

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Efeito do Co-transplante de Ilhotas Pancreáticas e Células-tronco Mesenquimais
no Tratamento do Diabetes Mellitus em Modelo Murino**

Isabel Cristina Giehl

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Nance Beyer Nardi

Porto Alegre, novembro de 2011.

Instituições envolvidas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Imunogenética, Porto Alegre, RS, Brasil.

Fontes financiadoras

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS

Agradecimentos

É sábado à noite, a dissertação não está finalizada, muito menos entregue. Porém, a inspiração acabou e decidi fazer algo cuja fluidez estaria garantida: agradecer. Minha lista de agradecimentos é longa, o que faz de mim alguém de muita sorte.

Sempre tive o hábito de deixar o melhor para o final, mas, desta vez, será diferente. Início agradecendo às pessoas mais importantes da minha vida: minha família.

À minha mãe, Marlise, pessoa maravilhosa, que me ensinou o significado genuíno das palavras coragem e amor. Obrigada por reunir todas as forças existentes para enfrentar os obstáculos e seguir junto de nós. Pelo amor e carinho infinitos e por acreditar que a tua filha realmente é um “cabeção”! Pelo *delivery* de frutinhas e chimarrão no quarto. Pela paciência durante minha TPM (tensão pré-mestrado). Pelo companheirismo.

Ao meu pai, Mário, a quem eu admiro muito, e que me ensinou o que é dignidade. Exemplo de força, sempre mostrou que nunca é tarde para aprender e tentar algo novo, sempre trabalhando da forma mais honesta. Obrigada pelo amor incondicional, pela compreensão e por ficar ansioso com essa profissão instável, sempre tentando me arranjar um emprego “de verdade”! (rs!) Pelo churrasco de domingo. Por cuidar de todos nós.

Ao meu irmão, Leonardo, guri de ouro, por ter sido sempre meu grande amigo e por acreditar no meu potencial. Obrigada pelo amor, pela parceria, pelo exemplo de perseverança e por ter ido correndo comprar um teclado com entrada USB, quando os meus dedos estavam prestes a cair por escrever a dissertação no note! É deste rapaz também o mérito de ter me dado a irmã que eu não tive. Géó, cunhadinha, te adoro muito! Obrigada pelos 8 anos de amizade e carinho.

Mãe, pai, Léo e Géó vocês foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Essa conquista é tanto de vocês, quanto minha. Vocês são uma família maravilhosa. Eu admiro e AMO MUITO VOCÊS!

Às minhas queridas Dinda, Tia Meme, Tia Nica e Marisa e, pelo amor, carinho, apoio e dedicação. Às amadas Paula e Manu, nossa grande alegria do momento, por terem despertado tanto amor e tanta esperança!

À Rosi, que é praticamente parte da família, agradeço pela dedicação, pelo respeito e pelo carinho com nossa família, em especial, com a mãe.

Por falar em família, agradeço àquele que foi muito mais do que um irmão, um amigo, um colega de Lab, ou um orientador. Pedro Chagastelles (mano), “gratidão” não descreve a milésima parte do que sinto quando penso em tudo que tu fizeste por mim. Este foi um trabalho realizado com quatro mãos, dois cérebros e muito, mas muuuito empenho. Ainda bem que tínhamos a Tia Bete (diabetes), a Cássia Eller (KCI) e a Whitney Houston (teste de Wilcoxon-Mann-Whitney) pra nos animarem. (Melhor não lembrar da sala do chucrute no biotério, da subidinha muda, ofegante e faminta até a Biotec para usar a centrífuga, das faltas de luz surpresaaaaa no campus em dia de transplante, do banho histológico = bacia+vasilha+rabo-quente, etc.). Mil vezes obrigada!!! Antes que o carpideirismo se estabeleça, o que é bastante provável, termino agradecendo pela tua amizade. Te adoro MUITO, Pedro!

Agradeço ao Ricardo Hegenbart pela compreensão com nossos atrasos e com minhas invasões de privacidade em plenos finais de semana na casa de vocês, pelas visitas ao Lab e pelo empréstimo da máquina super-ultra-mega moderna, seu instrumento de trabalho. Obrigada pelo carinho, pela amizade e por saber que é só me apertar para me fazer chorar. Te adoro, Rico!

Seguindo a linhagem dos trigêmeos da espermateca, agradeço à menor, mais elástica e mais tagarela dos três, Larissa Heinzelmann. Mana, Louise, Michelle, Barbie, Samara, Fiona, obrigada por ter me avisado sobre o brometo na esponja da Biotec (ui!). Naquele momento, eu nem imaginava o presente que eu estava recebendo: o início de uma amizade maravilhosa. Agradeço pelo carinho, pelas risadas, pelas lágrimas, pela confiança, pelos ouvidos, pelo brilho nos olhos e por me fazer acreditar que ainda existe gente boa nesse mundo. E fizeste isso, apenas sendo quem és. Obrigada também por ter me mostrado que o mestrado não é a coisa mais importante do mundo. Love you!

“Paula Rohr, tu não existe!” Perdi a conta de quantas vezes disse essa frase nos últimos tempos... E não falo só (só???) da ajuda como fotógrafa oficial do nosso *making of*, como estatística dos meus resultados, mesmo com a barriga roncando de fome, às 8h da noite no Lab, como captadora das imagens no microscópio (não sem antes passar uma meia hora tentando limpá-lo!), ou como desenvolvedora de sumários até às 3:30h da manhã de uma terça-feira (essa bateu os records!). Falo do telefonema perguntando se está tudo bem, do interesse nos momentos difíceis pelos quais passei, da compreensão, e é

claro, das risadas e opiniões compartilhadas. Se existe alguém que merece o “prêmio revelação amizade ‘na boa e na ruim’ 2011”, esta pessoa é tu! Te adoro, Paulete!!!

À minha orientadora, Nance Beyer Nardi, agradeço por ter-me aberto as portas do Lab, pelos 6 anos de trabalho e conhecimento, e pela compreensão e flexibilidade com que lidou com minhas dificuldades. Também sou grata pela confiança que me foi depositada, quando optei por trocar de projeto de mestrado. Muito obrigada!

Agradeço a todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Imunogenética: Aos queridos colegas de cultura Tiago Dalberto, Bruno Bellagamba (abridor oficial de tampas) e Raquel (baita PNC... te adoro!), aos meus ex-futuros maridos lindos Kadu e Bruno Paiva, à queridice mimosa da Gabi e da Diny, à tranquilidade e à simpatia da FeRa e da Nayê, à irreverência cativante da Francis, à sabedoria e amizade da Pri Vianna, à turminha do bem de Fêzis, Jú, Mau, Camila e Tássia, ao sorriso da Mona Lisa da Camile, à peruana mais querida do Lab, Jacque, à futura mestranda, Vivian, à Pietra, à Cintia e ao Tiago Veit. Também aos ex-colegas Gui, Marcitcha e Pri Machado. Aos queridos colegas do anexo chique do Lab, o Laboratório de Bioinformática, em especial o Gustavo, pela mega parceria para shows e boas conversas, Maurício e Dinler, sempre dispostos a dar uma força com as “coisas de computador” e trazendo o chimas pro “lado de cá” do Lab, e a Meg, minha digitalizadora oficial de documentos (obrigada!). Finalmente, agradeço ao *boss* do Lab, José Artur Bogo Chies, o Zéca, pela disponibilidade para me ajudar, sempre que precisei.

Agradeço especialmente à querida ex-colega (ou, quem sabe, futura?! tomara!), Patrícia Sesterheim, pela doçura, amizade e competência. Patty, bem sabes o quanto tu nos ajudaste. Meu primeiro contato com isolamento de ilhotas foi junto do Pedro e de ti. E o *upgrade* de qualidade, velocidade e diversão que tivemos, quando participaste dos nossos transplantes?! Todos os sanduíches do mundo não são suficientes para agradecer. Te adoro muito, amiga!

Elvira Cordero, minha amiga peruana preferida, companheira de quarto em congressos e de Yoga no Parcão. Se não fosse por ti, estávamos perdidos! Quantas alíquotas de tripsina nos foram emprestadas... E a centrífuga refrigerada? Até no sábado! Muito obrigada por tudo, Elvis!!! Estou feliz por saber que vais entrar pra turma das ilhotas.

Gostaria de agradecer aos professores Vera Gaiety, Diego Bonatto e Guido Lenz por terem disponibilizado seus laboratórios e equipamentos (lupa, centrífuga e microscópio de fluorescência), à aluna Raquel Becker, do Instituto de Química, pelo empréstimo da seringa Hamilton, e ao Departamento de Bioquímica, onde foram realizados os cortes histológicos.

Ao longo de todo mestrado, eu disse várias vezes a frase “Elmo, teu agradecimento especial na minha dissertação está garantido!”, na secretaria do PPGBM. Isso já diz muita coisa... Elmo Cardoso, muito obrigada por toda ajuda e por teres participado das tensões e alegrias dessa caminhada!

Agradeço ao PPGBM, pela acolhida, e ao CNPq e à FAPERGS, pelo apoio financeiro, que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos de Graduação, em especial ao Bobs, que é a prova de que existe amizade verdadeira entre homem e mulher, à Déa, minha amiga gringa mais divertida que, mesmo distante, se faz sempre presente e me dá muito carinho e muita força, à Lari, figurinha engraçada e queridíssima, e à Milena, que se mostra cada dia mais leal e amiga. Vocês dividiram momentos muito bons e também muito difíceis comigo, e sou muito grata pela amizade preciosa de vocês.

Aos meus “amigos psicodélicos”, Renata Maria, Mari e Rodrigo, obrigada por terem vivido a alegria de participar do Teto Lírico comigo, e, principalmente, por terem continuado fazendo parte da minha vida, mesmo sem o vocal. Eu adoro muito vocês!

Ao meu professor de pilates e amigo, Marcelo Guaragna, por me colocar nos eixos, pelas longas conversas, pelo carinho e pela amizade.

Por fim, agradeço às minhas fiéis escudeiras, amigas de todas as horas, Xexels e Cia Ltda.[®]. Manô, Méry, Mare e Paula Dentro, a nossa amizade é um privilégio! Eu AMO vocês!!! AMUNJASEVÊ!

Sumário

Lista de abreviaturas	9
Resumo	12
Abstract.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. DIABETES MELLITUS	14
1.1.1. Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1).....	14
1.1.2. Diabetes Mellitus tipo 2.....	18
1.1.3. Complicações Crônicas	19
1.1.4. Epidemiologia.....	20
1.1.5. O pâncreas e as ilhotas pancreáticas.....	21
1.1.6. tratamentos para o DM	22
1.2. CÉLULAS-TRONCO	27
1.2.1. As células-tronco mesenquimais (MSC).....	28
1.2.2. Terapia celular para o DM.....	32
1.2.3. Efeito parácrino das células-tronco mesenquimais no DM.....	34
1.2.4. Dificuldades do transplante de ilhotas pancreáticas e uma possível solução: o co-transplante com MSC	35
2. OBJETIVOS	41
2.1. OBJETIVOS GERAIS	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3. JUSTIFICATIVA	42
4. METODOLOGIA.....	43
4.1. ANIMAIS	43
4.2. ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MURINAS ADIPOSEO DERIVADAS.....	44
4.2.1. Estabelecimento do cultivo de ADSC	44
4.2.2. Caracterização das ADSC	45
4.2.2.1. <i>Análise morfológica qualitativa das ADSC</i>	45
4.2.2.2. <i>Análise imufenotípica das ADSC por citometria de fluxo</i>	45
4.2.2.3. <i>Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica das ADSC in vitro</i>	46
4.3. DO DIABETES AO TRANSPLANTE.....	46
4.3.1. Indução do diabetes	46

4.3.2. Isolamento de Ilhotas.....	47
4.3.3. Transplante	48
4.3.4. Avaliação da função do transplante.....	49
4.3.5. Imuno-histoquímica.....	50
4.3.6. Análise estatística	51
5. RESULTADOS	52
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS ADSC	52
5.1.1. Análise imunofenotípica por citometria de fluxo.....	52
5.1.2. Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica <i>in vitro</i>	53
5.2. INDUÇÃO DO MODELO DE DIABETES	54
5.3. ANÁLISE DA FUNÇÃO DO TRANSPLANTE.....	55
6. DISCUSSÃO	61
7. REFERÊNCIAS	69

Lista de abreviaturas

- ADP – *Adenosine diphosphate*
- ADSC – *Adipose-derived stem cells*
- AHSCT – *Autologous hematopoietic stem cell transplantation*
- Ang-1 – *Angiopoietin-1*
- ANOVA – *Análise de variância*
- ATP – *Adenosine triphosphate*
- bFGF – *Basic fibroblast growth factor*
- CAM – *Cell adhesion molecule*
- CCR – *C-C chemokine receptor*
- CD – *Cluster of differentiation*
- CPI – *Células produtoras de insulina*
- CVB4 – *Coxsackievirus B4*
- CXCR – *C-X-C chemokine receptor*
- CXCL – *C-X-C chemokine ligand*
- CX3CR1 – *CX3C chemokine receptor 1*
- CX3CL1 – *CX3C chemokine ligand 1*
- DM – *Diabetes mellitus*
- DM1 – *Diabetes mellitus tipo 1*
- DM2 – *Diabetes mellitus tipo 2*
- DMEM - *Dulbecco's modified eagle medium*
- DNA – *Deoxyribonucleic acid*
- EMC – *Encefalomiocardite*
- FGF4 – *Fibroblast growth factor 4*
- FITC – *Fluorescein isothiocyanate*
- FoxP3 – *Forkhead box P3*
- GAD – *Glutamic acid decarboxylase*
- GLUT4 – *Glucose transporter type 4*
- GFP – *Green fluorescent protein*
- GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
- GVHD – *Graft-versus-host disease*

HBSS – *Hank's buffered salt solution*
HDL – *High-density lipoprotein*
HE – *Hematoxilina-Eosina*
HGF – *Hepatocyte growth factor*
HLA – *Human leucocitary antigen*
HSC – *Hematopoietic stem cells*
IAA – *Insulin autoantibody*
IA2 – *Insulinoma Ag2*
IA-2AA – *anticorpo anti-proteína tirosino-fosfatase IA2*
IBMIR – *Instant blood-mediated inflammatory response*
ICA – *Islet cell antibody*
IFN – *Interferon*
IGF – *Insulin-like growth factor*
IL – *Interleucina*
IP – *Intraperitoneal*
iPS – *Induced pluripotent stem (cell)*
MC – *Meio completo*
MCP-1 – *Monocyte chemotactic protein-1*
MMP – *Matrix metalloproteinases*
MSC – *Mesenchymal stem cells*
NCAM – *Neural cell adhesion molecule*
NK – *Natural killer*
NOD – *non-obese diabetic*
Nodal – *Nodal homolog (camundongo)*
NT – *Nefrectomia*
OKT3 – *Anticorpo monoclonal anti-CD3*
O/N – *Overnight*
P1 (P2, P3,...) – *Passagem celular 1*
PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns*
PBS – *Phosphate buffered saline*
PDGF – *Platelet-derived growth factor*
PE – *Phycoerythrin*

PP – Polipeptídeo pancreático
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute (medium)*
SCF – *Stem cell factor*
SFB – Soro fetal bovino
SIRT1 – Desacetilase de histona Sirtuina 1
STZ – *Streptozotocin*
TA – Temperatura ambiente
TGF- β – *Transforming growth factor- β*
Th1 – *T helper cell 1*
Th2 – *T helper cell 2*
TLR – *Toll-like receptor*
TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*
UTF-1 – *Undifferentiated embryonic cell transcription factor-1*
VEGF-A – *Vascular endothelial growth factor-A*

Resumo

O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença autoimune causada pela destruição das células β produtoras de insulina, presentes nas ilhotas pancreáticas, por células autorreativas do sistema imune. A opção de tratamento mais utilizada são injeções diárias de insulina exógena, o que configura um tratamento não curativo. Para alcançar a independência de insulina, alternativas como o transplante de ilhotas vêm sendo estudadas. Entretanto, a disponibilidade de pâncreas de doadores cadavéricos para o isolamento destas ilhotas é pequena e os métodos de isolamento, pouco eficazes, sendo necessários de 2 a 4 doadores para atingir o número adequado de ilhotas. Além disso, o transplante apresenta problemas relacionados à enxertia, devidos principalmente à baixa vascularização, o que leva à morte de células β nos primeiros dias pós-transplante. Desta forma, estudos explorando alternativas que aumentem a sobrevivência e a funcionalidade dos transplantes e diminuam o número de ilhotas exigido por receptor fazem-se muito necessários. As células-tronco mesenquimais apresentam propriedades interessantes para aplicação em terapia celular. Entre elas, destaca-se o efeito parácrino, que exerce diversas funções benéficas, como o aumento da vascularização, nos locais onde estas células estão presentes. Sendo assim, este trabalho explorou o co-transplante de ilhotas pancreáticas com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, para o tratamento do diabetes mellitus em modelo murino. Os resultados mostraram que a presença destas células no grupo que recebeu o co-transplante não aumentou a taxa de cura, em relação ao grupo que recebeu somente ilhotas. No entanto, o fenômeno de reversão do diabetes foi antecipado no grupo co-transplantado, o que sugere um possível efeito angiogênico das células-tronco adiposo-derivadas presentes neste grupo. Desta forma, conclui-se que estas células podem exercer atividades benéficas, quando co-transplantadas com ilhotas pancreáticas, para o tratamento do diabetes.

Palavras-chave: diabetes, ilhotas pancreáticas, células-tronco mesenquimais, transplante.

Abstract

Type 1 diabetes mellitus is an autoimmune disease caused by destruction of insulin-producing β cells, present in pancreatic islets, by auto-reactive cells of the immune system. The most widely used treatment option are daily injections of insulin, which configures a non-curative treatment. To achieve insulin independence, alternatives such as islet transplantation have been studied. However, the availability of pancreas from cadaveric donors for the isolation of these islets is poor and the methods for isolation, ineffective, requiring 2 to 4 donors to achieve the appropriate number of islets. In addition, transplantation presents problems related to engraftment, mainly due to poor vascularization, which leads to β cell death in the first days after transplantation. Thus, studies exploring alternatives that increase the survival and function of transplants and reduce the number of islets required by the recipient are very necessary. Mesenchymal stem cells have interesting properties for application in cell therapy. Among them is the paracrine effect, which has several beneficial functions, such as promoting vascularization in the tissues where these cells are present. Thus, the present study explored the co-transplantation of pancreatic islets with mesenchymal stem cells derived from adipose tissue for the treatment of diabetes mellitus in mice. The results showed that the presence of these cells in the group that received co-transplantation did not increase the cure rate, compared to the group that received islets alone. However, the phenomenon of diabetes reversion was anticipated in co-transplanted animals, which suggests a possible angiogenic effect of adipose-derived stem cells present in this group. Thus, we conclude that these cells may exert beneficial functions when co-transplanted with pancreatic islets for the treatment of diabetes.

Keywords: diabetes, pancreatic islets, mesenchymal stem cells, transplantation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DIABETES MELLITUS

O Diabetes mellitus (DM) compreende um conjunto de doenças metabólicas, heterogêneo do ponto de vista etiológico e clínico, mas tendo altos níveis de glicose no sangue como característica comum, além de distúrbios do metabolismo dos lipídios e proteínas, resultantes de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A hiperglicemia crônica é causada pela não produção, produção insuficiente, ou falta de resposta periférica à insulina fabricada nas ilhotas de Langerhans do pâncreas (*American Diabetes Association, 2011*).

A homeostase da glicemia é regulada principalmente pela ação oposta dos hormônios insulina e glucagon, secretados nas ilhotas pancreáticas pelas células β e α , respectivamente. A secreção de insulina é aumentada em resposta à elevada quantidade de glicose circulante, para manter a normoglicemia. Esta se dá através do estímulo à captação de glicose pelas células musculares e adipócitos e reduzindo a produção de glicose pelo fígado através da inibição da gliconeogênese (Bansal & Wang, 2008). Em contrapartida, a secreção de glucagon é suprimida pela hiperglicemia e estimulada em momentos de hipoglicemia, promovendo a produção hepática de glicose, e, conseqüentemente aumentando os níveis sanguíneos deste açúcar (Taborsky, 2010). Sendo assim, esses dois hormônios possuem um papel fundamental na regulação dos níveis de glicose sanguíneos, e qualquer desequilíbrio entre eles pode levar ao desenvolvimento do diabetes.

O diabetes pode ser classificado em quatro grandes categorias: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes gestacional e “outros tipos de diabetes” (*American Diabetes Association, 2011*).

