cell properties is a very interesting subject and a promising therapeutic alternative for diabetes mellitus.¹ Mesenchymal stem cells (MSC) from human umbilical cord vein have a great potential for use in cell therapy due to its ease of isolation, expansion and differentiation, besides relative acceptance of the ethical point of view. The umbilical cord are collected at the moment of birth without offering any risk to both mother and child. Our intention was to isolate and promote in vitro expansion and differentiation of MSC from human umbilical cord vein into cells with a pancreatic endocrine phenotype.

Methods

Umbilical cords were obtained from uncomplicated term pregnancies after each mother signed an informed consent. The study protocol was approved by the University's ethics committee (protocol number 783/2004). *MSC isolation and culture*: the umbilical vein was cannulated at both ends and washed with PBS. After clamping one end, the vein was filled with 0.2% collagenase IA solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and incubated for 30 min at 37°C. The vein was rinsed with PBS and the cell suspension recovered was centrifuged. Cells were resuspended and cultured in L-DMEM (5,5 mmol/L glucose) medium supplemented with 20% FCS. Adherent cells were expanded in the same medium and then used for characterization and endocrine differentiation. Cell characterization was performed in a FACS Calibur equipment with anti-CD29, CD73, CD90, CD105, CD166, CD14, CD31, CD34 and CD45 antibodies (all Abcam PLC, Cambridge, UK). Cells were also induced to differentiate into adipocytic and osteocytic lineages using established protocols, followed by cytochemistry analysis.² *MSC differentiation*: induction of MSCs into a pancreatic endocrine phenotype was carried out essentially as described by Tang et al (2004).³ Briefly, MSCs were cultured during 2 to 4 months in H-DMEM (23 mmol/L glucose) + 10% FCS until the

appearance of cell clusters. Media was then changed to L-DMEM (5,5 mmol/L glucose) + 5% FCS + 10 mM nicotinamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) + 1 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen Co, Carlsbad, USA) for 7 days. In the last 7 days cells were cultured with the same media added of 10 nM exendin-4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Immunofluorescence: cells from isolated clusters were disaggregated with trypsin, adhered onto glass slides, fixed with 4% PFA, permeabilized with 1% Triton, incubated for 2h with primary antibodies against insulin, glucagon and somatostatin and PDX-1 (all from Abcam PLC, Cambridge, UK), followed by secondary FITC conjugated antibody (Abcam PLC, Cambridge, UK). Nuclei were stained with DAPI. Slides were examined on a Nikon Eclipse E600 microscope.

Results

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

Discussion

Mesenchymal stem cells from human umbilical cord vein are an interesting source for the generation of cells with β -cell properties, due to its ease of isolation, expansion and differentiation capacity, besides relative acceptance of the ethical point of view. The umbilical cord are collected at the moment of birth without offering any risk to both mother and child.

Although advances have been achieved in the last few years, some difficulties persist, mostly due to incomplete differentiation and low levels of insulin production by these cells.

In this work we intended to isolate MSC from the human umbilical cord vein and promote its *in vitro* expansion and differentiation into cells with a pancreatic endocrine phenotype. We used a very simple protocol that has already been employed with success to promote the differentiation of rat bone marrow MSC into insulin-producing cells. In our conditions, after 2 months treatment the MSC cultures began to form cell clusters and acquire an islet-like morphology. After 4 months treatment the cells were able to produce the hormones somatostatin and glucagon, and also to express the pancreatic transcription factor PDX-1, as confirmed by immunofluorescence microscopy. However, differentiation into a β -cell phenotype was incomplete as insulin was not produced, showing that the protocol employed with these cells still needs some improvements.

References

1. Di Gioacchino G, Di Campli C, Zocco MA, et al. Transdifferentiation of stem cells in pancreatic cells: state of the art. *Transplant Proc* 2005; 37(6):2662-3.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-7.
3. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, et al. *In vivo* and *in vitro* characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 2004; 53(7):1721-32.

Figure 1. Photomicrography of differentiation stages of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells. Panel A: untreated cells after 3 weeks culture. Panel B: the same culture after 4 months in differentiation media supplemented with nicotinamide, 2-mercaptoethanol and exendin-4. (100X)