1.1.1. Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)

Muitas vezes designado de diabetes insulino-dependente, diabetes imunomodulado, ou diabetes juvenil, o diabetes mellitus tipo 1 é uma síndrome autoimune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva de células β produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas (Liu & Eisenbarth, 2002). Estas células passam a produzir pouca

ou nenhuma insulina. A doença pode afetar indivíduos de qualquer idade, mas geralmente acomete crianças e jovens adultos, antes dos 20 anos de idade, sendo um dos problemas endócrinos e metabólicos mais comuns na infância. Atinge cerca de 0,3% da população caucasiana, com pico de início da doença entre os 11 e 12 anos de idade. A instalação clínica é, geralmente, abrupta e com quadro clínico de cetoacidose, devido à falta absoluta de insulina (Liu & Eisenbarth, 2002; Milech & Oliveira, 2004). Sendo assim, a maioria dos pacientes depende de injeções diárias de insulina exógena para sobreviver, mantendo a glicemia próxima a níveis normais, embora, a longo prazo, possam desenvolver complicações crônicas relacionadas à hiperglicemia e ao uso de insulina (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, 2003).

Atualmente, 5 a 10% dos casos de diabetes diagnosticados são classificados como sendo do tipo 1. No entanto, a incidência de DM1 está aumentando, provavelmente devido a mudanças nos fatores ambientais de risco, como idade avançada da mãe no parto, alguns aspectos alimentares como controle rigoroso da dieta na infância e exposição a infecções virais e toxinas. Estes elementos, combinados a possíveis fatores genéticos predisponentes, podem desencadear reações autoimunes ou acelerar um processo de destruição de células β que já esteja ocorrendo (*American Diabetes Association*, 2011).

A simples observação de que a prevalência da doença é mais alta entre os familiares de indivíduos afetados do que na população geral sugere a importância de fatores genéticos no seu estabelecimento. Risco aumentado é observado em parentes de primeiro grau de uma pessoa afetada pela doença. Porém, 85% dos casos novos não contemplam tal linhagem familiar (Kulmala, 2003). Sendo assim, pode-se afirmar que o DM1 se caracteriza como uma doença multifatorial dependente da complexa interação entre fatores genéticos predisponentes, resposta imunológica, e influência do meio-ambiente na ativação de mecanismos predominantemente celulares contra células β produtoras de insulina (Milech & Oliveira, 2004; Devendra *et al.*, 2004).

Os sintomas da doença incluem aumento do volume e número de micções (poliúria), sede em demasia (polidipsia), fome constante, perda de peso, visão turva e fadiga (*World Health Organization*, 2011). Estes sintomas aparecem em um curto espaço de tempo, o que leva muitos a caracterizarem o DM1 como uma doença de rápido estabelecimento. Sabe-se, entretanto, que o DM1 é uma doença silenciosa. Ao contrário do que se admitia previamente, a evolução da doença não é aguda e sim um processo de

destruição lenta, que possivelmente ocorre durante anos numa fase pré-clínica. No período de manifestação da doença, com a ocorrência de hiperglicemia e cetoacidose, as células β secretoras de insulina já estão em número muito reduzido, ou praticamente ausentes (Balda & Pacheco, 1999).

A presença de infiltrado inflamatório, configurando um processo de autoimunidade, e a ausência de células β viáveis caracterizam o quadro histológico do DM1 (Balda & Pacheco, 1999). A análise do pâncreas de pacientes cadavéricos com diagnóstico recente de DM1 mostrou que os linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$), seguidos pelos macrófagos ($CD68^+$), são os tipos celulares mais frequentes no infiltrado inflamatório próximo às ilhotas pancreáticas (insulite), em comparação com a baixa frequência de linfócitos T auxiliares ($CD4^+$), linfócitos B ($CD20^+$) e plasmócitos ($CD138^+$). Células *natural killer* ($CD56^+$) e células T regulatórias ($FoxP3^+$) raramente foram encontradas. Estes dados sugerem uma sequência definida no recrutamento de células do sistema imune no estabelecimento do DM1, na qual tanto as células T citotóxicas ($CD8^+$), quanto os macrófagos, contribuem para a morte de células β , no início do processo de insulite. Já as células B ($CD20^+$) são recrutadas em estágios mais tardios do processo, indicando um ganho de importância ao longo do desenvolvimento da inflamação (Willcox *et al.*, 2009).

Buschard (2011) afirma que o diabetes mellitus tipo 1 é uma doença dependente de células T e, se este tipo celular é inativado de alguma forma, o DM1 não se desenvolve. Em estudo realizado pela mesma autora, avaliou-se experimentalmente o efeito diabetogênico do vírus da encefalomiocardite (EMC) em camundongos Balb/c normais, em comparação com *nude* (atímicos). Após a inoculação do vírus da EMC, 36% dos camundongos normais tornaram-se diabéticos, enquanto que, no grupo dos animais atímicos, nenhum camundongo desenvolveu a doença. Dessa forma, foi demonstrada a importância da parcela timo-dependente do sistema imune no desenvolvimento do DM1, neste modelo animal (Buschard, 1983).

Outra abordagem de estudos destaca a associação entre o enterovírus Coxsackievirus B4 (CVB4) e o DM1. Brilot & Geenen (2005) realizaram experimentos *in vitro* com células do epitélio tímico e concluíram que a infecção dos timócitos por CVB4 poderia induzir uma disfunção do timo, levando à redução da autotolerância a antígenos das células β , com o consequente desenvolvimento de diabetes. Já Dotta e colaboradores

(2007) procuraram relacionar o quadro de DM1 de doadores de órgãos com a infecção das ilhotas pancreáticas pelo mesmo vírus, o CVB4. Foi observado que metade dos indivíduos diabéticos analisados tinha a presença do vírus nas amostras de tecido pancreático estudadas, enquanto que, no grupo controle, nenhum indivíduo continha o CVB4. Constatou-se que a infecção restringia-se às células β pancreáticas e que estas tinham sua capacidade de secretar insulina em resposta à presença de glicose bastante reduzida, o que corrobora com a evidência de que a infecção das células β pelo CVB4 está associada com o desenvolvimento do DM1.

Outras infecções virais ou bacterianas estão associadas à predisposição ou proteção ao DM1 (Salminen *et al.*, 2003; Goldberg & Krause, 2009). Entretanto, existem vários resultados conflitantes na literatura, e o mecanismo através do qual ocorrem estes efeitos variados ainda não foi validado (revisado por Goldberg & Krause, 2009).

A liberação local de citocinas pró-inflamatórias decorrentes de infecção viral constitui um fator importante na perda da tolerância aos antígenos das células β e na ativação de linfócitos autorreativos. A associação entre os processos de inflamação e autoimunidade tem sido extensamente ligada à ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas no local da lesão. Estas, por sua vez, são capazes de recrutar e ativar células apresentadoras de antígenos e linfócitos T autorreativos, o que perpetua o processo de autoimunidade nas ilhotas (Obayashi *et al.*, 2000).

Uma hipótese alternativa para explicar um processo autoimune desencadeado por patógenos denomina-se “mimetismo molecular”, que ocorre por uma semelhança de sequência entre proteínas presentes nas ilhotas e peptídeos encontrados nos patógenos (van der Werf *et al.*, 2007). No caso descrito por Honeyman e colaboradores (2010), a similaridade ocorre entre peptídeos da proteína VP7 do rotavírus e proteínas tirosino fosfatases associadas ao insulinoma Ag2 (IA2) e à descarboxilase do ácido glutâmico 65 (GAD65, *glutamic acid decarboxylase 65*).

A autoimunidade contra ilhotas pancreáticas foi inicialmente descrita em 1965, mas a presença de anticorpos contra células das ilhotas (ICA, *islet cells antibody*) em pacientes diabéticos só foi demonstrada em 1974 (Zhang *et al.*, 2008). Em seguida, a existência de vários outros anticorpos foi identificada, entre os quais destacam-se anti-insulina (IAA, *insulin autoantibody*), anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD,

glutamic acid decarboxylase), anti-proteína tirosino-fosfatase IA2 (IA-2AA) e anti-transportador de Zinco (Maraschin *et al.*, 2010).

A presença de autoanticorpos pode ser detectada na maioria dos pacientes com DM1, mesmo antes da manifestação de sintomas clínicos e do diagnóstico da doença. Estas imunoglobulinas são consideradas bons marcadores para o prognóstico do DM1. Em crianças em fase inicial da doença, o primeiro a ser produzido é o IAA. Já em adolescentes e adultos, o anti-GAD é mais freqüente. O IA2 e o anti-transportador de Zinco possuem correlação com o progresso da doença. Quanto maiores a variedade e a titulação dos anticorpos nos pacientes, mais decisivo torna-se o desenvolvimento do DM1, já que, durante a história natural da doença, amplia-se a resposta de células T contra uma quantidade maior de epítopos das células β , mecanismo batizado de “expansão antigênica” (Buschard, 2011).

1.1.2. Diabetes Mellitus tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 é a forma predominante de diabetes, abrangendo mais de 90% de todos os casos da enfermidade. Ocorre principalmente em adultos, acima dos 40 anos, e está diretamente relacionada com predisposição genética, componentes inflamatórios e determinantes ambientais como obesidade, hábitos alimentares e sedentarismo (Kolb & Mandrup-Poulsen, 2005; Zimet *et al.*, 2001). Usualmente, caracteriza-se pela combinação de resistência à insulina, pela diminuição da habilidade do hormônio em promover a captação da glicose circulante pelos tecidos periféricos, associada a graus variados de deficiência na secreção de insulina pelas células β (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, 2003).

A resistência à ação da insulina tem papel fundamental no aparecimento da chamada “síndrome metabólica”. Nela, ocorre um bloqueio intracelular pós-receptor na sinalização da insulina, em células dos tecidos periféricos dependentes de insulina. Este defeito impede a transativação do GLUT 4 e, conseqüentemente, a entrada da glicose para o interior da célula. Isso faz com que maiores quantidades de insulina sejam secretadas pelas células β pancreáticas, criando um estado de hiperinsulinemia compensatória, que, durante certo tempo, consegue manter a glicemia em níveis normais, mas acaba determinando importantes alterações em todo organismo. A mais conhecida é a deposição

centrípeta da gordura corporal, conhecida como obesidade central ou visceral, na qual ocorre grande aumento da gordura abdominal, em detrimento dos membros. Outros efeitos incluem o aumento da pressão arterial e dos níveis séricos de triglicerídeos e redução dos valores do colesterol HDL, com ou sem hiperglicemia. A presença de três ou mais dessas manifestações caracteriza a síndrome metabólica ou síndrome de resistência insulínica (Tambascia & Geloneze, 2005; Zecchin *et al.*, 2005).

Embora possuam etiologias diferentes, ambos tipos de diabetes têm como característica fisiopatológica comum a perda de massa de células β , porém com maior intensidade no DM1 (Couri & Voltarelli, 2009).

1.1.3. Complicações Crônicas

A longo prazo, quando não controlada, a hiperglicemia leva a sérios danos a células de diversos sistemas do organismo (Donnelly *et al.*, 2000; Morrish *et al.*, 2001). Este dano reflete-se principalmente em células endoteliais da micro e macrovasculatura (Sweet *et al.*, 2009) e em nervos periféricos (*World Health Organization*, 2011). Considera-se, portanto, o DM como um fator de risco para o aparecimento de doenças como nefropatia diabética (Loon, 2003), retinopatia diabética (Conway *et al.*, 2009), cardiopatias (Haffner *et al.*, 1998; Nichols *et al.*, 2001), neuropatias (Dick *et al.*, 2011), insuficiência vascular periférica (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, 2003), entre outras.

Reiss *et al.* (2008) estudaram um grupo de pacientes com insuficiência cardíaca e identificaram que a prevalência de DM neste grupo chegava a quase 20%, em comparação com o percentual de 4 a 6% da população controle. Estudos experimentais e clínicos apontam para a existência de cardiomiopatias especificamente relacionadas ao diabetes, explicadas através das microangiopatias, além de fatores metabólicos e fibroses do miocárdio. Dados da Associação Americana de Diabetes de 2011 apontam as doenças cardiovasculares como a principal causa de morte em pacientes diabéticos, sendo responsável por cerca de 50% das fatalidades (Kim *et al.*, 2008; *American Diabetes Association*, 2011).

Segundo dados do NIDDK (*National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease*, 2011), o DM é a causa mais comum de insuficiência renal, sendo

responsável por quase 44% dos novos casos diagnosticados nos EUA. Mesmo quando controlado, o diabetes pode levar à doença renal crônica e insuficiência renal, sendo os pacientes com DM1 mais propensos a este tipo de doença. Entre 20 e 40% dos pacientes com DM1 apresentam problemas renais aos 50 anos, embora estas complicações possam aparecer antes dos 30 anos.

Informações da mesma instituição afirmam que 60 a 70% das pessoas com diabetes desenvolvem alguma forma de neuropatia (NIDDK, 2011). Pacientes diabéticos podem desenvolver problemas em nervos a qualquer momento, mas o risco aumenta com a idade e o tempo de duração da doença. A maior incidência de neuropatia está em pacientes com diabetes há, pelo menos, 25 anos. A perda de sensibilidade em membros, principalmente nos pés, é um problema grave, já que dificulta a percepção de ferimentos e seu tratamento, levando a infecções mais graves e possíveis amputações

1.1.4. Epidemiologia

O diabetes mellitus é uma doença comum, considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma epidemia. A prevalência mundial fica em torno de 4%, e no Brasil chega a 7,6%, podendo atingir 10% em alguns estados como São Paulo e Rio Grande do Sul (Maraschin *et al.*, 2010).

Dados da Federação Internacional de Diabetes informam que o diabetes afeta atualmente mais de 223 milhões de pessoas no mundo e estimam que a prevalência da doença chegue a 333 milhões em 2025, o que corresponderá a aproximadamente 6,3% da população mundial (*International Diabetes Federation*, 2011). Este aumento deve concentrar-se principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao crescimento e envelhecimento da população, à obesidade, aos hábitos alimentares incorretos e ao sedentarismo. No Brasil, o número estimado de diabéticos em 2000 era de pouco mais de 4,5 milhões. A previsão para 2030 ultrapassa os alarmantes 11 milhões de habitantes com a doença (*World Health Organization*, 2011).

A Federação Internacional de Diabetes desenvolveu o Atlas do Diabetes, com dados de 172 associações, em 132 países. Informações de 2010 mostram que aproximadamente 480 mil crianças (de 0 a 14 anos) têm DM1, nas regiões analisadas. Mais especificamente na América Central e Caribe, a incidência anual de novos casos

diagnosticados é de 5,8 mil, que somam-se às 36,9 mil crianças (de 0 a 14 anos) com DM1 existentes. Também por ano, a estimativa de gastos com DM na região gira em torno de 8,1 bilhões de dólares.

1.1.5. O pâncreas e as ilhotas pancreáticas

O pâncreas é uma glândula mista composta por uma porção exócrina e outra endócrina. A primeira é formada por tecido acinoso, cujas células têm morfologia característica de células secretoras de proteínas. Esta porção é responsável pela produção do chamado suco pancreático, que contém enzimas importantes para o processo digestivo. O órgão é revestido por uma cápsula delicada de tecido conjuntivo que divide a glândula em lóbulos (Junqueira & Carneiro, 1999).

Em 1869, Paul Langerhans descreveu pequenos aglomerados de células no pâncreas, parecidos com microscópicas “ilhas”, as quais, anos mais tarde, passaram a ser chamadas de ilhotas de Langerhans. Em seguida, Kuhne e Lea identificaram nas ilhotas redes de capilares que indicavam uma possível função endócrina. Entretanto, a relação entre o pâncreas e o diabetes só foi comprovada em 1889, quando von Mering e Minkowski retiraram o pâncreas de animais de laboratório e constataram que, sem o órgão, eles passavam a produzir altas quantidades de urina contendo glicose (Ham, 1963). Sendo assim, as ilhotas de Langerhans constituem a porção endócrina do pâncreas, estando distribuídas ao longo de todo órgão.

O número de ilhotas em humanos varia, ficando em torno de um milhão, sendo que cada ilhota possui, em média, 1500 células (Pisania *et al.*, 2010). Estima-se que as ilhotas correspondam a 1-1,5 % do volume do órgão em humanos (Junqueira & Carneiro, 1999).

As ilhotas são compostas por três principais tipos celulares: em humanos, células β , células α e células δ correspondem a aproximadamente 54 %, 35 % e 11 % do total de células das ilhotas, respectivamente. Já em camundongos, as frequências ficam em torno de 75 %, 19 % e 6 %, para os tipos celulares citados acima (Brissova *et al.*, 2005). Em menor número, existem ainda as células PP, que produzem o polipeptídeo pancreático, e as células ν , que produzem grelina. Envolvendo cada ilhota, há uma fina camada de tecido conjuntivo, além de uma rede de capilares sanguíneos que permeia por entre as células.

Com relação à proporção encontrada entre os três tipos celulares, Brissova e colaboradores (2005) afirmam que uma maior heterogeneidade é encontrada em ilhotas humanas. Isto pode refletir-se na chamada massa de células β , que seria a quantidade de células produtoras de insulina que o organismo possui. Outro fator variável é a própria quantidade de ilhotas, diferente em cada organismo. Segundo Buschard (2011), estas duas características combinadas podem configurar um fator predisponente para o DM1. A autora sugere que, quanto menor a quantidade de células produtoras de insulina em um indivíduo, maior é o desgaste de cada célula β individualmente, devido à demanda do hormônio que deve ser atendida. Este estresse, a longo prazo, poderia desencadear a perda de funcionalidade das células β .

Estudos avaliando o padrão de distribuição dos três principais tipos celulares presentes nas ilhotas pancreáticas (β , α e δ) indicam diferenças contrastantes na localização das mesmas entre primatas e roedores. No homem e em primatas não-humanos, os três tipos celulares distribuem-se de forma praticamente homogênea, tendo sido observada uma tendência das células β posicionarem-se na periferia. Já em camundongos e ratos, há uma nítida separação entre as células β , que localizam-se no centro da ilhota, e as células α e δ , presentes em uma camada periférica. (Baetens *et al.*, 1979; Brissova *et al.*, 2005). Esni e colaboradores (1999) atribuem esta distribuição heterogênea das células em murinos a uma diferente expressão de moléculas de adesão célula-célula, como as caderinas e as CAM (*cell adhesion molecule*), entre as células β e as células não- β . Eles demonstraram que, em murinos, os níveis de NCAM (*neural cell adhesion molecule*) das células não- β são duas vezes mais altos que em células β , e que camundongos com heterozigose ou mutação nula para a molécula apresentam células α infiltrando o cerne normalmente composto apenas por células β .

1.1.6. Tratamentos para o DM

Embora as ilhotas pancreáticas tenham sido descobertas em 1869, apenas em 1921 a insulina foi isolada pela primeira vez, por Frederic Banting e Charles Best, no Canadá. A partir de então, muitos métodos para a purificação de extrato pancreático para aplicação terapêutica foram desenvolvidos. A técnica de DNA recombinante e os avanços da biotecnologia permitiram que, em 1978, fosse produzida a primeira proteína humana

recombinante: a insulina. Estas descobertas trouxeram esperança aos pacientes, já que o diabetes passou de uma doença rapidamente fatal a uma doença crônica e tratável.

No tratamento de pacientes com DM2, ênfase é dada à dieta para a perda de peso, associada a um complexo de orientações que visem uma vida “mais saudável”, como exercícios físicos regulares, evitar tabagismo e etilismo, avaliação regular da pressão arterial e lipídeos plasmáticos, além da administração de drogas anti-hiperglicêmicas por via oral ou injeções de insulina, conforme o quadro clínico apresentado.

Já no DM1, o tratamento padrão consiste em injeções diárias de insulina exógena por via subcutânea. São necessárias várias injeções por dia e um controle rigoroso dos níveis de glicose sanguínea nesses pacientes, podendo ocorrer eventos frequentes de hipoglicemia, muitos bastante graves. O tratamento com insulina aumentou muito a expectativa de vida dos pacientes diabéticos. Entretanto, o acompanhamento clínico destes mostrou que, após anos de terapia com insulina, cerca de 10 a 20 anos depois do diagnóstico, a grande maioria passa a apresentar uma série de complicações e doenças. Tendo isso em vista, torna-se claro que, embora as injeções de insulina mantenham os níveis de glicose próximos do normal, existe uma correção de forma flutuante e intermitente, e os níveis médios atingidos ficam aquém do esperado. Sendo assim, o controle glicêmico da insulina injetada não é totalmente eficiente (*American Diabetes Association, 2011*).

A terapia com insulina é o único tratamento disponível para a maioria dos pacientes com DM1, tendo razoável eficácia. Entretanto, é um tratamento não curativo, além de ser considerado incômodo pela maior parte dos pacientes, o que dificulta a adesão ao tratamento. Vias de administração alternativas são estudadas para amenizar este problema, como, por exemplo, a insulina inalável (*Exubera*). Embora com algumas contraindicações, esta é uma ótima alternativa para pacientes com DM1 (*Skyler et al., 2008*).

Com o objetivo de cessar a destruição das células β pelas células do sistema imune, quadro que caracteriza o DM1, muitos trabalhos utilizam abordagens com terapias imunossupressoras ou indução de tolerância (*Ludvigsson et al., 2010*). Vale ressaltar que este tipo de abordagem só é viável em pacientes com diagnóstico recente de DM1, o que, conforme *Voltarelli & Couri (2009)*, é representado por um período menor que seis semanas.

Vários estudos já tentaram alcançar a imunossupressão com efeito prolongado, após terapias de curto prazo com drogas imunomodulatórias. Um dos resultados de maior sucesso foi obtido utilizando-se anticorpos anti-células T, como o OKT3. O objetivo neste caso é atingir as populações de células T que atacam e destroem as células β . Após a terapia, foi observado um aumento nos níveis de peptídeo-C, que é secretado em doses equimolares às de insulina no organismo, e uma redução nas doses diárias de insulina necessárias nos pacientes (Herold *et al.*, 2002; Herold *et al.*, 2005; Keymeulen *et al.*, 2005).

Já os estudos que visam o aumento da tolerância aos autoantígenos, ou seja, tolerização do sistema imune do paciente com DM1 aos antígenos de células β citados anteriormente, como GAD (Ludvigsson *et al.*, 2008) ou insulina (Skyler *et al.*, 2005), envolvem administração de doses orais destes.

O tratamento definitivo para o DM1 seria aquele capaz de corrigir a dependência de insulina exógena e restaurar o padrão fisiológico de secreção deste hormônio. Dentre as estratégias para alcançar estes objetivos, está o transplante de pâncreas e de ilhotas de pancreáticas (*American Diabetes Association*, 2011). O transplante alogeneico de pâncreas é bastante utilizado atualmente, mas ainda apresenta desvantagens como mortalidade perioperatória e significativa morbidade, além da necessidade de administração de drogas imunossupressoras para evitar a rejeição do órgão transplantado. Sendo assim, esta abordagem é recomendada apenas quando associada ao transplante renal, em pacientes com insuficiência renal decorrente do diabetes, e em pacientes com controle metabólico difícil, com crises graves de hipoglicemia (Martins *et al.*, 2010, *American Diabetes Association*, 2011).

Embora controverso, vários estudos confirmam a estabilização ou a melhora de algumas das complicações crônicas do diabetes, e mesmo o ganho em anos de vida para pacientes submetidos ao transplante duplo de pâncreas e rim. Por outro lado, pesquisadores têm demonstrado resultados conflitantes em relação ao transplante isolado de pâncreas, o que reforça a necessidade de uma seleção criteriosa de pacientes para este procedimento. Outro obstáculo a ser superado é a pouca disponibilidade de órgãos, o que limita bastante o número de pacientes beneficiados.

O transplante de ilhotas oferece vantagens, em comparação com o transplante de pâncreas, já que é um procedimento menos invasivo. As ilhotas são isoladas a partir do

pâncreas de doadores cadavéricos e injetadas, por via percutânea, na veia porta, ficando depositadas no fígado. Esse procedimento já foi aprovado como alternativa terapêutica no Canadá, contudo permanece em fase experimental nos demais países (Eliashewitz *et al.*, 2009).

Entre 1974 e 2003, foram realizados 705 transplantes de ilhotas pancreáticas em pacientes com DM1. No entanto, os resultados ainda estão longe do ideal: a taxa de sobrevivência um ano após o transplante é de 97 %, porém apenas 20 % dos pacientes tornam-se independentes de insulina, após o mesmo intervalo de tempo (Bretzel *et al.*, 2004).

Muitos grupos de pesquisa estão empenhados em aumentar a eficácia dos transplantes, para que um número maior de pacientes alcance a independência de insulina. O primeiro estudo com resultados satisfatórios foi realizado por um grupo canadense da Universidade de Alberta, em Edmonton. Sete pacientes com diabetes tipo 1 que apresentavam hipoglicemia severa e instabilidade metabólica foram submetidos ao transplante de ilhotas pancreáticas. Todos os pacientes alcançaram independência de insulina em um ano de acompanhamento, mostrando uma alta taxa de sucesso quando imunossuppressores não glicocorticóides foram usados e um número adequado de ilhotas foi infundido (Shapiro *et al.*, 2000). Ryan e colaboradores (2005) publicaram os resultados do acompanhamento de 65 pacientes que receberam transplante de ilhotas aplicando o Protocolo de Edmonton e mostraram que, após 5 anos, apenas 10 % dos pacientes transplantados permaneciam independentes de insulina.

Um conjunto de fatores deve ser considerado para o sucesso do transplante de ilhotas pancreáticas, como a minimização dos efeitos nocivos decorrentes da preservação e do processamento das células para o transplante, a diminuição dos efeitos tóxicos do uso de imunossuppressores não-esteróides sobre as ilhotas transplantadas, e a padronização da quantidade de material injetado, garantindo a produção de insulina e a restauração da glicemia a longo prazo (Noguchi, 2011).

Embora o transplante de ilhotas venha mostrando resultados animadores, não se pode ignorar os riscos de uma terapia de longo prazo, com uso de imunossuppressores, sendo importante determinar o risco *versus* benefício para os pacientes que irão receber este tipo de tratamento (Stevens *et al.*, 2001; Eliashewitz *et al.*, 2009).

Um problema em potencial, que tem sido debatido recentemente entre os defensores do transplante de ilhotas pancreáticas, é a sensibilização imunológica contra antígenos HLA após este tipo de transplante. Este parece ser um evento comum e põe em risco a possibilidade de transplantes futuros que possam vir a ser necessários, como de pâncreas ou rim (Campbell, *et al.*, 2007).

Além de complicações técnicas, relacionadas à rejeição e à necessidade de administração de imunossuppressores, e financeiras, o principal fator limitante para a ampla aplicação esta terapia é a fonte escassa de doadores e conseqüentemente o número insuficiente de ilhotas pancreáticas (Shapiro *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2001). Ainda são necessários até 4 pâncreas para isolar o número de ilhotas adequado, 10.000 equivalentes de ilhotas (IEs)/kg, para alcançar a independência da insulina em um único paciente diabético (Senior *et al.*, 2007; Figliuzzi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). Ademais, o rendimento, a qualidade e a pureza das ilhotas isoladas são determinados por inúmeras variáveis como a idade, o peso, a glicemia plasmática e a causa da morte do doador, bem como o tempo de isquemia ao qual o órgão foi exposto (Wang *et al.*, 2011).

Entre outras preocupações que envolvem o procedimento, questões éticas devem ser abordadas, uma vez que os pâncreas, potencialmente aptos ao transplante total, são retirados do *pool* escasso de doadores (Figliuzzi *et al.*, 2009). No Brasil, um dos líderes mundiais em transplante total de pâncreas, ainda não há critérios definidos para a alocação dos órgãos para uso em isolamento e transplante de ilhotas pancreáticas (Sá *et al.*, 2011).

Para transpor estes obstáculos, grupos vêm estudando a possibilidade de xenotransplante de ilhotas, com tecido isolado a partir de outras fontes animais. Valdes-Gonzalez e colaboradores (2010) isolaram ilhotas do pâncreas de porcos neonatos e transplantaram em 23 pacientes com DM1. Mais de seis anos após o transplante, embora apenas 50 % dos pacientes tenha alcançado uma redução média de 33 % na dose de insulina administrada diariamente, todos os pacientes atingiram um excelente controle metabólico, com conseqüente redução das complicações crônicas decorrentes da doença.

Melhorias nos protocolos de isolamento para aumentar o rendimento em número de ilhotas, chegando a uma proporção de 1 doador para 1 receptor vêm sendo estudadas (Hering *et al.*, 2005). Matsumoto e colaboradores (2005) relataram sucesso no transplante de ilhotas isoladas através da pancreatectomia distal de um doador vivo, chegando a obter 408.144 equivalentes de ilhotas viáveis no isolamento. Esta parece ser uma alternativa

atraente, já que elimina uma série de fatores que reduzem o rendimento e a qualidade de ilhotas isoladas a partir de doadores cadavéricos, como a exposição prolongada das mesmas a um ambiente isquêmico.

1.2. CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco são, por definição, células capazes de replicar-se dando origem a células-tronco com as mesmas propriedades ou diferenciar-se em, pelo menos, um tipo celular especializado. Estas células podem ser classificadas quanto à origem em células-tronco embrionárias e do adulto. Células-tronco embrionárias são obtidas a partir da massa celular interna de blastocistos pré-implantação na parede uterina, podendo ser mantidas indefinidamente *in vitro* e originar qualquer tipo celular tecido-específico do organismo. Embora tenham características de interesse e diversas aplicações clínicas, existem restrições e problemas técnicos e éticos que limitam o estudo e uso de células-tronco embrionárias humanas (Donovan & Gearhart, 2001).

Para transpor estas dificuldades, muitos grupos vêm pesquisando a produção de células pluripotentes induzidas (iPS), a partir de células somáticas. Estas são reprogramadas através da introdução de uma combinação de fatores de transcrição, como Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc. Desta forma, visando aplicações clínicas, células do próprio paciente podem ser uma fonte interessante para a descoberta de drogas mais eficientes no tratamento de enfermidades ou para terapias incluindo transplante de células (Okita & Yamanaka, 2011).

Células-tronco do adulto possuem uma grande heterogeneidade, com morfologia, nichos e características bastante diversos. Estas células indiferenciadas são responsáveis não só pela reposição de células eliminadas naturalmente pelos tecidos, mas também pela substituição de células perdidas por algum ferimento ou dano tecidual (Walker *et al.*, 2009).

O comportamento das células-tronco *in vivo* está diretamente relacionado ao ambiente onde se encontra, o seu “nicho”. É ele que dá condições para as células-tronco manterem-se indiferenciadas (autorrenovação) ou as disponibiliza para diferenciação, quando necessário. Este processo é mediado pela interação célula-célula, por componentes da matriz extracelular e por fatores solúveis. Alguns tipos de células-tronco do adulto têm

seu nicho melhor descrito, como é o caso da célula-tronco hematopoiética, cujo nicho é a medula óssea, onde as células-tronco mesenquimais desempenham um papel extremamente importante (Nardi & Alfonso, 1999).

1.2.1. As células-tronco mesenquimais (MSC)

Células-tronco mesenquimais (MSC, *mesenchymal stem cells*) são um tipo especial de células-tronco do adulto presentes em todos os órgãos/tecidos do organismo, podendo ser isoladas e aplicadas em abordagens terapêuticas sem as implicações éticas existentes para o uso de células-tronco embrionárias (da Silva Meirelles *et al.*, 2006).

Inicialmente isoladas a partir da medula óssea, as MSC foram estudadas primeiramente por Friedenstein e colaboradores (1970). Nos últimos anos, o número de estudos pré-clínicos e clínicos aplicando estas células tem aumentado exponencialmente (da Silva Meirelles *et al.*, 2008). Pittenger e colaboradores (1999) descreveram uma população de células aderentes que podiam ser expandidas em cultura e dar origem a adipócitos, osteoblastos e condrócitos. Com relação a moléculas de superfície, as MSC são negativas para CD14, CD34 e CD45, e positivas para CD 73 (SH3) e CD105 (SH2).

De acordo com o Comitê de Células-tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular, há três grandes critérios que devem ser obedecidos para definir uma célula-tronco mesenquimal humana. O primeiro critério determina que uma MSC deve ser capaz de aderir ao plástico, quando em condições padronizadas de cultivo. O segundo critério diz respeito a seus marcadores de superfície: CD73, CD90 e CD105 devem ser positivos, e CD14 ou CD11b, CD34, CD45, CD79a ou CD19 e HLA-DR devem ser negativos. O terceiro critério estabelece que uma MSC deve ser capaz de diferenciar-se *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Dominici *et al.*, 2006). Não existe um marcador exclusivo para as MSC, mas algumas moléculas como o Stro-1 permitem o isolamento de um *pool* de células enriquecido nesta população.

Com relação ao comportamento das MSC *in vivo*, estudos recentes demonstraram que elas podem ser isoladas de praticamente qualquer tecido ou órgão, o que sugere uma localização associada a vasos sanguíneos, o “nicho perivascular” (da Silva Meirelles *et al.*, 2006; da Silva Meirelles *et al.*, 2008). Os pericitos são células localizadas na face abluminal de vasos sanguíneos e possuem forte associação com as células endoteliais. Uma

recente revisão de nosso grupo de pesquisa propôs que as MSC e os pericitos possam ser o mesmo tipo celular (da Silva Meirelles *et al.*, 2008). Esta afirmação baseia-se nas similaridades presentes entre ambas, como a presença de proteínas de superfície como Stro-1, nestina, α -actina de músculo liso, CD44, CD90 e CD105.

Outras linhas especulativas sobre a identidade das MSC sugerem que estas células podem ser estreitamente relacionadas aos fibroblastos, com base em características compartilhadas, como fenótipo, habilidade de diferenciação, propriedades imunossupressoras, distribuição ao longo do organismo e capacidade proliferativa (Haniffa *et al.*, 2009). Estudos complementares ainda são necessários para confirmar se elas são realmente o mesmo tipo celular, ou apenas células compartilhando características, porém com funções individuais especializadas. Neste contexto, torna-se extremamente indispensável a caracterização das células, seja em estudos de biologia básica, seja em ensaios pré-clínicos e clínicos.

As MSC são consideradas as células-tronco do adulto com maior potencial para aplicações terapêuticas (Meirelles & Nardi, 2009). Os mecanismos responsáveis por este papel terapêutico ainda não são bem compreendidos, mas existem duas hipóteses distintas: transdiferenciação ou efeito parácrino (Vrijssen *et al.*, 2009).

A origem embrionária das MSC é incerta, mas algumas evidências sugerem que elas derivem dos mesoangioblastos presentes na aorta dorsal embrionária, cuja origem é mesodérmica, o que explicaria a facilidade que estas células possuem para a diferenciação em adipócitos, osteoblastos, condrócitos e miócitos (da Silva Meirelles *et al.*, 2008).

Inúmeros estudos buscam diferenciar as MSC nos mais diversos tipos celulares especializados, *in vitro*, através da combinação de citocinas, fatores de crescimento e biomoléculas (Meirelles & Nardi, 2009). Em alguns casos, o processo de diferenciação pode ser otimizado através de manipulação genética *ex vivo*, com uso de vetores expressando fatores de transcrição específicos para o tipo celular desejado (Karnieli, 2007).

A transdiferenciação de MSC, cuja origem é mesodérmica, em neurônios (origem ectodérmica), ou em hepatócitos ou células β (origem endodérmica), já foi explorada em alguns estudos, mas continua bastante questionável, devido à possibilidade de artefatos técnicos decorrentes dos diversos sistemas de cultivo (Chagastelles *et al.*, 2010). Pode-se citar como exemplo os protocolos para diferenciação de MSC em células produtoras de

insulina, que demonstraram que as células diferenciadas tinham uma capacidade de produzir insulina muito menor que a de células β (Davani *et al.*, 2007), ou que as MSC não foram capazes de diferenciar-se completamente *in vitro* (Karnieli, 2007).

Diversos estudos com modelos pré-clínicos de doenças tratadas com MSC mostraram pouca diferenciação *in vivo* das células transplantadas, o que nos leva a crer que a transdiferenciação não seria o principal mecanismo para justificar as melhoras encontradas após a terapia celular (Nesselmann, 2008). Por outro lado, as MSC produzem um vasto painel de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, com propriedades angiogênicas, imunossupressoras, antiapoptóticas e proliferativas (Schinköthe, 2008). O fator de crescimento de hepatócitos (HGF, *hepatocyte growth factor*) secretado pelas MSC pode ser citado como exemplo, já que induz a proliferação de células-tronco tecido-específicas, como as células-tronco neurais e as células progenitoras endoteliais (Suzuki, 2004). Outros fatores produzidos pelas MSC, como VEGF (*vascular endothelial growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), angiopoietina-2 e FGF4 (*fibroblast growth factor 4*), entre outros, também seriam desencadeadores do processo de angiogênese (Schinköthe, 2008). Sendo assim, muitas evidências sugerem o efeito parácrino como sendo o principal mecanismo responsável pela regeneração tecidual e pelo sucesso dos protocolos terapêuticos utilizando MSC (da Silva Meirelles *et al.*, 2008).

Uma importante propriedade das MSC destacada quando se explora os mecanismos responsáveis por seu potencial terapêutico é a sua habilidade de modular o sistema imune. Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* já buscaram compreender os mecanismos através dos quais as MSC exercem estes efeitos imunossupressores (Nasef, 2008). Estas células não são imunogênicas, podendo ser utilizadas tanto em alotransplantes (indivíduos diferentes, mesma espécie), quanto em xenotransplantes (espécies diferentes), sem problemas de rejeição. As MSC atuam através da inibição da proliferação de populações de linfócitos T e linfócitos B, bem como dificultando a diferenciação, a maturação e o funcionamento de células apresentadoras de antígenos. Além disso, a proliferação e o efeito citotóxico de células NK são inibidos na presença das MSC, enquanto que a geração de células T regulatórias é favorecida (Uccelli, 2008). Estes efeitos são, em sua maioria, desencadeados por fatores solúveis.

As MSC expressam os receptores Toll-like (TLR, *toll-like receptors*), o que as torna sensíveis a compostos microbianos. A família dos TLR evoluiu para detectar

diferentes componentes de patógenos invasores, conhecidos como “padrões moleculares associados a patógenos” (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), e, por consequência, promover a ativação de células do sistema imune. Estes receptores estão divididos em dois grandes grupos, conforme sua localização e o tipo de PAMPs a que se ligam. O primeiro grupo é expresso na superfície das células (TLR1, TLR4, TLR5, entre outros) e reconhece componentes da membrana microbiana. O outro grupo é expresso no compartimento intracelular (TLR3, TLR7, TLR9, entre outros), onde é capaz de reconhecer ácidos nucleicos apresentados de variadas formas. Alguns destes receptores apresentam-se funcionais nas MSC e, quando ativados, modulam o potencial de proliferação, imunossupressão, migração e diferenciação destas células.

Outro parâmetro biológico que influencia o comportamento das MSC é o microambiente inflamatório. Este é desencadeado por dano tecidual, presente em inúmeras condições clínicas às quais as MSC são expostas. No entanto, a exposição das MSC a estes estímulos inflamatórios aumenta a expressão de TLR3 e TLR4, levando a um aumento da responsividade destas células a RNA-dupla fita e lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas, respectivamente. Desta forma, a presença destes antígenos inibe a capacidade das MSC de suprimir linfócitos T CD4+, indicando um mecanismo de modulação da resposta imune, no qual as MSC começam a inibir reações imunológicas em determinado contexto somente depois que a infecção por vírus ou bactérias esteja sob controle (Liotta *et al.*, 2008; Raicevic *et al.*, 2011).

Aggarwal & Pittenger (2005) mostraram a função imunorregulatória *in vitro* das MSC isoladas da medula óssea de humanos, sobre diferentes populações de células do sistema imune. De uma maneira geral, as MSC desempenharam seu papel alterando o padrão de secreção de diversas citocinas, em células envolvidas no processo inflamatório. Essa modificação favorece a liberação de substâncias anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, inibindo citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ . Adicionalmente, as MSC parecem alterar o padrão de resposta de Th1 para Th2. Assim, o transplante de MSC pode ser bastante interessante no tratamento de doenças autoimunes, como substituto de imunossupressores tradicionalmente usados em transplantes de órgãos e na Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GVHD, *graft-versus-host disease*), bem como em processos inflamatórios (Abdi, 2008).

Desta forma, conforme proposto por da Silva Meirelles e colaboradores (2008), podemos concluir que as MSC têm uma localização perivascular, contribuindo para a estabilização de vasos sanguíneos e para a homeostase tecidual. Este modelo propõe que, além da reposição tecidual com MSC, estas células desempenhem um papel mais ativo no reparo de danos teciduais localizados. Neste caso, as MSC secretam citocinas e fatores que controlam a resposta imune para evitar que um processo autoimune se desenvolva. Além disso, elas também estimulam a formação de novos vasos sanguíneos, inibindo a apoptose local e estimulando a proliferação de células-tronco tecido-específicas (Chagastelles *et al.*, 2010).

Muitos estudos fazem uso da terapia com MSC infundidas sistemicamente e concluem que estas células são atraídas até o local da lesão, para então exercer seu efeito parácrino e secretar fatores tróficos. Este processo de *homing* é mediado pela expressão de receptores de quimiocinas pelas MSC, como CCR1, CCR5, CCR7, CXCR4, CXCR6 e CX3CR1, entre muitos outros (Sordi *et al.*, 2005; da Silva Meirelles *et al.*, 2008).

1.2.2. Terapia celular para o DM

Conforme citado anteriormente, a administração de insulina é o único tratamento disponível para a maioria dos pacientes com DM1. No entanto, sabemos que seu efeito é paliativo e que não oferece chances de cura para a doença. Além das alternativas para o tratamento do DM1 citadas anteriormente, como a indução de tolerância, o bloqueio da destruição das células β com anticorpos e os transplantes de pâncreas e ilhotas pancreáticas, a terapia com células-tronco traz possibilidades interessantes no combate à doença.

A terapia celular para o diabetes pode envolver duas abordagens principais: interromper a destruição das células β pelo sistema imune ou gerar novas células produtoras de insulina (CPI).

Visando interromper a destruição de células β pelo sistema imune, o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (AHSCT, *autologous hematopoietic stem cell transplantation*) tem sido empregado com sucesso em pacientes com diagnóstico recente de DM1 (Couri & Voltarelli, 2009). Nesta abordagem, as células-tronco hematopoiéticas (HSC, *hematopoietic stem cell*) do paciente são mobilizadas para a

circulação periférica, coletadas através de um sistema de aférese e criopreservadas. Após o tratamento do paciente com quimioterapia linfoablativa, as HSC são transplantadas. Desta forma, boa parte dos clones de linfócitos do paciente são destruídos, sejam eles auto-reativos ou não, e o sistema imunológico se restabelece a partir das HSC infundidas. Este tipo de terapia vem sendo aplicada a várias doenças autoimunes, entre elas o diabetes, porém com significativas taxas de mortalidade. Ainda assim, há um prolongamento do período de remissão da doença, mais de 3 anos em alguns casos, em 50 % dos pacientes, o que pode ser considerado um sucesso, já que os doentes submetidos a este tipo de terapia geralmente não respondem aos tratamentos convencionais (Voltarelli & Couri, 2009). Em um estudo que mimetiza o AHSCT em camundongos isogênicos, Wen e colaboradores (2008) afirmam que a remissão do diabetes, alcançada através do transplante, vai além de uma imunossupressão transiente. Desta forma, haveria uma remissão prolongada da doença, já que há regeneração da população de células T regulatórias, cuja atividade é deficiente no DM1 (Buschard, 2011).

Tendo em vista que as alternativas expostas acima têm como pré-requisito o diagnóstico recente da doença, o que nem sempre faz parte da realidade dos pacientes diabéticos, devem ser exploradas terapias associadas que interrompam o processo de auto-imunidade, mas que também originem novas CPI. A busca por fontes alternativas de células produtoras de insulina tem sido alvo de muitos estudos, nos últimos anos (Scharfmann, 2003; Borowiak & Melton, 2009). Entre as células comumente empregadas na diferenciação em CPI, podemos citar as células-tronco embrionárias, células-tronco mesenquimais isoladas a partir de diversos tecidos e órgãos, células-tronco pancreáticas e hepáticas (Nir & Dor, 2005; Bonner-Weir & Weir, 2005; Borowiak & Melton, 2009; Wagner *et al.*, 2010).

Estudos vêm destacando o grande potencial de diferenciação das células-tronco pancreáticas em CPI. Estas são isoladas a partir do ducto pancreático e, quando transplantadas em sua forma nativa *in vivo*, demonstraram ser capazes de originar células que expressam insulina, glucagon, somatostatina e PP (Hori, *et al.*, 2008). Já quando expandidas *in vitro*, sobre uma camada de meio gelificado, formam estruturas tridimensionais, capazes de produzir insulina e glucagon (Bonner-Weir, 2000). Além desta, outras abordagens podem ser utilizadas para a diferenciação *in vitro*. Podemos citar como exemplo a utilização de moléculas/fatores solúveis e matrizes extracelulares, na tentativa

de mimetizar *in vitro* o processo de desenvolvimento e diferenciação pancreático, e a manipulação genética das células, utilizando vetores que superexpressem fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação de células β pancreáticas (Courtney *et al.*, 2010).

Entretanto, para que a terapia com células-tronco seja vantajosa quando comparada à administração de insulina, além de induzir a produção deste hormônio pelas células, deve-se garantir que este seja corretamente processado, estocado e secretado, em resposta a estímulos fisiológicos (Efrat, 2004), sendo este o principal desafio deste campo de pesquisa.

Inovações com relação às células utilizadas para a diferenciação em CPI vêm ganhando destaque (Borowiak & Melton, 2009), como no trabalho de Zhu e colaboradores (2011), que fizeram uso de células-tronco pluripotentes induzidas de macaco *rhesus* para a diferenciação em células produtoras de insulina, tendo encontrado resultados positivos quanto à funcionalidade em resposta à glicose, tanto *in vitro*, quanto no transplante em camundongos.

1.2.3. Efeito parácrino das células-tronco mesenquimais no DM

As características apresentadas pelas MSC, como seu potencial de expansão, facilidade de coleta, plasticidade e atividade imunossupressora, as tornam visadas candidatas para ensaios clínicos de terapia celular (Giordano, 2007). Conforme comentado anteriormente, inúmeros estudos pré-clínicos já foram realizados com MSC, mas os resultados são bastante heterogêneos (Meirelles & Nardi, 2009), possivelmente em decorrência da falta de padronização nos modelos animais das doenças, bem como nas condições de cultivo e na caracterização das células aplicadas. Os estudos pré-clínicos também variam muito com relação ao número de células empregado, à via e ao período de administração das MSC.

Além de abordagens explorando a capacidade de transdiferenciação das MSC em células produtoras de insulina, muitos estudos destacam o grande potencial imunomodulatório destas células. Sabe-se que a destruição de células β que caracteriza o DM1 advém de uma progressiva infiltração de linfócitos T autorreativos e macrófagos nas ilhotas pancreáticas, a chamada insulite. Uma das formas de inibir este processo de

destruição é através da indução de células T regulatórias, para que estas controlem as células T autorreativas. Madec e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de uma injeção de MSC oriundas de camundongos Balb/c por via intraperitoneal ou intravenosa, sobre o processo de insulite em camundongos NOD (*non-obese diabetic*) jovens (4 semanas). Foi observado que as MSC alogeneicas previnem a destruição de células β , através da indução de populações de células T regulatórias secretoras de IL-10, citocina cujo efeito é anti-inflamatório. Seguindo a mesma linha, um estudo com transplante singeneico de MSC de medula óssea em um modelo de diabetes por injeção de streptozotocina em ratos encontrou resultados semelhantes, demonstrando a importância de moléculas bioativas secretadas pelas MSC que são mobilizadas até os sítios de lesão, neste caso representados pelas ilhotas pancreáticas (Boumaza *et al.*, 2009).

Visando compreender melhor o processo de migração até os tecidos lesados, como citado no estudo acima, Sordi e colaboradores (2005) utilizaram ilhotas pancreáticas como exemplo de tecido periférico e expuseram MSC de medula óssea a meio condicionado de ilhotas, *in vitro*. As MSC foram atraídas pelas quimiocinas secretadas pelas ilhotas, presentes no meio, como CX3CL1 e CXCL12. A capacidade de migração foi confirmada *in vivo*, através da infusão de MSC de medula óssea GFP+ em camundongos letalmente irradiados. Foi constatada a presença das células em torno e até compondo as ilhotas pancreáticas dos camundongos que receberam a infusão. Este processo de *homing* é facilitado pela presença de receptores de quimiocinas nas MSC, como CX3CR1 (receptor da CX3CL1) e CXCR4 (receptor da CXCL12), conforme comentado anteriormente.

Além da correção das manifestações fisiológicas do diabetes, como a hiperglicemia e a glicosúria, efeitos secundários como a prevenção e melhora de complicações clínicas como as nefropatias destacam-se, provavelmente em decorrência da modulação de processos inflamatórios ou da promoção de neovascularização, gerados pelas MSC mobilizadas até os tecidos lesados, neste caso representados pelos glomérulos renais (Ezquer *et al.*, 2008).

1.2.4. Dificuldades do transplante de ilhotas pancreáticas e uma possível solução: o co-transplante com MSC

Em seu ambiente natural, o pâncreas, as ilhotas recebem um rico suprimento sanguíneo. No entanto, o processo de isolamento para uso em procedimentos resulta na

destruição de vários componentes celulares e não-celulares, como o sistema vascular. Ademais, o transplante de ilhotas pancreáticas expõe as células a uma variedade de estímulos estressores, como a isquemia e citocinas pró-inflamatórias, que aumentam a morte de células β , levando finalmente à falha do transplante.

Além disso, embora a rejeição e a recorrência da autoimunidade possam, com o passar do tempo, causar a destruição das ilhotas implantadas, há evidências de que a maior parte das ilhotas é destruída no período imediatamente posterior ao implante, por mecanismo decorrente da imunidade inata. Estima-se que de 50% a 70% das ilhotas infundidas são perdidas por apoptose “induzida por estresse” ou pela *instant blood-mediated inflammatory response* (IBMIR) (Bennet *et al.*, 2000; Cantarelli & Piemonti, 2011). Este processo foi estudado em detalhe por Bennet e colaboradores (2000), que demonstraram que as ilhotas humanas produzem grande quantidade de fator tecidual que causa adesão e ativação das plaquetas, provocando a ativação das cascatas do complemento e da coagulação, e atraindo granulócitos e monócitos que infiltram e destroem as ilhotas. Esta reação também pode ser precipitada pela secreção de quimiocinas, como a proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*).

Qualquer que seja o agente iniciador da reação, a lesão das ilhotas, inevitavelmente, provoca a liberação de antígenos insulares que podem reativar a resposta imune específica, resultando no aumento ou no reaparecimento de autoanticorpos como o anti-GAD (Moberg *et al.*, 2002; Moberg *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005). Certamente, outros fatores como a atividade antiproliferativa dos imunossupressores, a autoimunidade, a rejeição crônica e o ambiente hepático, local mais comum para a realização dos transplantes atuais, podem ser também em parte responsáveis pela perda da insulino-independência (Lee *et al.*, 2006; Eliaschewitz *et al.*, 2009).

Muitos clínicos acreditam que o uso prolongado de drogas imunossupressoras para manutenção de transplantes leva a complicações mais graves do que a terapia de longo prazo com insulina. Além disso, e de certa forma ironicamente, os agentes imunossupressores mais comumente usados estão associados com resistência à insulina e/ou redução no funcionamento de células β , podendo tornar-se fatores promotores de uma recidiva do diabetes (Wang *et al.*, 2011).

Desta forma, tem-se buscado estratégias alternativas que burlam o sistema imune, proporcionando proteção às ilhotas heterólogas, a partir do instante em que são transplantadas, e prolonguem sua sobrevivência e seu funcionamento. Muitos autores sugerem que o local/tecido/órgão onde as ilhotas são transplantadas pode favorecer o transplante, devido a características do ambiente, como a interação com células, citocinas, matriz extracelular, vasos, etc. O ambiente ótimo para a realização do transplante deve: 1) prover um sistema venoso que seja capaz de drenar a insulina produzida pelas ilhotas, garantindo a normalização dos níveis de glicose sanguínea e evitando a hiperinsulinemia sistêmica; 2) prover um suporte rico em artérias, aumentando o aporte de oxigênio para as ilhotas; 3) permitir um procedimento clínico de transplante minimamente invasivo; 4) permitir fácil acesso pós-transplante às ilhotas, tornando possível o acompanhamento morfológico e funcional do enxerto; 5) prover um microambiente adequado, que previna a perda precoce de ilhotas, aumentando seu potencial de enxertia; e 6) proteger as ilhotas de rejeição imunológica (Rajab, 2010).

Tendo em vista as características apresentadas acima, inúmeros locais já foram testados experimentalmente como alternativas para o transplante de ilhotas, incluindo fígado, cápsula renal, baço, pâncreas, peritônio, omento, parede gastrointestinal, testículos, timo, medula óssea, câmara anterior do olho, ventrículos cerebrais, e espaços subcutâneos e intramusculares (Rajab, 2010; Cantarelli & Piemonti, 2011). Vale lembrar que muitos destes locais foram somente testados em modelos animais com roedores, nunca tendo passado para estudos com animais de médio e grande porte. Ademais, muitos dos locais citados excluem qualquer possibilidade de aplicação em protocolos clínicos, tornando-se irrelevantes clinicamente. (Rajab, 2010). Nos estudos clínicos existentes, a infusão intraportal segue sendo a via mais usualmente empregada para o transplante de ilhotas, embora esteja longe do ideal, em decorrência de fatores imunológicos, anatômicos e fisiológicos (Christoffersson *et al.*, 2010; Rajab, 2010; Cantarelli & Piemonti, 2011).

O encapsulamento das ilhotas com membranas artificiais e semipermeáveis parece protegê-las de respostas imunes, limitando a necessidade de imunossupressão, além de permitir a passagem de glicose e insulina (Orive *et al.*, 2003). Desta forma, o xenotransplante de ilhotas também tornar-se-ia viável do ponto de vista imunológico (Borg & Bonifacio, 2011). Além disso, ilhotas microencapsuladas podem ser transplantadas na

cavidade peritoneal, e não mais no fígado, o que é vantajoso, tendo em vista o melhor aporte vascular da região (de Souza *et al.*, 2011).

Outra abordagem que vem ganhando força é a associação de alguns tipos celulares às ilhotas, como as células endoteliais ou os precursores endoteliais. Vale lembrar que as ilhotas transplantadas tornam-se avasculares, no período imediatamente posterior ao transplante, e precisam funcionar em um microambiente de hipóxia, o que contribui para a morte celular por isquemia e eventos inflamatórios (Rackham *et al.*, 2011). Tendo isto em mente, Johansson e colaboradores (2005) combinaram o potencial de revascularização de células endoteliais de aorta humana com sua habilidade em formar uma espécie de cobertura protetora ao redor de ilhotas humanas, *in vitro*. Quando colocados em contato com sangue humano, estes conjuntos geraram uma menor ativação da coagulação e do sistema complemento, além de menor infiltração de células do sistema imune. Depois de transplantados em camundongos *nude* atímicos, ilhotas e células endoteliais permaneceram presentes e em associação, por sete semanas.

Os exemplos acima destacam a importância de alternativas que diminuam a resposta imune contra ilhotas transplantadas e aumentem sua vascularização, com consequente melhora e prolongamento na sua função. Tendo em vista a atuação de células-tronco mesenquimais em protocolos de terapia celular, através de seu efeito parácrino, com fatores imunomoduladores, angiogênicos, antiapoptóticos e que favorecem a proliferação de células-tronco tecido-específicas, o uso destas células surge como nova alternativa, em associação com ilhotas pancreáticas, para o tratamento do DM1. As MSC utilizadas nos estudos de co-transplante são oriundas de diversos tecidos, sendo as mais comumente usadas isoladas a partir de medula óssea (Figliuzzi *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Longoni *et al.*, 2010), pâncreas (Sordi *et al.*, 2010) e rim (Rackham *et al.*, 2011).

Resultados animadores encontrados no transplante de ilhotas na medula óssea de ratos diabéticos (Kover *et al.*, 2011) podem indicar uma possível interação positiva entre as ilhotas e os constituintes celulares do microambiente medular, entre eles, as MSC. Além disso, a facilidade de isolamento e o seu caráter minimamente invasivo tornam as MSC oriundas da medula óssea as células de maior potencial para uso na prática clínica.

O co-transplante de MSC com um número limítrofe de ilhotas, ou seja, uma quantidade estabelecida de ilhotas que sozinha não tem capacidade de reverter o quadro de diabetes, sob a cápsula renal de ratos diabéticos, permitiu o retorno à normoglicemia e um

aumento na densidade de capilares nas ilhotas transplantadas. Isto se deve à expressão de VEGF por estas células (Figliuzzi *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010), além de outros fatores tróficos como IL-6, IL-8, fator de crescimento hematopoiético e fator de crescimento derivado de plaquetas (Park *et al.*, 2009; Golocheikine *et al.*, 2010; Sordi *et al.*, 2010).

Outra abordagem interessante apresentada em um estudo de Rackham e colaboradores (2011) demonstra, através do co-transplante de ilhotas singeneicas com MSC em camundongos diabéticos, que a melhora significativa encontrada na reversão da hiperglicemia deve-se ao remodelamento apresentado na anatomia das ilhotas, quando na presença das MSC. Esta morfologia aproxima-se mais à encontrada no pâncreas endógeno, facilitando a distribuição de células endoteliais entre as ilhotas. Neste caso, tanto o melhor aporte vascular, quanto a interação parácrina entre as células endoteliais e as ilhotas é importante para manutenção da função das células β (Rackham *et al.*, 2011). Além disso, a comunicação entre células β vizinhas é de extrema importância para a secreção normal de insulina, sendo esta também favorecida por esta organização anatômica (Buschard, 2011).

Outros estudos, *in vitro*, mostraram que ilhotas co-cultivadas com MSC murinas, bem como as cultivadas somente no meio condicionado de MSC, desenvolveram maiores níveis de moléculas de sinalização antiapoptóticas, menor taxa ADP/ATP, melhor viabilidade e, quando transplantadas em camundongos diabéticos, demonstraram maior funcionalidade (Park *et al.*, 2010). O co-cultivo também protege as ilhotas através do aumento da expressão de moléculas de resistência a hipóxia, sob condições de baixo teor de oxigênio (Lu *et al.*, 2010). Outro estudo *in vitro*, co-cultivando ilhotas e MSC de humanos, encontrou resultados semelhantes, concluindo que a melhora da qualidade das ilhotas deve-se à secreção de fatores pelas MSC, como IL-6, VEGF-A, HGF e TGF- β (Park *et al.*, 2009).

Com relação ao seu potencial imunorregulatório, MSC co-transplantadas com ilhotas previnem a rejeição do enxerto em um modelo de transplante de ilhotas com incompatibilidade total de MHC, devido à atividade inibitória das MSC sobre a proliferação de linfócitos T autorreativos (Jacobson *et al.*, 2008). Especula-se que o efeito protetor observado *in vivo* deva ser mediado por metaloproteinases de matriz (MMP, *matrix metalloproteinases*) secretadas pelas MSC, mais especificamente a MMP-2 e a MMP-9. Estas moléculas reduzem a expressão de CD25 (IL-2R) na superfície de células T e, conseqüentemente, a sua responsividade à interleucina-2, uma citocina leucocitotrófica e

pró-inflamatória. Além disso, a migração de células endoteliais do receptor até as ilhotas é facilitada por estes fatores. Isto resulta em uma redução da resposta a antígenos alogeneicos e prolonga a sobrevivência de transplantes totalmente incompatíveis imunologicamente, com manutenção da normoglicemia, a longo prazo (Ding *et al.*, 2009).

Outros estudos confirmam que as MSC alteram o padrão de secreção de citocinas de células dendríticas, linfócitos T *naïve* e efetores e células NK, passando de um perfil pró-inflamatório (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-12) a um perfil anti-inflamatório (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β 1, HGF, prostaglandina-E2), independentemente da via de administração (da Silva Meirelles *et al.*, 2008; Solari *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Longoni *et al.*, 2010).

Conforme citado anteriormente, Madec e colaboradores (2009) concluíram que a administração de MSC reduz o processo de insulite, através da manutenção da população de células T regulatórias secretoras de IL-10 (FoxP3+), em um modelo murino de diabetes autoimune. Esta proposta foi estendida para um trabalho com modelo de diabetes induzido por streptozotocina em primatas não-humanos, utilizando a co-infusão de MSC alogeneicas com ilhotas. Os resultados mostraram que a função do alotransplante de ilhotas foi estabilizada e prolongada em decorrência do aumento, na circulação periférica, do número de células T regulatórias, responsáveis pelo controle e redução do processo de destruição de células β (Berman *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2011).

A modificação genética de MSC é outra alternativa que vem sendo estudada como estratégia para potencializar seus efeitos terapêuticos (da Silva Meirelles *et al.*, 2008) no co-transplante com ilhotas, mantendo suas características originais (Wu *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011b).

Tendo em vista o exposto até aqui, conclui-se que o co-transplante de ilhotas pancreáticas com células-tronco mesenquimais é uma alternativa bastante viável e que pode contribuir para a redução do número de ilhotas necessário para o estabelecimento da independência de insulina em pacientes diabéticos. Em março de 2008, teve início, no Hospital Público Fuzhou na China, o primeiro protocolo clínico de co-transplante de ilhotas pancreáticas com MSC para o tratamento de pacientes com diabetes mellitus tipo 1. O estudo deve durar até 2014 e utiliza a veia porta como via para infusão do transplante (*Clinical Trials* – NIH cód. NCT00646724).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo geral investigar o efeito de células-tronco mesenquimais sobre ilhotas pancreáticas, em sistema de co-transplante singeneico, em modelo murino de diabetes mellitus.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a funcionalidade do transplante de ilhotas pancreáticas em camundongos diabéticos, através de parâmetros fisiológicos como glicemia e peso;
- 2) Confirmar se o efeito de reversão do diabetes deve-se ao transplante, através de nefrectomia, nos animais normoglicêmicos;
- 3) Analisar a funcionalidade das ilhotas transplantadas através da presença de insulina e glucagon, nas células β e α , respectivamente, presentes nas ilhotas;
- 4) Avaliar o papel de células-tronco mesenquimais sobre o efeito terapêutico de ilhotas pancreáticas, através de co-transplante;
- 5) Confirmar a presença de células-tronco mesenquimais no grupo experimental que recebeu o co-transplante.

3. JUSTIFICATIVA

A escolha por um modelo de co-transplante singeneico de ilhotas pancreáticas com células-tronco adiposo-derivadas justifica-se pela necessidade de um melhor entendimento dos processos envolvidos na melhora da função e na sobrevivência do transplante, excluindo-se a variável da rejeição imunológica.

O local escolhido para a realização do transplante, ao contrário de alguns estudos que fazem uso da injeção intraportal, foi sob a cápsula renal. Primeiro, porque o rim oferece um ambiente menos hostil e mais favorável à sobrevivência das ilhotas e células transplantadas. Segundo, porque a funcionalidade do transplante pode ser facilmente comprovada através da nefrectomia do órgão no qual foi realizado o transplante. Terceiro, porque, ao realizar o transplante, toma-se o cuidado de manter as ilhotas e células transplantadas reunidas em um local pré-determinado, sob a cápsula renal. Desta forma, a localização da região do transplante é bastante facilitada, permitindo a realização das análises histológicas.

A origem das células utilizadas neste estudo foi escolhida visando à futura aplicação clínica no co-transplante com ilhotas pancreáticas. O tecido adiposo vem sendo explorado como alternativa à medula óssea, na obtenção de MSC, já que as células podem ser coletadas através de procedimentos menos invasivos e em quantidades superiores às alcançadas com a medula óssea, por grama de tecido coletado (Ohmura *et al.*, 2010).

Além da atenção quanto à origem das células-tronco mesenquimais aplicadas, foi dada preferência pela utilização de células jovens, entre as passagens P3 e P4. Nesta fase, já existe uma população celular homogênea e os efeitos deletérios causados por longos períodos em cultivo ainda não estão presentes. A escolha foi baseada em estudos clínicos, como o trabalho de von Bahr e colaboradores (2011), que avaliou a eficácia do tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro com MSC de medula óssea em passagens iniciais em comparação com passagens mais tardias, e verificou que as primeiras foram mais funcionais. Além disso, como as células escolhidas expressam a proteína verde fluorescente (GFP), quanto mais cedo forem utilizadas, maior a expressão da proteína e a facilidade de localização das ADSC co-transplantadas através de análise histológica. A GFP presente nas células facilita a identificação das ADSC transplantadas, já que MSC não possuem um marcador de superfície específico para caracterizá-las.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Este estudo foi realizado, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob normas de ética para pesquisa em modelos animais, com cuidados especiais para a utilização do menor número destes e para manejo da dor e sofrimento. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

A linhagem escolhida (C57Bl/6) como modelo biológico foi criada e mantida sob condições de biotério convencional. O padrão genético isogênico desta linhagem é preservado através do método de acasalamento *Brother & Sister*, que lhe confere homogeneidade genética. Os animais foram criados no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Durante o experimento, foram alojados no biotério do Departamento de Genética da UFRGS, com fotoperíodo de 12h/12h claro/escuro e temperatura controlada (22°C). Foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas, em cama de maravalha de pinus autoclavada, e alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab CR-1® - Nuvital) e água *ad libitum*.

Os animais utilizados para isolamento das células-tronco mesenquimais utilizadas no estudo têm o mesmo background genético da linhagem citada acima, acrescido do transgene da proteína verde fluorescente. A linhagem, gentilmente cedida pelo pesquisador japonês Masaru Okabe (Okabe *et al.*, 1997), foi criada e mantida no biotério do Departamento de Genética, sob as mesmas condições detalhadas acima.

Os protocolos de anestesia e analgesia utilizados nos procedimentos cirúrgicos foram:

- Anestesia: Dose única de 0,1 mL, para cada 10 g de peso corporal, por via intraperitoneal (IP), de solução de cloridrato de xilazina 2 % (Anasedan®, Vetbrands Brasil Ltda.) e cloridrato de ketamina 10 % (Dopalen®, Vetbrands Brasil Ltda.), diluídos a 2 mg/ml e 10 mg/mL, respectivamente, em solução salina (0,9 %).

- Analgesia: Após a cirurgia, foi utilizado tartarato de butorfanol (Torbugesic®, Fort Dodge, USA), na concentração de 5 mg/kg de peso corporal, por via subcutânea (SC), a cada 6 horas, por 24 horas.

4.2. ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MURINAS ADIPOSEO DERIVADAS

Foi estabelecida a linhagem de células-tronco adiposo-derivadas (ADSC) isolada a partir de camundongos C57Bl/6 eGFP, com 8 a 12 semanas de idade, conforme Meirelles & Nardi (2009).

4.2.1. Estabelecimento do cultivo de ADSC

Os camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e levados ao fluxo laminar, embebidos em álcool 70%. O processo cirúrgico envolveu um corte na região ventral do animal, possibilitando a dissecação da pele e acesso às porções de tecido adiposo localizadas nos flancos, entre o peritônio e a pele. Foi retirada uma fração de aproximadamente 0,5 cm³ de gordura. O fragmento foi lavado em solução de Hanks livre de Ca²⁺ e Mg²⁺ (HBSS, Sigma-Aldrich), acrescida de 0,35 g/L de bicarbonato de sódio, e ligeiramente picotado. Os fragmentos foram digeridos em solução de meio de cultura sem soro e com colagenase tipo I (1,5 mg/mL, Gibco), em banho-maria, a 37°C, por 30-45 minutos.

Após o período de digestão, os fragmentos restantes foram dissociados mecanicamente e homogeneizados com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro. Acrescentou-se 10 mL de meio completo (MC), que consiste de *Dulbecco's Modified Eagle Medium/low glucose* (DMEM, Sigma-Aldrich), acrescido de 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 2,5 g/L de HEPES (Sigma-Aldrich), 10 % de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 50.000 UI de penicilina e 50 mg de streptomina/L (Sigma-Aldrich). Depois de centrifugar por 7 minutos, a 1200 rpm, retirou-se o sobrenadante, e o material obtido foi ressuspensão em 3 mL de MC e transferido para uma placa de 6 poços (TPP). Esta foi incubada em estufa umidificada, a 37°C e atmosfera com 5 % de CO₂, por 24 horas, quando então as células não-aderentes foram removidas pela troca de meio.

A taxa de repique foi determinada empiricamente pela cinética da cultura, garantindo 2 repiques semanais. Na primeira subcultura (passagem P1), quando atingida a confluência mínima de 80 %, as células foram lavadas com HBSS, tratadas com solução de 0,05 % de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich) em HBSS e transferidas para frascos de cultura de 25 cm² (TPP), com o triplo da área original (1:3), sendo repicadas quando necessário e transferidas para frascos de cultura de 75 cm² (TPP), com taxas de repique superiores (1:3, 1:4, etc.).

4.2.2. Caracterização das ADSC

Conforme citado na introdução, há três critérios que devem ser obedecidos para que uma população celular seja classificada como MSC. O primeiro diz respeito à proliferação como células aderentes sobre superfícies plásticas. O segundo, ao imunofenótipo, com células positivas para CD105, CD73 e CD90, e negativas para CD14 ou CD11b, CD34, CD45, CD79 alfa ou CD19 e HLA-DR. E o terceiro critério refere-se à capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Dominici *et al.*, 2006).

4.2.2.1. Análise morfológica qualitativa das ADSC

As células foram rotineiramente observadas em microscopia de fase com microscópio invertido (Axiovert 25, Zeiss) e eventualmente fotografadas utilizando câmera digital (AxioCam MRc, Zeiss) e o software AxioVision 3.1 (Zeiss). A fluorescência do GFP nas ADSC foi acompanhada através da sua exposição à lâmpada de mercúrio HBO 50, utilizada no mesmo microscópio.

4.2.2.2. Análise imunofenotípica das ADSC por citometria de fluxo

A imunofenotipagem foi realizada com anticorpos anti-CD11b, CD31, CD44, CD45, CD90.2 e Sca-1 murinos, conjugados com ficoeritrina (PE) (BD Pharmingen). Após a tripsinização, as células foram lavadas com PBS, incubadas com os anticorpos por 30

minutos, a 4°C, e lavadas novamente com PBS, para remover o excesso de anticorpos não ligados.

Foram coletados dados de pelo menos 10.000 eventos, utilizando um citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson), equipado com argon laser de 488 nm e o programa CELLQuest (Becton Dickinson). Os gráficos foram gerados no programa WinMDI, versão 2.8.

4.2.2.3. *Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica das ADSC in vitro*

Para induzir a diferenciação adipogênica, culturas confluentes de ADSC foram cultivadas com MC, suplementado com 10⁻⁷ M de dexametasona, 2,5 µg/mL de insulina de pâncreas bovino, 100 µM de indometacina e 5 µM de rosiglitazona. Para indução da diferenciação osteogênica, as células foram mantidas em MC acrescido de 10⁻⁶ M de dexametasona, 5 µg/ml de ácido ascórbico e 10 mM de β-glicerofosfato. As culturas foram mantidas nos meios de indução por 30 dias, com trocas de meio a cada 3 ou 4 dias. Culturas não diferenciadas foram mantidas como controles, pelo mesmo período de tempo, no MC descrito para a manutenção das ADSC. Ao final do período de indução, o fenótipo de adipócitos foi avaliado através da coloração com *Oil Red O*, evidenciando os vacúolos de gordura. A atividade osteoblástica foi avaliada através da coloração com *Alizarin Red S*, que colore a matriz extracelular rica em cálcio. Todos os reagentes e corantes usados são da marca Sigma-Aldrich.

4.3. DO DIABETES AO TRANSPLANTE

4.3.1. **Indução do diabetes**

Camundongos da linhagem C57Bl/6 machos (Cemib – Unicamp), com idade entre 8 e 12 semanas, foram usados como doadores e receptores dos transplantes. Para indução do diabetes nos animais receptores, foi realizada uma única injeção de streptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich), na concentração de 180 mg por quilograma de peso corporal, por via intraperitoneal. A solução de STZ foi dissolvida em tampão citrato (pH 4,5) fresco, no momento da injeção.

Os camundongos com concentração de glicose sanguínea acima de 360 mg/dl foram selecionados como receptores do transplante. Os níveis glicêmicos foram determinados, durante todas as etapas do experimento, através do medidor de glicemia Accu-Chek Performa e suas respectivas fitas (Roche). Para cada medição, uma quantidade mínima de sangue era retirada, a partir de uma perfuração com agulha 26G (Nipro), na extremidade da cauda do animal.

4.3.2. Isolamento de Ilhotas

As ilhotas pancreáticas foram isoladas a partir de animais normoglicêmicos, por digestão com solução de colagenase (1 mg/ml, tipo XI, Sigma-Aldrich) em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), acrescido de 2 g/L de bicarbonato de sódio, sem soro. A solução era injetada através do ducto biliar (figura 1B), atingindo o pâncreas do animal. Para tanto, antes da injeção, era realizado o clampeamento da inserção do ducto biliar comum no duodeno (figura 1A). Após a distensão do órgão pela solução injetada (figura 1C), o mesmo era retirado do animal (figura 1D), colocado em tubo Falcon de 50 mL, com a mesma solução injetada, e mantido em gelo. A digestão do tecido pancreático dava-se pela incubação em banho-maria, a 37°C, por 10 minutos. Em seguida, o processo era interrompido por adição de meio RPMI-1640 com 10% de SFB e 50.000 UI de penicilina e 50 mg de streptomina/L, gelado e uma agitação vigorosa, para facilitar a dissociação do tecido. Após a lavagem e a filtragem do volume presente no tubo, para reter a parcela de tecido não digerido, as ilhotas eram separadas usando um gradiente de densidade (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) (figura 2A). A nuvem dispersa de ilhotas formada era coletada e transferida para outro tubo falcon, onde seguia-se a lavagem, com RPMI completo. Por fim, as ilhotas presentes em cada tubo eram dispostas em placas de Petry (figura 3A), para contagem e separação manual, com auxílio de uma micropipeta P-200. Tubos eppendorf, contendo 150 ilhotas cada, eram reservados até o momento do transplante.

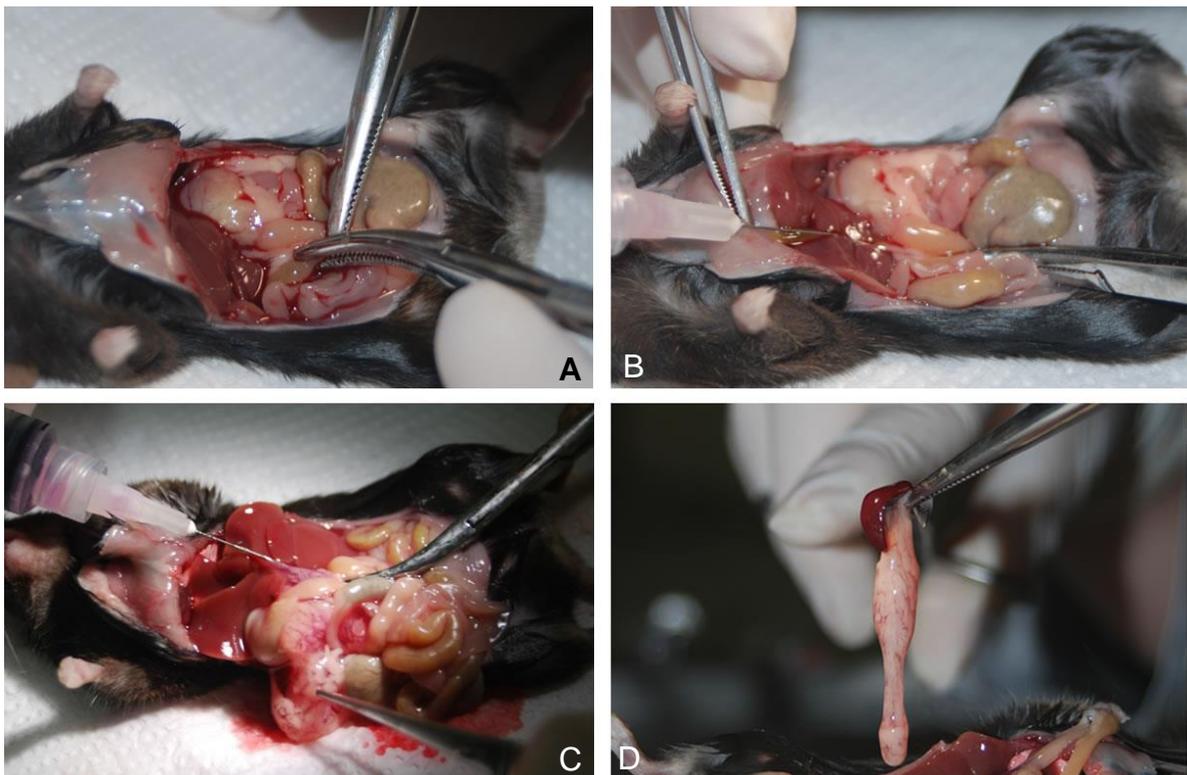


Figura 1. Fotografias ilustrando a parte inicial do processo de isolamento de ilhotas. A) Clampeamento da inserção do ducto biliar comum no duodeno; B) Injeção de solução de collagenase tipo XI através do ducto biliar; C) Pâncreas distendido; D) Remoção do pâncreas (ainda conectado ao baço).

4.3.3. Transplante

Os animais diabéticos foram escolhidos aleatoriamente para o transplante de 150 ilhotas, ou 150 ilhotas acrescidas de $2,5 \times 10^5$ ADSC GFP+. As células utilizadas estavam entre as passagens P3 e P4. O número de ilhotas transplantadas foi escolhido, conforme a literatura, para atuar como uma quantidade limítrofe de tecido endócrino, capaz de curar apenas uma parcela de animais diabéticos, quando transplantado. Após anestesia, era realizada a tricotomia da região a ser manipulada, e uma incisão lombar era feita, permitindo a exposição do rim esquerdo do animal. Uma pequena incisão na cápsula renal era feita com a ajuda de uma agulha 26G (Nipro). Conforme o grupo experimental, ilhotas sozinhas (n=12) ou ilhotas + ADSC (n=10) eram centrifugadas dentro de tubos de polietileno (PE50, Becton Dickinson), até formarem um *pellet*, que era injetado sob a cápsula renal, com ajuda de uma seringa Hamilton (Fisher) (figuras 2B, 2C e 2D). Uma caneta cauterizadora Cautermax (Fabinject) era utilizada para fechar a incisão da cápsula

renal. Em seguida, o rim era colocado em sua posição original, e o peritônio e a pele sobrejacente eram suturados. Uma dose subcutânea de analgésico era administrada, e o animal ficava sobre uma cama aquecida, até recobrar os sentidos.

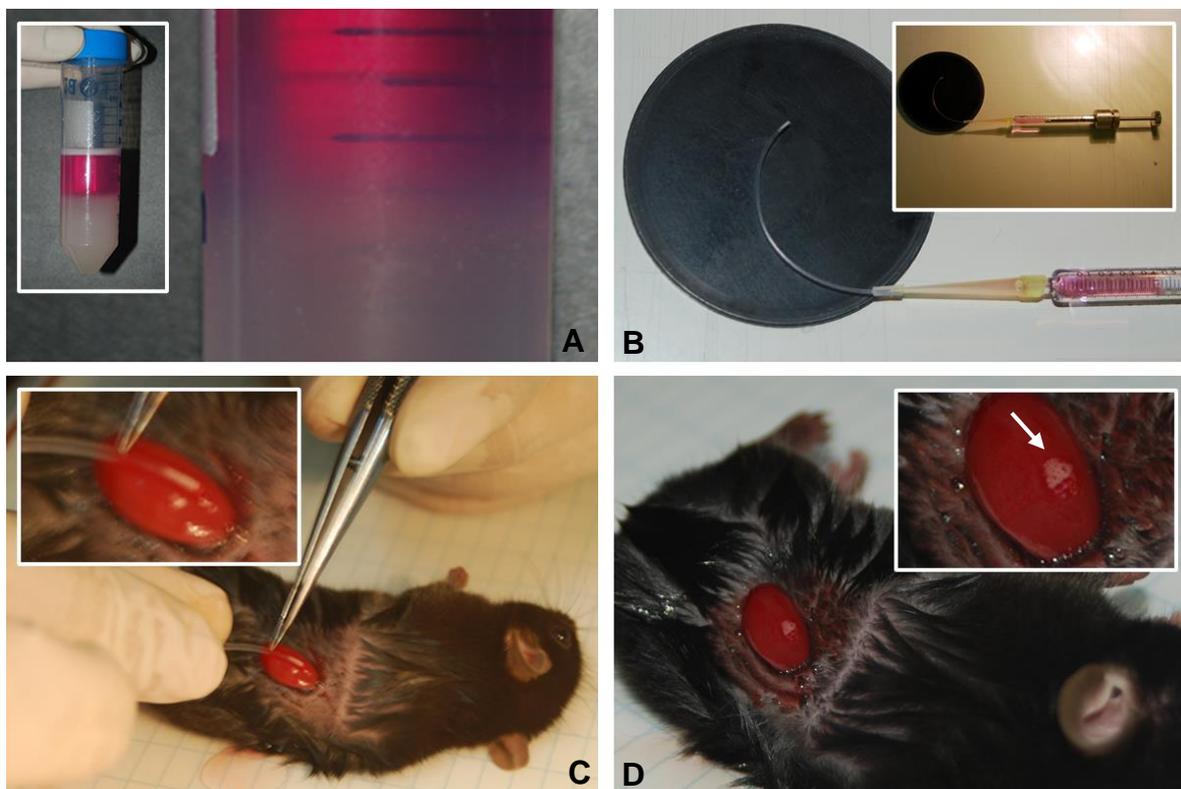


Figura 2. Fotografias ilustrando a parte final do isolamento e o procedimento de transplante das ilhotas. A) Separação das ilhotas por gradiente de densidade (Histopaque 1077); B) Aparato usado para a injeção do *pellet* do transplante, neste caso, somente ilhotas, sob a cápsula renal do animal; C) Colocação do tubo PE50 sob a cápsula renal; D) Resultado, após a injeção das ilhotas (transplante indicado pela seta, no detalhe).

4.3.4. Avaliação da função do transplante

O peso e a concentração de glicose sanguínea foram monitorados nos animais que receberam o transplante, a cada dois dias, na primeira semana após o procedimento, e semanalmente, até o final do experimento, no 45º dia. Foram considerados curados os animais que tiveram glicemia abaixo de 200 mg/dl, em pelo menos duas medições consecutivas, sem reverter para um quadro de hiperglicemia em nenhum momento posterior. Após os 45 dias de acompanhamento, todos os animais curados foram submetidos à nefrectomia do órgão esquerdo, no qual fora realizado o transplante. Após

anestesia e tricotomia, era feita uma incisão ao lado da originalmente feita para o transplante. O rim esquerdo era exposto e rebatido dorsalmente, de forma que permitisse o acesso à artéria renal, que, com auxílio de um fio de sutura de nylon 6-0 (Bioline) era amarrada e obstruída. Por fim, o vaso era cauterizado no sentido proximal ao rim, em relação ao nó, e o órgão era dissecado e removido do animal. O peritônio e a pele sobrejacente eram suturados, uma dose subcutânea de analgésico era administrada, e o animal ficava sobre uma cama aquecida, até recobrar os sentidos. Dois dias após a nefrectomia, a concentração de glicose sanguínea era medida, e o animal sacrificado. Os animais não curados também foram sacrificados neste dia, e os seus rins transplantados, removidos. Os órgãos foram fixados em formalina tamponada 10 %.

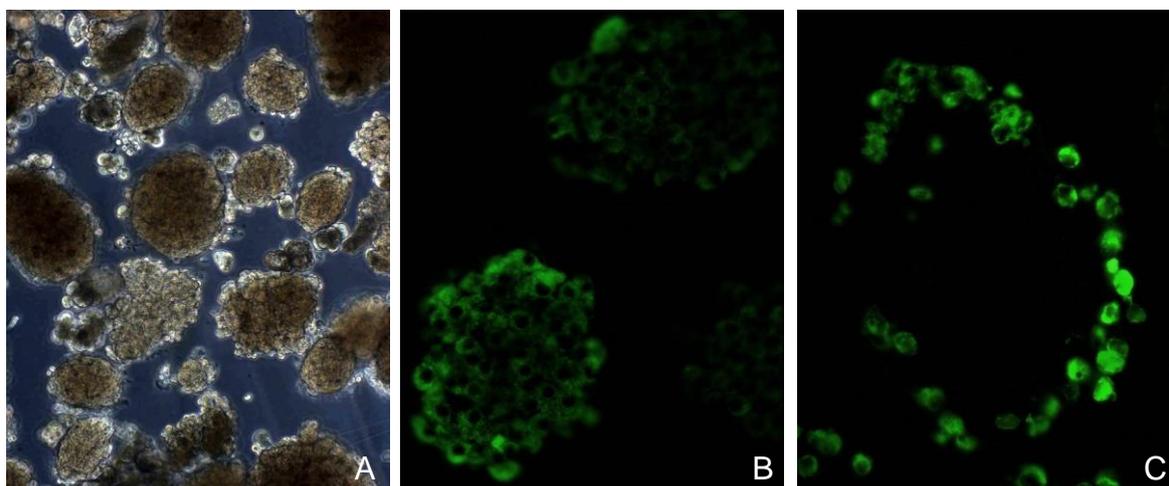


Figura 3. Fotomicrografias das ilhotas pancreáticas isoladas. A) Em meio de cultivo, no microscópio de contraste de fase (aumento de 100 \times); e, em imunofluorescência de cortes histológicos (aumento de 400 \times), evidenciando a distribuição celular típica de ilhotas murinas: B) células β produtoras de insulina no centro e C) células α produtoras de glucagon na periferia.

4.3.5. Imuno-histoquímica

Após a fixação, alguns rins foram preparados para cortes em criostato, para confirmar a presença das ADSC, nos grupos em que se realizou o co-transplante, através da fluorescência da GFP, quando exposta à microscopia de fluorescência.

Os demais rins foram desidratados em um gradiente de concentração de álcool e xilol e, por fim, incluídos em parafina (EasyPath). Foram realizados cortes em micrótomo

Leica RM 2125, com 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE, Pró-Cito), para análise da região do transplante. Foram realizadas imunohistoquímicas com os seguintes anticorpos primários: anti-Insulina (1:200, Dako) e anti-Glucagon (1:200, Santa Cruz). Os respectivos anticorpos secundários usados foram: anti-guinea pig com Alexa 488 (BD Pharmingen) e anti-mouse com FITC (Santa Cruz). Os cortes foram incubados com os anticorpos primários nas diluições especificadas acima, O/N, a 4°C. Os anticorpos secundários foram usados na concentração de 1:50, por 1 hora, a TA. Após as lavagens, as lâminas foram finalizadas com o meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories) e lamínula, e analisadas em microscópio de fluorescência.

A mesma metodologia foi utilizada para a padronização da técnica, em cortes de ilhotas isoladas previamente para testes (figuras 3B e 3C).

4.3.6. Análise estatística

Os dados apresentados foram transformados em gráficos e analisados estatisticamente no programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, Inc.). Para comparação das curvas de glicemia e peso dos dois grupos experimentais, foi realizado o teste ANOVA bifatorial com correção de Bonferroni. Para as curvas de reversão, ou seja, para avaliar o percentual de animais que se mantinham diabéticos, ao longo dos 45 dias pós-transplante, nos dois grupos experimentais, foi utilizado o Teste Log-rank/Mantel-Cox. Para confirmar que a nefrectomia do rim que recebeu o transplante foi a causa do restabelecimento do quadro de hiperglicemia, dois dias após o procedimento, em todos os animais nefrectomizados, foi realizado um Teste t de Student. E, finalmente, para comprovar que a redução da glicemia do grupo que recebeu ilhotas + ADSC, em comparação com o grupo que recebeu somente ilhotas, não deve-se ao acaso, foi realizado um Teste t de Student unicaudal.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS ADSC

As células-tronco adiposo-derivadas foram isoladas através de seu potencial de aderência ao plástico, obedecendo, desta forma, ao primeiro critério para a classificação das MSC. Elas apresentaram características morfológicas de MSC e fluorescência da GFP (figura 4), quando expostas ao microscópio de fluorescência.

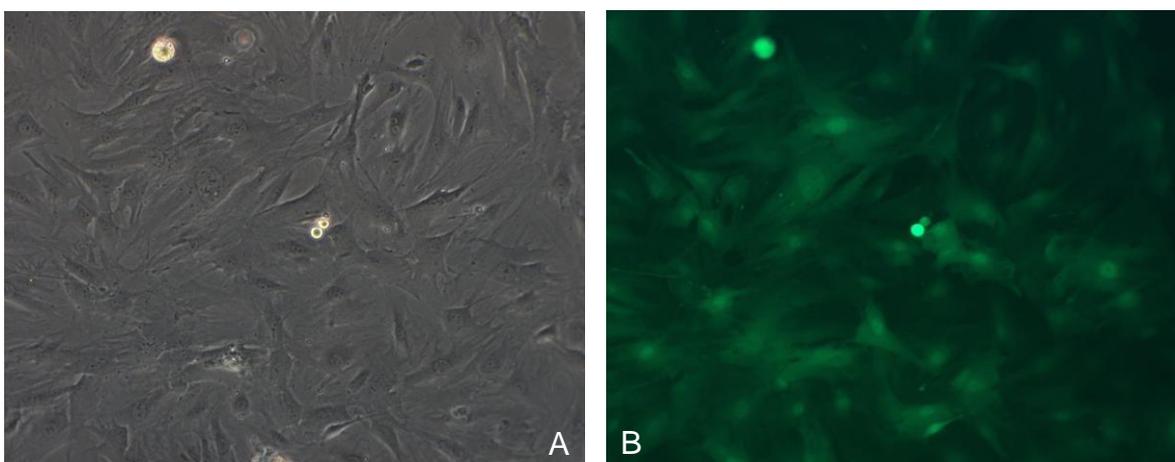


Figura 4. Fotomicrografia das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em passagem P3, em A) microscopia de contraste de fase e B) microscopia de fluorescência. Aumento de 100 \times .

5.1.1. Análise imunofenotípica por citometria de fluxo

A identidade das ADSC foi confirmada através de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os resultados da análise dos marcadores de superfície, plotados em forma de histograma, confirmam que estas células são negativas para CD11b, CD31 e CD45, marcadores de macrófagos, células endoteliais e células hematopoiéticas, respectivamente, e positivas para Sca-1, CD44 e CD90.2, característicos de MSC (figura 5).

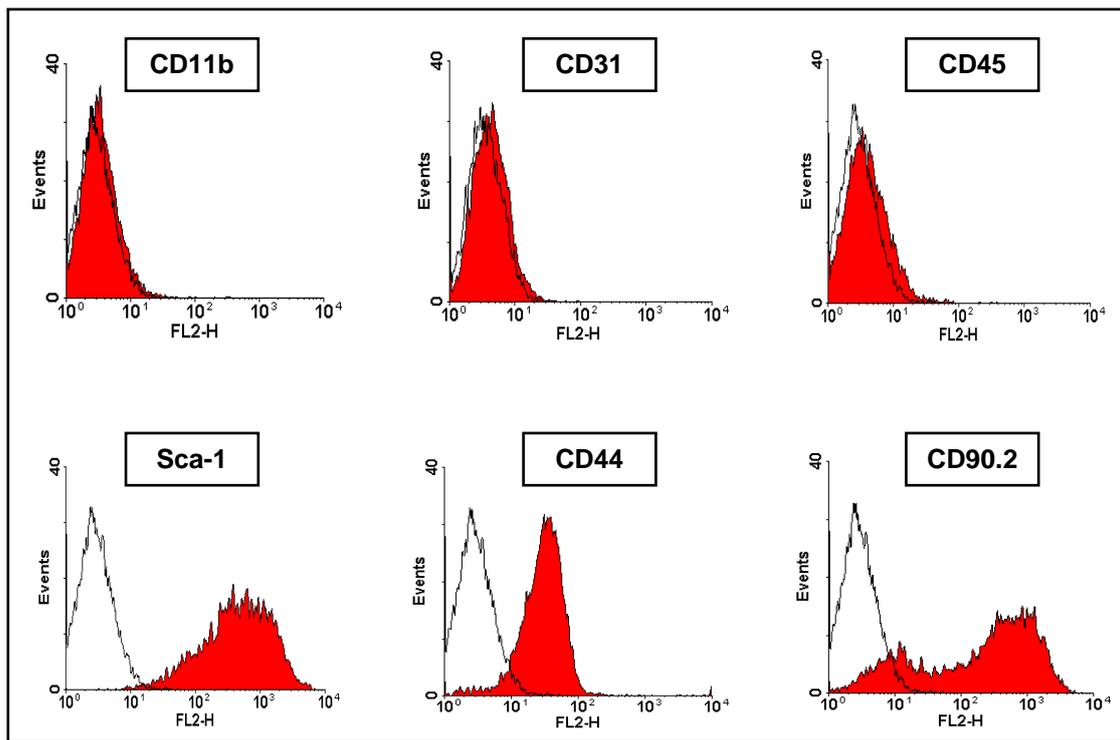


Figura 5. Caracterização dos marcadores de superfície celular das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, analisadas por citometria de fluxo. Os três gráficos na linha superior representam os marcadores não expressos, CD11b, CD31 e CD45, e os três gráficos da linha inferior representam os marcadores expressos, Sca-1, CD44 e CD90.2.

5.1.2. Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*

Os resultados mostram que as culturas foram capazes de originar adipócitos e osteoblastos, quando submetidas aos meios de indução adequados. Os depósitos lipídicos estão evidenciados pelo corante *Oil Red O* (figura 6B), bem como a matriz extracelular rica em cálcio, pelo corante *Alizarin Red S* (figura 6D).

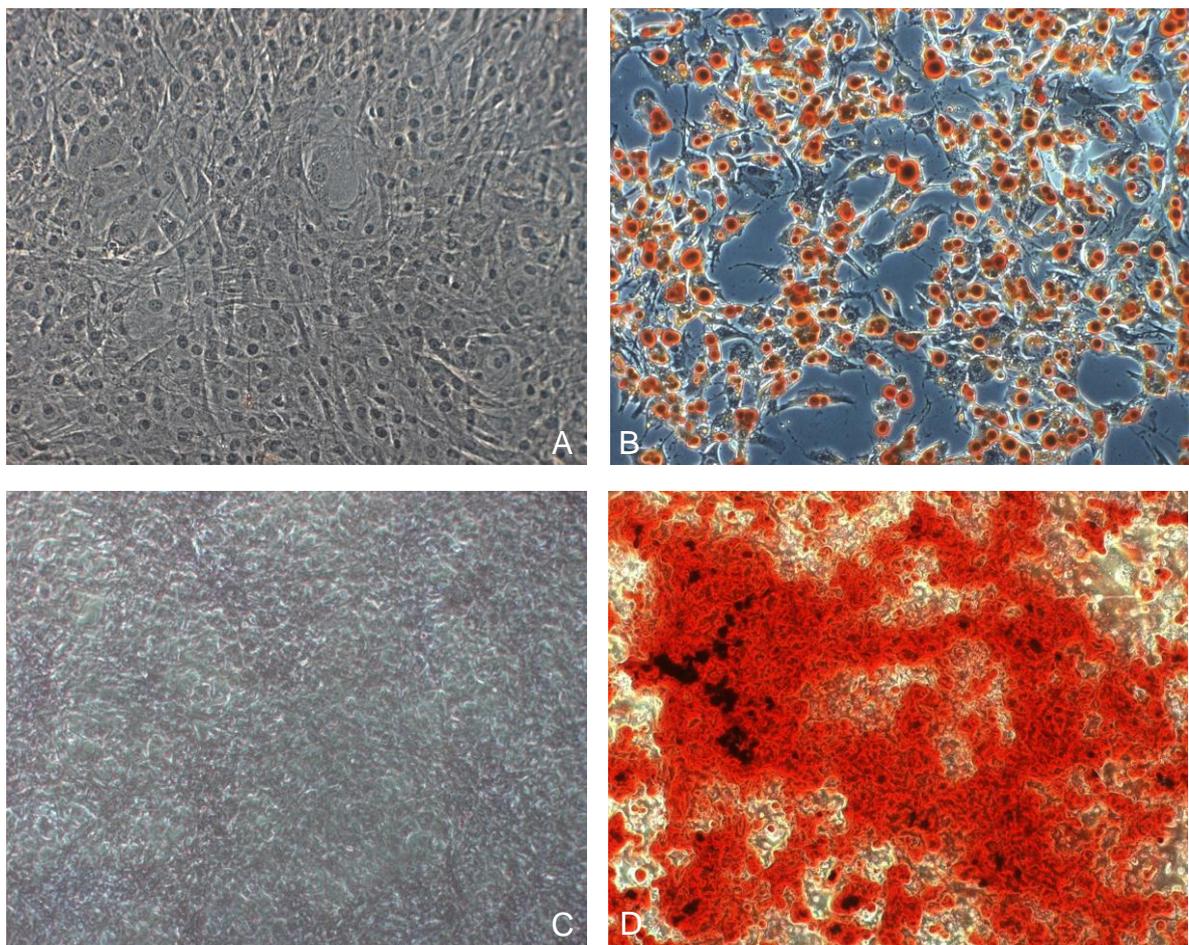


Figura 6. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo submetidas aos protocolos de diferenciação adipogênica (B) e osteogênica (D), e seus respectivos controles (A e C), após a revelação com *Oil Red O* (A e B), em aumento de 100 \times , e *Alizarin Red S* (C e D), em aumento de 50 \times .

5.2. INDUÇÃO DO MODELO DE DIABETES

Conforme evidenciado pela curva das médias de glicemia dos animais diabéticos transplantados (figura 7), as medições dos níveis de glicose sanguínea nos dias “-1” e “0”, 2 e 3 dias após a indução do diabetes por injeção IP de 180 mg/kg de STZ, respectivamente, comprovaram a eficácia no estabelecimento do modelo de diabetes. No dia do transplante (dia 0), a média de glicemia encontrada nos 22 animais foi de $512,1 \pm 12,1$ mg/dL, em comparação com a glicemia de $145,1 \pm 4,2$ mg/dL dos mesmos animais, antes da indução.

5.3. ANÁLISE DA FUNÇÃO DO TRANSPLANTE

O co-transplante das ilhotas com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo não trouxe vantagens na função do transplante. A média da concentração sanguínea de glicose dos camundongos transplantados com ilhotas + ADSC foi semelhante à dos animais transplantados apenas com ilhotas, durante todo o período analisado após o transplante (figura 7) (ANOVA bifatorial com correção de Bonferroni). Desta forma, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando o número de animais curados em ambos os grupos foi comparado, em cada semana analisada. Após 45 dias, 40% dos animais transplantados com ilhotas + ADSC ($n = 10$) permaneciam hiperglicêmicos, o que, quando comparado com os 33,3% do grupo transplantado apenas com ilhotas ($n = 12$), não apresentou diferença estatisticamente significativa (Teste Log-rank/Mantel-Cox) (figura 8).

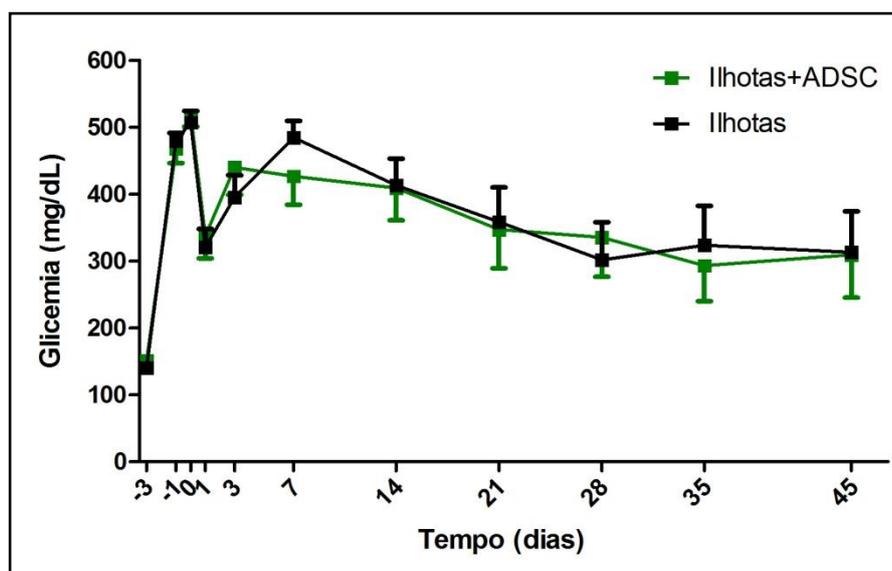


Figura 7. Gráfico da concentração de glicose sanguínea de camundongos transplantados com 150 ilhotas sozinhas (linha preta) ou co-transplantados com 150 ilhotas + $2,5 \times 10^5$ células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (linha verde), ao longo de 45 dias. (ANOVA bifatorial com correção de Bonferroni).

Nos animais considerados curados, o tempo médio encontrado para reversão pra normoglicemia foi de $25 \pm 4,9$ dias no grupo transplantado com ilhotas + ADSC, e de $22,75 \pm 2,2$ dias no grupo que recebeu ilhotas sozinhas. A mediana do tempo para a cura do diabetes foi de 28 e 24,5 dias (ilhotas + ADSC *versus* ilhotas sozinhas).

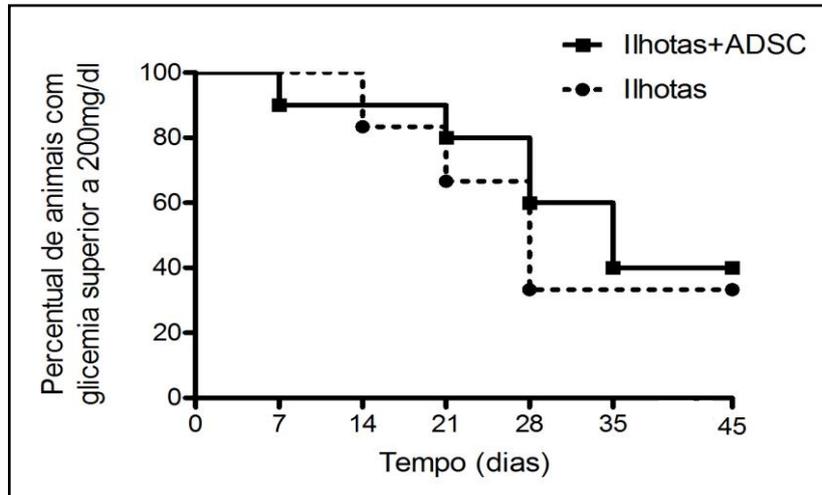


Figura 8. Gráfico do percentual de animais que permaneceram diabéticos (concentração de glicose sanguínea acima de 200 mg/dL), após o transplante de 150 ilhotas sozinhas (traço pontilhado) ou 150 ilhotas + $2,5 \times 10^5$ células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (traço contínuo) (Teste Log-rank/Mantel-Cox).

Quando somente os animais curados foram analisados, ao observar a curva de reversão de ambos os grupos, percebemos uma antecipação do fenômeno de redução da glicemia no grupo que recebeu ilhotas + ADSC, no sétimo dia após o transplante (figura 9). A diminuição da glicemia no grupo que recebeu o co-transplante de ilhotas com ADSC, em comparação com o grupo que recebeu somente ilhotas, no dia 07, foi estatisticamente significativa ($357,0 \pm 45,20$ mg/dL para ilhotas + ADSC *versus* $464,1 \pm 35,07$ mg/dL para ilhotas; $p < 0,05$; Teste t de Student unicaudal).

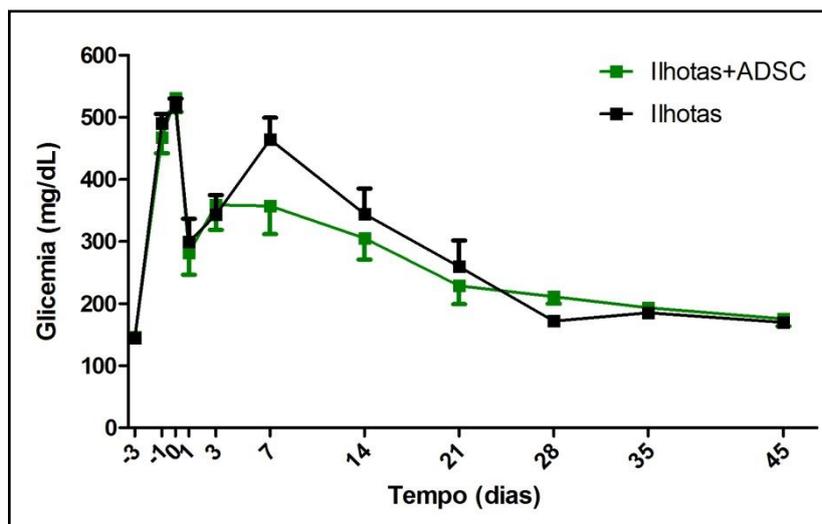


Figura 9. Gráfico da concentração de glicose sanguínea de camundongos curados transplantados com 150 ilhotas sozinhas (linha preta) ou co-transplantados com 150 ilhotas + $2,5 \times 10^5$ células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (linha verde), ao longo de 45 dias (ANOVA bifatorial com correção de Bonferroni).

Com relação ao peso, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais, em nenhum dos pontos analisados (ANOVA bifatorial com correção de Bonferroni) (figura 10). Quando somente os animais curados foram analisados, percebeu-se um ganho de peso durante o período de monitoramento, evidenciado pela média, no dia 0, de $23,9 \pm 0,8$ e $24,6 \pm 0,9$ gramas, para ilhotas + ADSC e ilhotas sozinhas, respectivamente, e de $25,7 \pm 0,9$ e $26,3 \pm 0,7$ gramas, para os mesmos grupos, no dia 45. Este processo de engorda é usual em animais saudáveis, em decorrência do seu envelhecimento.

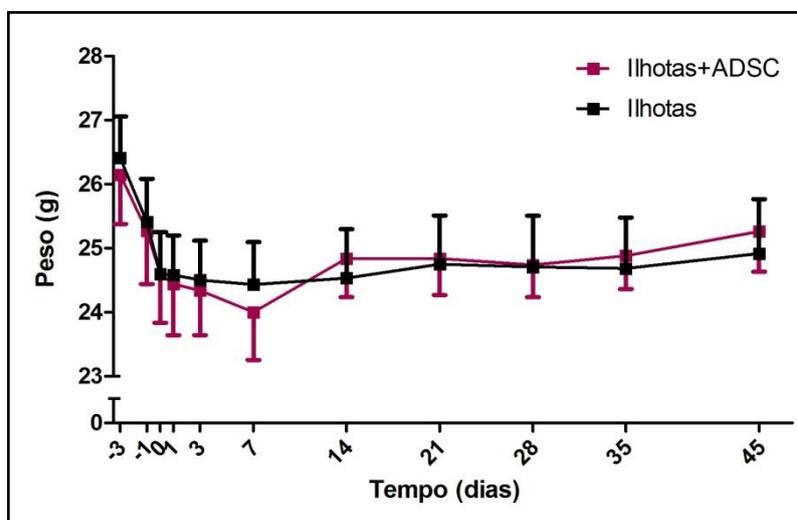


Figura 10. Gráfico do peso de camundongos transplantados com 150 ilhotas sozinhas (linha preta) ou co-transplantados com 150 ilhotas + $2,5 \times 10^5$ células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (linha magenta), ao longo de 45 dias (ANOVA bifatorial com correção de Bonferroni).

Após os 45 dias de monitoramento, todos os animais que alcançaram a reversão do diabetes em ambos os grupos (animais curados) foram submetidos à nefrectomia (NT) do órgão esquerdo, onde fora realizado o transplante. Os valores de glicemia confirmam a funcionalidade das ilhotas transplantadas, já que, dois dias após a retirada do rim, os animais nefrectomizados alcançaram uma média glicêmica de $515,6 \pm 20,8$ mg/dL, em comparação com a média pré-nefrectomia de $172,1 \pm 5,6$ mg/dL ($p < 0,01$; Teste t de Student) (figura 11).

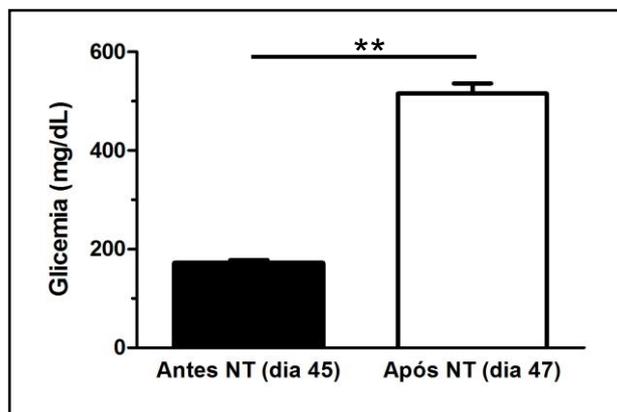


Figura 11. Gráfico da diferença na concentração de glicose sanguínea dos animais curados (n=14), antes ($172,1 \pm 5,6$ mg/dL) e dois dias depois ($515,6 \pm 20,8$ mg/dL) da nefrectomia (NT) do órgão onde fora realizado o transplante ($p < 0,01$; Teste t de Student).

É importante ressaltar que não foram observados características comportamentais ou sinais de desconforto físico nos animais experimentais, durante todo o período do estudo.

Nos rins preparados para histologia com parafina, cujos cortes foram realizados em micrótomo, foram feitas colorações com Hematoxilina-Eosina para avaliar a área de transplante. A morfologia encontrada, através da coloração com HE, torna bastante visível a presença das ADSC entre as ilhotas, no grupo que recebeu o co-transplante, em comparação com o grupo que recebeu somente ilhotas (figuras 12A e 12B). Já a imunohistoquímica dos rins confirmou a expressão de insulina e glucagon pelas células das ilhotas transplantadas e a manutenção da distribuição celular típica de ilhotas murinas: células β produtoras de insulina no centro (figuras 12C e 12D) e células α produtoras de glucagon na periferia (figura 12E e 12F).

Conforme descrito na metodologia, alguns órgãos foram preparados para cortes em criostato, para confirmar a presença das ADSC, nos grupos em que se realizou o co-transplante. Desta forma, quando expostos ao microscópio de fluorescência, os cortes evidenciaram a presença das células-tronco adiposo-derivadas através da expressão da proteína verde fluorescente (GFP) (figura 13B).

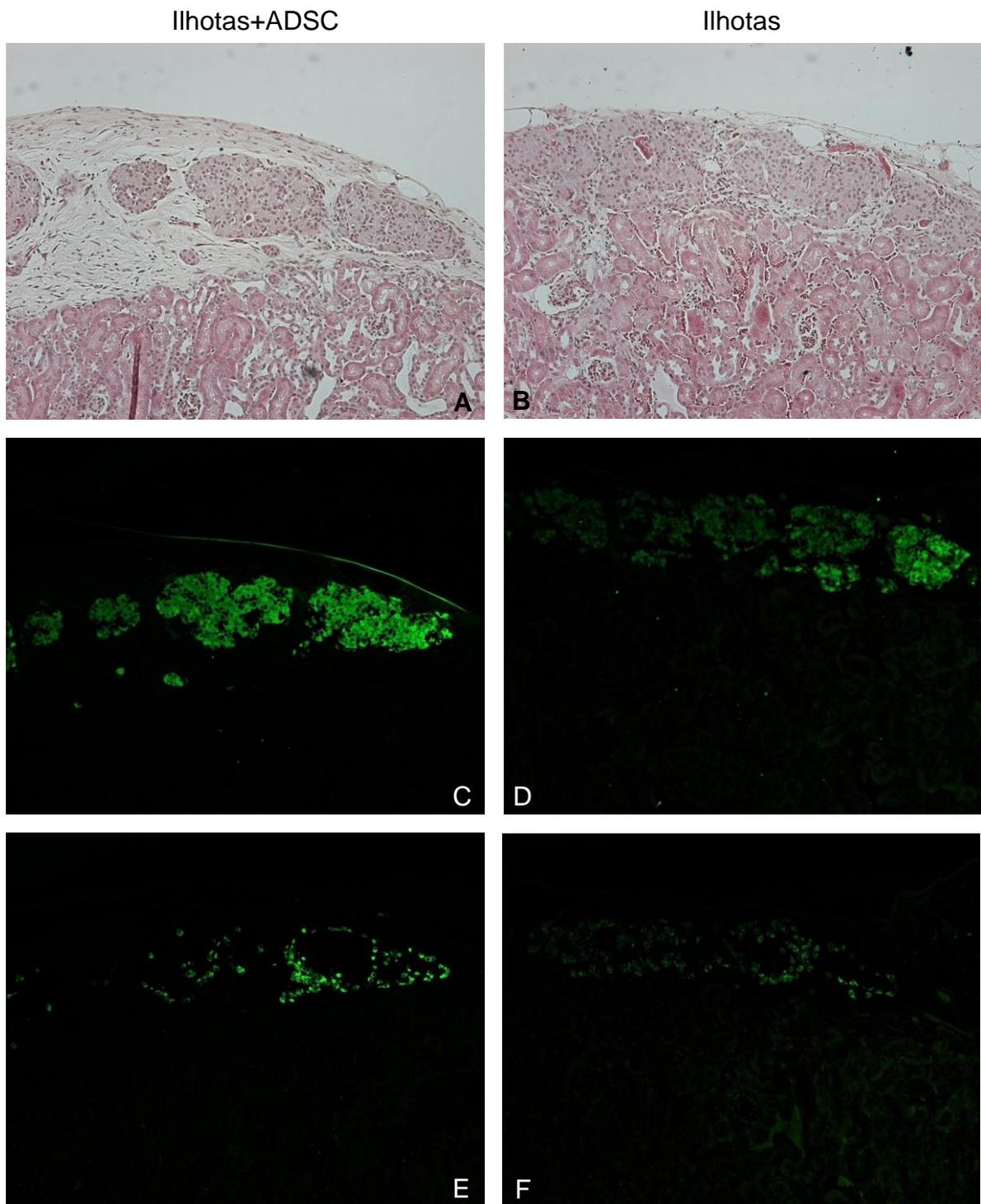


Figura 12. Fotomicrografias dos cortes de rins transplantados com ilhotas + $2,5 \times 10^5$ células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo GFP⁺ (coluna da esquerda) e somente ilhotas (coluna da direita), 45 dias após o transplante. A e B) Coloração com HE; C e D) Imunofluorescência da insulina nas células β das ilhotas; E e F) Imunofluorescência do glucagon nas células α das ilhotas. Aumento de 50 \times .

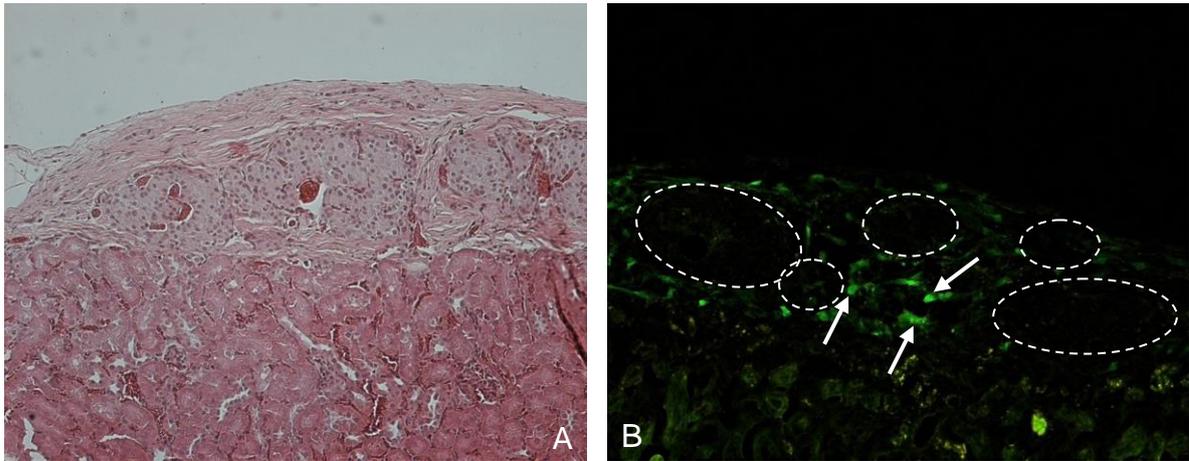


Figura 13. Fotomicrografias dos cortes de rins co-transplantados com ilhotas + $2,5 \times 10^5$ células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo GFP⁺, 45 dias após o transplante. A) Coloração com HE; B) Corte em criostato evidenciando as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo GFP⁺ (setas), entre as ilhotas (representadas pelas elipses pontilhadas). Aumento de 100×.

6. DISCUSSÃO

Ao fazer a revisão bibliográfica em busca de estudos semelhantes ao apresentado neste trabalho, pouquíssimas publicações são encontradas, já que são muitas as variáveis envolvidas. Figliuzzi e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do co-transplante singeneico de uma quantidade limítrofe de ilhotas pancreáticas com MSC isoladas a partir de medula óssea, sob a cápsula renal de ratos Lewis, em modelo de diabetes induzido por STZ. Foi observada uma progressiva queda na glicemia dos animais co-transplantados, o que não ocorreu com os animais transplantados apenas com ilhotas. Os autores atribuem a melhora ao aumento da vascularização do enxerto, já que análises histológicas identificaram um aumento médio de 38% na quantidade de capilares no grupo co-transplantado com MSC.

Já no estudo de Rackham e colaboradores (2011), foi avaliado o efeito do co-transplante singeneico de uma quantidade limítrofe de ilhotas pancreáticas com MSC isoladas a partir de rim, sob a cápsula renal de camundongos C57Bl/6, em modelo de diabetes induzido por STZ. Um mês após o transplante, apenas 8% dos animais co-transplantados não haviam revertido para a normoglicemia, em comparação com 58% dos animais que receberam somente ilhotas. Os autores atribuem a melhora significativa na sobrevivência e na função do transplante à secreção de fatores angiogênicos pelas MSC, favorecendo o aumento da vascularização, hipótese comprovada através de análise histológica. A maior frequência de células endoteliais não só favorece um melhor fluxo sanguíneo, importante para prover nutrientes para as células das ilhotas transplantadas, sinalizar a necessidade de insulina através da glicose circulante e carregar a insulina produzida para a circulação periférica, mas também proporciona interações parácrinas entre as células endoteliais e as células β pancreáticas, importantes para a manutenção da sua funcionalidade.

Novamente considerando o percentual de animais co-transplantados que se mantinham diabéticos, aos 30 dias do estudo, mas agora comparando os resultados descritos acima com o experimento desenvolvido neste trabalho de mestrado, encontramos uma diferença bastante significativa: 8% *versus* 60%, respectivamente, de animais com glicemia superior a 200 mg/dL, ou seja, diabéticos. O percentual de animais não-revertidos encontrado em nosso estudo, para os animais co-transplantados (60%), foi muito

semelhante ao percentual encontrado no estudo de Rackham e colaboradores, para os animais que receberam somente ilhotas (58%). Desta forma, pode-se supor que as ADSC utilizadas em nosso estudo não foram eficientes em promover um aumento no percentual de animais curados. Isto comprova-se também pela comparação entre os grupos experimentais (ilhotas *versus* ilhotas + ADSC) desta dissertação, ao final dos 45 dias de experimento. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os 33% de animais não-revertidos do grupo que recebeu somente ilhotas e os 40% de animais não-revertidos do grupo que recebeu ilhotas co-transplantadas com ADSC.

Tendo em vista que todas as variáveis envolvidas neste trabalho foram extremamente controladas e que a metodologia aplicada foi igual à utilizada por Rackham e colaboradores, as diferentes fontes a partir das quais as células-tronco mesenquimais utilizadas nos dois estudos foram isoladas destacam-se como alternativa para justificar tamanha diferença entre os resultados. Embora ambos os grupos de pesquisa tenham confirmado a identidade de MSC das células utilizadas através dos critérios básicos para caracterizá-las – aderência ao plástico, imunofenotipagem e diferenciação adipo e osteogênica –, não descarta-se a possibilidade de que estas células tenham características individuais, determinadas pelo tecido/órgão de origem.

Poucos são os estudos que comparam o padrão de expressão de moléculas relacionadas ao fenótipo tronco (“*stemness*”) em MSC derivadas de diferentes tecidos e órgãos. O perfil de expressão dessas moléculas pode ser preditivo do potencial terapêutico das MSC de diferentes origens. Como exemplo, surge a molécula de adesão caracterizada pelo marcador de superfície CD44, que sabe-se ser expresso em inúmeras isoformas, cujas frequências variam entre MSC de diferentes origens. A expressão diferencial determinaria um maior ou menor potencial para o processo de *homing* das MSC, já que esta molécula está diretamente relacionada a migração e adesão celular e interação célula-célula (Peroni *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos realizados compara MSC de maior potencial em uso clínico, ou seja, as derivadas de medula óssea, tecido adiposo e tecidos neonatais, como a placenta e sangue de cordão umbilical. Nestes casos, alguns autores sugerem que as diferenças, quando encontradas, são irrelevantes, ou seja, as células destas origens têm seu perfil de expressão de moléculas envolvidas no desenvolvimento tecidual, homeostase e reparo tecidual bastante semelhante (Peroni *et al.*, 2007; Hass *et al.*, 2011; Ranera *et al.*, 2011).

Em outros casos, como no estudo de Peng e colaboradores (2008), foram encontradas diferenças significativas nos níveis de expressão de fatores angiogênicos, entre MSC derivadas de tecido adiposo, medula óssea e cartilagem. Sendo assim, as MSC apresentam expressão diferencial de várias citocinas angiogênicas, como VEGF (*vascular endothelial growth factor*), IGF (*insulin-like growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*), Ang-1 (*angiopoietin-1*) e SCF (*stem cell factor*). O autor também relata que, conforme aumenta o número de passagens, decrescem os níveis de expressão destas citocinas. Os diferentes níveis de expressão de fatores angiogênicos em MSC oriundas de tecidos variados podem interferir no potencial vasculogênico de destas células.

Raicevic e colaboradores (2011) mimetizaram um ambiente inflamatório constituído por meio suplementado com IL-1 β , TNF- α , IFN- α e IFN- γ e expuseram MSC derivadas de medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical a esta condição. Foi identificada uma mudança quantitativa no padrão de expressão de TLR nas MSC de diferentes origens. A expressão de TLR2 e TLR3 foi aumentada nos três tipos celulares, enquanto que o TLR4 teve sua expressão muito elevada em MSC de medula óssea e ausente em MSC de cordão umbilical. Os diferentes níveis de expressão de TLR em MSC oriundas de tecidos variados podem interferir no potencial imunomodulatório destas células.

Desta forma, mais estudos comparativos sobre o perfil molecular de diferentes populações de MSC devem ser realizados, avaliando o padrão de expressão de moléculas de adesão, citocinas/quimiocinas, inibidores de quinases dependentes de ciclina, fatores de crescimento, entre outros elementos essenciais para o uso das MSC em terapia celular.

A frequência de células-tronco mesenquimais em tecidos como a medula óssea ou o tecido adiposo, que são fortes candidatos quando se desenvolve estudos visando futuras aplicações clínicas, é bastante baixa, tornando necessária a sua expansão *in vitro* por semanas, ou até meses. Este processo de expansão pode resultar em efeitos indesejados, como a perda das características de célula-tronco, como a plasticidade e secreção de fatores, além de processos de senescência e instabilidade genética (Meirelles & Nardi, 2009).

Com relação ao padrão de expressão de moléculas relacionadas ao fenótipo tronco (“stemness”) em MSC com diferentes tempos de cultivo, mais estudos são encontrados. Peroni e colaboradores (2007) concluíram que, em cultivos de longa duração, os níveis de expressão de algumas moléculas de adesão associadas ao processo de *homing*, como CD44 e CD29 (β 1 integrina), aumentam, ao contrário de elementos que sinalizam o status indiferenciado destas células, como UTF-1 (*undifferentiated embryonic cell transcription factor-1*) e Nodal (*Nodal homolog - mouse*), que têm sua expressão reduzida com o passar do tempo de cultivo, o que nos leva a crer que exista um processo de diferenciação espontânea em cultura. Com base nisto, as ADSC utilizadas neste trabalho de mestrado estavam entre as passagens P3 e P4, período em que já está estabelecida uma população celular homogênea, e no qual a expressão de fatores parácrinos está o mais próxima possível dos níveis apresentados originalmente por estas células.

Outro fator que pode ser responsável por variações nos níveis de expressão de marcadores é a densidade celular presente no cultivo, ou seja, o percentual de confluência das células em cultura (Kaltz *et al.*, 2010). Esta variável é facilmente ajustável, do ponto de vista do cultivo celular. Em contrapartida, deve ser melhor estudada para esclarecer o comportamento das MSC, quando estas são aplicadas em ensaios *in vivo*, já que, quando a injeção das células não é sistêmica, mas *in situ* como neste trabalho, forma-se uma rede tridimensional de células-tronco mesenquimais, com forte interação célula-célula. Este microambiente é tão diferente da placa de cultivo, quanto do nicho a partir do qual as MSC foram inicialmente isoladas.

Outras questões importantes devem ser levantadas, quando pensamos na injeção *in situ* das células-tronco adiposo-derivadas utilizadas neste estudo. Logo após o transplante, as células, assim como as ilhotas pancreáticas, encontram um ambiente hostil, caracterizado pela baixa tensão de oxigênio, um ambiente isquêmico. Deve-se ter em mente que muitas das células infundidas podem ser perdidas no período pós-transplante. E que, o que impede a perda total das células são os fatores secretados por elas mesmas. Então, deve haver um balanço entre a resistência à apoptose, evitando a perda de células, e secreção de fatores angiogênicos, garantindo um aporte de nutrientes para as mesmas.

Além da condição inicial de pouca vascularização, neste modelo de diabetes, as células encontram um ambiente com altas concentrações de glicose sanguínea, em média $512,1 \pm 12,1$ mg/dL, em nosso estudo. Conforme abordado na introdução, a alta

concentração de glicose sanguínea está associada a efeitos deletérios na função e na capacidade proliferativa de células endoteliais e mesangiais, o que se reflete em danos em inúmeros órgãos. Desta forma, as complicações vasculares que surgem no diabetes estão associadas à deterioração da função vasculogênica de células progenitoras endoteliais (Kim *et al.*, 2011b). Da mesma forma, podemos pensar que inúmeros outros progenitores responsáveis pela reposição natural das células nos tecidos do organismo são afetados pelas altas taxas glicêmicas, como, por exemplo, as células-tronco mesenquimais de diversos tecidos e órgãos. Kim e colaboradores (2008) expuseram células-tronco adiposo-derivadas de humanos e ratos a meio de cultivo contendo altos níveis de glicose e observaram uma redução na capacidade proliferativa *in vitro* e no potencial angiogênico *in vivo* das ADSC, devido à produção de espécies reativas de oxigênio, que, a longo prazo, causam modificações fenotípicas nestas células.

Outro estudo mais recente, do mesmo grupo de pesquisa, identificou um aumento na expressão do miR-486-5p em ADSC humanas, quando estas foram expostas a meio de cultivo com alta concentração de glicose. Este micro RNA atua como inibidor da desacetilase SIRT1, que desempenha um papel importante na regulação de condições patológicas crônicas, como o diabetes e doenças relacionadas ao envelhecimento. O aumento da expressão do miR-486-5p e a diminuição da expressão da SIRT1, em resposta a altas concentrações de glicose, resultou em inibição da proliferação das ADSC. Os autores afirmam que outros estudos indicam que os níveis da SIRT1 encontram-se reduzidos em células progenitoras endoteliais, quando da exposição a altos níveis de glicose e, também, em tecido adiposo de pacientes diabéticos. Além disso, a expressão de SIRT1 está relacionada à sensibilidade à insulina em pacientes com diabetes tipo 2. Estes dados confirmam o envolvimento da SIRT1 na homeostase da glicose, podendo ser um dos processos que justifique para a redução da função de progenitores endoteliais e ADSC, sob altas concentrações de glicose, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Kim *et al.*, 2011b).

Cramer e colaboradores (2010) identificaram reduções na taxa proliferativa, além da redução no potencial de diferenciação osteogênica e condrogênica, e aumento das taxas de senescência e do percentual de apoptose, em ADSC humanas expostas à alta concentração de glicose em cultura. Os pesquisadores avaliaram também os padrões de expressão gênica de moléculas envolvidas nas rotas de receptores/canais/transportadores celulares, receptores nucleares, enzimas metabólicas, fatores secretados, transdução de

sinais e fatores de transcrição, nas ADSC, e concluíram que a hiperglicemia perturba significativamente os níveis de expressão destes elementos atuantes no metabolismo intermediário. Muitos destes genes estão envolvidos na patogênese do diabetes, já que alterações na sua expressão, na presença de níveis aumentados de glicose, estão envolvidos no processo de resistência à insulina, muito comum em pacientes com diabetes tipo 2.

Levando em consideração o exposto acima, somado aos resultados encontrados em nosso trabalho, quanto ao comportamento de reversão do diabetes e às condições histológicas presentes nos cortes, no grupo co-transplantado com ilhotas pancreáticas e ADSC, podemos sugerir algumas reflexões.

Primeiro, embora a presença das ADSC não tenha aumentado a eficiência dos transplantes, ou seja, não tenha contribuído para que mais animais revertissem o diabetes, em comparação com o grupo que recebeu somente ilhotas, ao observar a curva de reversão dos animais curados em ambos os grupos, percebemos uma clara antecipação do fenômeno de redução da glicemia, no sétimo dia após o transplante. Esta diferença entre a glicemia dos dois grupos foi estatisticamente significativa ($357,0 \pm 45,20$ mg/dL para ilhotas + ADSC *versus* $464,1 \pm 35,07$ mg/dL para ilhotas; $P < 0,05$) e poderia ser explicada com base no efeito parácrino das ADSC. Através da secreção de citocinas angiogênicas, estas células podem ter facilitado a formação da rede de capilares, tão importante para a sobrevivência do transplante e, principalmente, para sua funcionalidade. Sendo assim, o processo que deu-se naturalmente, porém de forma mais lenta, no grupo que recebeu somente ilhotas, foi favorecido e acelerado pela presença das ADSC. Para confirmar esta hipótese, seria necessária a realização de um estudo nos mesmos moldes apresentados neste, mas avaliando a presença e a frequência de capilares no tecido transplantado, no sétimo dia pós-transplante.

Segundo, através das imagens que confirmam a presença de ADSC GFP⁺ circundando as ilhotas, no grupo do co-transplante, pode-se afirmar não só que estas células mantiveram-se presentes, mesmo após os 45 dias de experimento, mas também que qualquer efeito observado deve-se provavelmente à presença das células exercendo seu efeito parácrino sobre as demais células-tronco mesenquimais e sobre as ilhotas pancreáticas. Desta forma, pode-se inferir que não há indícios de transdiferenciação das células-tronco mesenquimais em outro tipo celular, como células produtoras de insulina,

por exemplo. Para confirmar esta suposição, análises histológicas complementares são necessárias, para certificar a ausência da expressão de insulina pelas ADSC GFP⁺.

Terceiro, percebemos que o co-transplante de ilhotas com ADSC não trouxe vantagens, quanto ao percentual de eficácia do transplante, em comparação com o grupo que recebeu somente ilhotas. Pode-se especular, com base nos estudos que exploram a sensibilidade das MSC a altos níveis glicêmicos, que ocorre um balanço extremamente sensível no enxerto, nos momentos iniciais pós-transplante. As ADSC ficam expostas a altas glicemias e, a menos que as ilhotas restaurem seu padrão natural de secreção de insulina rapidamente, pode haver um bloqueio das funções benéficas das ADSC, como o efeito pró-angiogênico (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011b). Vale lembrar que estudos afirmam que a presença de insulina é capaz de reverter alguns efeitos negativos sobre o potencial regenerativo das MSC expostas a altas concentrações de glicose, somente quando estas foram expostas à hiperglicemia em um espaço curto de tempo (Kim *et al.*, 2008, Cramer *et al.*, 2010). Sabe-se também que o processo de restabelecimento da funcionalidade das ilhotas é bastante complexo, já que a glicemia elevada exerce efeitos deletérios também sobre as células β , em diferentes pontos da sequência de eventos metabólicos que conectam o aumento da concentração de glicose extracelular e a secreção de insulina. As alterações na função secretória das células β são justificadas por modificações na capacidade de detecção e de metabolização da glicose, aumento da apoptose e dificuldades no manejo do cálcio citosólico, essencial para a exocitose de vesículas de insulina (Dubois *et al.*, 2007).

Desta forma, deve haver um limiar nos níveis de glicemia, dentro do qual o funcionamento das ADSC e das ilhotas pancreáticas transplantadas está garantido. Além disso, parece haver um processo de duas vias em que as ilhotas, quando funcionais, favorecem a redução da glicemia à qual as ADSC estão expostas e, em contrapartida, as ADSC tornam o ambiente ao qual as ilhotas estão expostas mais favorável à sua sobrevivência, melhorando a vascularização local, protegendo as células de eventos de apoptose e, possivelmente, favorecendo a proliferação celular.

Conclusivamente, podemos afirmar que as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo utilizadas neste estudo não foram capazes de aumentar a taxa de cura do transplante de ilhotas pancreáticas singeneicas, quando co-transplantadas juntamente com estas, sob a cápsula renal de camundongos diabéticos. Estes resultados vão na contramão

dos encontrados em outros estudos com metodologia semelhante. A principal variável entre eles são as MSC utilizadas, isoladas a partir de diferentes fontes. Desta forma, mais estudos comparativos sobre o potencial terapêutico de MSC de diferentes origens destacam-se como necessários. O co-cultivo de ilhotas pancreáticas com MSC *in vitro* é uma alternativa interessante para avaliar o efeito da presença destas células sobre as ilhotas e pode facilitar a escolha da melhor fonte para as células utilizadas em modelos pré-clínicos de co-transplante.

7. REFERÊNCIAS

Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH (2008) Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 57(7):1759-1767.

Aggarwal S, Pittenger MF (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105(4):1815-1822.

American Diabetes Association (www.diabetes.org/) – Acesso em 15/10/2011.

American Diabetes Association (2011) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 34(1):S62-S69.

Baetens D, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Orci L (1979) Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. *Science* 14;206(4424):1323-1325.

von Bahr L, Sundberg B, Lönnies L, Sander B, Karbach H, Hägglund H, Ljungman P, Gustafsson B, Karlsson H, Le Blanc K, Ringdén O (2011) Long-Term Complications, Immunologic Effects, and Role of Passage for Outcome in Mesenchymal Stromal Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Aug 4. [Epub ahead of print]

Balda CA, Pacheco-Silva A (1999) Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. *RAMB* 45(2):175-180.

Bansal P, Wang Q (2008) Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(4):E751-761.

Bennet W, Groth CG, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O (2000) Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci* 105(2):125-133.

Berman DM, Willman MA, Han D, Kleiner G, Kenyon NM, Cabrera O, Karl JA, Wiseman RW, O'Connor DH, Bartholomew AM, Kenyon NS (2010) Mesenchymal stem cells enhance allogeneic islet engraftment in nonhuman primates. *Diabetes* 59(10):2558-2568.

Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ (2000) *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(14):7999-8004.

Bonner-Weir S, Weir GC (2005) New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol* 23(7):857-861.

Borg DJ, Bonifacio E (2011) The use of biomaterials in islet transplantation. *Curr Diab Rep* 11(5):434-444.

Borowiak M, Melton DA (2009) How to make beta cells? *Curr Opin Cell Biol* 21(6):727-732.

Boumaza I, Srinivasan S, Witt WT, Feghali-Bostwick C, Dai Y, Garcia-Ocana A, Feili-Hariri M (2009) Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. *J Autoimmun* 32(1):33-42.

BRASIL. Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências.

Bretzel RG, Eckhard M, Brendel MD (2004) Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Panminerva Med* 46(1):25-42.

Brilot F, Geenen V (2005) Role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Rev Med Liege* 60(5-6):297-302.

Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC (2005) Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53(9):1087-1097.

Buschard K (2011) What causes type 1 diabetes? Lessons from animal models. *APMIS Suppl* 119 132:1-19.

Buschard K, Hastrup N, Rygaard J (1983) Virus-induced diabetes mellitus in mice and the thymus-dependent immune system. *Diabetologia* 24(1):42-46.

Campbell PM, Senior PA, Salam A, Labranche K, Bigam DL, Kneteman NM, Imes S, Halpin A, Ryan EA, Shapiro AM (2007) High risk of sensitization after failed islet transplantation. *Am J Transplant* 7(10):2311-2317.

Cantarelli E, Piemonti L (2011) Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts. *Curr Diab Rep* 11(5):364-374.

Chagastelles PC, Nardi NB, Camassola M (2010) Biology and applications of mesenchymal stem cells. *Sci Prog* 93(Pt 2):113-127.

Christoffersson G, Henriksnäs J, Johansson L, Rolny C, Ahlström H, Caballero-Corbalan J, Segersvärd R, Permert J, Korsgren O, Carlsson PO, Phillipson M (2010) Clinical and experimental pancreatic islet transplantation to striated muscle: establishment of a vascular system similar to that in native islets. *Diabetes* 59(10):2569-2578.

Conway BN, Miller RG, Klein R, Orchard TJ (2009) Prediction of proliferative diabetic retinopathy with hemoglobin level. *Arch Ophthalmol* 127(11):1494-1499.

Couri CE, Voltarelli JC (2009) Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus: a review of recent clinical trials. *Diabetol Metab Syndr* 1(1):19.

Courtney ML, Jones PM, Burns CJ (2010) Importance of quantitative analysis in the generation of insulin-expressing cells from human embryonic stem cells. *Pancreas* 39(1):105-107.

Cramer C, Freisinger E, Jones RK, Slakey DP, Dupin CL, Newsome ER, Alt EU, Izadpanah R (2010) Persistent high glucose concentrations alter the regenerative potential of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 19(12):1875-1884.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008) In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26(9):2287-2299.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119(Pt 11):2204-2213.

Davani B, Ikonomidou L, Raaka BM, Geras-Raaka E, Morton RA, Marcus-Samuels B, Gershengorn MC (2007) Human islet-derived precursor cells are mesenchymal stromal cells that differentiate and mature to hormone-expressing cells *in vivo*. *Stem Cells* 25(12):3215-3222.

de Souza YE, Chaib E, de Lacerda PG, Crescenzi A, Bernal-Filho A, D'Albuquerque LA (2011) Islet transplantation in rodents. Do encapsulated islets really work? *Arq Gastroenterol* 48(2):146-152.

Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS (2004) Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* 328(7442):750-754.

Ding Y, Xu D, Feng G, Bushell A, Muschel RJ, Wood KJ (2009) Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes* 58(8):1797-1806.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4):315-317.

Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD (2000) Vascular complications of diabetes. *BMJ* 320: 1062-1066.

Donovan PJ, Gearhart J (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414(6859):92-97.

Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Prato SD, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P (2007) Cocksackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(12):5115-5120.

Dubois M, Vacher P, Roger B, Huyghe D, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Pattou F, Moustaid-Moussa N, Lang J (2007) Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis. *Endocrinology* 148(4):1605-1614.

Dyck PJ, Carter RE, Litchy WJ (2011) Modeling nerve conduction criteria for diagnosis of diabetic polyneuropathy. *Muscle Nerve* 44(3):340-345.

Efrat S (2004) Generation of surrogate beta cells from tissue stem cells. *Curr Diab Rep* 4(4):298-303.

Eliaschewitz FG, Franco DR, Mares-Guia TR, Noronha IL, Labriola L, Sogayar MC (2009) Islet transplantation as a clinical tool: present state and future perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(1):15-23.

Esni F, Täljedal IB, Perl AK, Cremer H, Christofori G, Semb H (1999) Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *J Cell Biol* 144(2):325-337.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003) Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26:S5-20.

Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, Carpio D, Yañez AJ, Conget PA (2008) Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 14(6):631-640.

Federação Internacional do Diabetes (2010) Atlas do Diabetes, 4ª edição. (www.diabetesatlas.org/) – Acesso em 17/10/2011.

Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, Rota C, Morigi M, Remuzzi G, Remuzzi A, Benigni A (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplant Proc* 41(5):1797-1800.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3(4):393-403.

Giordano A, Galderisi U, Marino IR (2007) From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 211(1):27-35.

Gale EA (2002) Can we change the course of beta-cell destruction in type 1 diabetes? *N Engl J Med* 346(22):1740-1742.

Goldberg E, Krause I (2009) Infection and type 1 diabetes mellitus - a two edged sword? *Autoimmun Rev* 8(8):682-686.

Golocheikine A, Tiriveedhi V, Angaswamy N, Beshoff N, Sabarinathan R, Mohanakumar T (2010) Cooperative signaling for angiogenesis and neovascularization by VEGF and HGF following islet transplantation. *Transplantation* 90(7):725-731.

Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M (1998) Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *New Engl J Med* 339:229-234.

Ham AW (1963) *Histologia*. Livraria Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 848p.

Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F (2009) Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 94(2):258-263.

Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R (2011) Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9:12.

Hering BJ, Kandaswamy R, Ansite JD, Eckman PM, Nakano M, Sawada T, Matsumoto I, Ihm SH, Zhang HJ, Parkey J, Hunter DW, Sutherland DE (2005) Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA* 293(7):830-835.

Herold KC, Gitelman SE, Masharani U, Hagopian W, Bisikirska B, Donaldson D, Rother K, Diamond B, Harlan DM, Bluestone JA (2005) A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54(6):1763-1769.

Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, Gitelman SE, Harlan DM, Xu D, Zivin RA, Bluestone JA (2002) Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346(22):1692-1698.

Honeyman MC, Stone NL, Falk BA, Nepom G, Harrison LC (2010) Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. *J Immunol* 184(4):2204-2210.

Ito T, Itakura S, Todorov I, Rawson J, Asari S, Shintaku J, Nair I, Ferreri K, Kandeel F, Mullen Y (2010) Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function. *Transplantation* 89(12):1438-1445.

Jacobson S, Kumagai-Braesch M, Tibell A, Svensson M, Flodström-Tullberg M (2008) Co-transplantation of stromal cells interferes with the rejection of allogeneic islet grafts. *Ann NY Acad Sci* 1150:213-216.

Johansson H, Lukinius A, Moberg L, Lundgren T, Berne C, Foss A, Felldin M, Källen R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Ekdahl KN, Elgue G, Korsgren O, Nilsson B (2005)

Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes* 54(6):1755-1762.

Johansson U, Elgue G, Nilsson B, Korsgren O (2005) Composite islet-endothelial cell grafts: a novel approach to counteract innate immunity in islet transplantation. *Am J Transplant* 5(11):2632-2639.

Junqueira LC, Carneiro J (1999) *Histologia Básica*. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 427p.

Kaltz N, Ringe J, Holzwarth C, Charbord P, Niemeyer M, Jacobs VR, Peschel C, Häupl T, Oostendorp RA (2010) Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. *Exp Cell Res* 316(16):2609-2617.

Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S (2007) Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells* 25(11):2837-2844.

Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, Gorus F, Goldman M, Walter M, Candon S, Schandene L, Crenier L, De Block C, Seigneurin JM, De Pauw P, Pierard D, Weets I, Rebello P, Bird P, Berrie E, Frewin M, Waldmann H, Bach JF, Pipeleers D, Chatenoud L (2005) Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 352(25):2598-2608.

Kim HK, Kim YJ, Kim JT, Kwon CH, Kim YK, Bae YC, Kim DH, Jung JS (2008) Alterations in the proangiogenic functions of adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic rats. *Stem Cells Dev* 17(4):669-680.

Kim YH, Wee YM, Choi MY, Lim DG, Kim SC, Han DJ (2011) Interleukin (IL)-10 induced by CD11b(+) cells and IL-10-activated regulatory T cells play a role in immune modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allografts. *Mol Med* 17(7-8):697-708.

Kim YJ, Hwang SH, Lee SY, Shin KK, Cho HH, Bae YC, Jung JS (2011) miR-486-5p induces replicative senescence of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and its expression is controlled by high glucose. *Stem Cells Dev*. 2011 Oct 11. [Epub ahead of print]

Kolb K, Mandrup-Poulsen T (2005) An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia* 48(6):1038-1050.

Kover K, Tong PY, Pacicca D, Clements M, Bodker AM, Eidson C, Sheldon M, Southard A, Zaidi A, Moore WV (2011) Bone marrow cavity: a supportive environment for islet engraftment. *Islets* 3(3):93-101.

Kulmala P (2003) Prediabetes in children: natural history, diagnosis, and preventive strategies. *Paediatr Drugs* 5(4):211-221.

Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ (2006) Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(46):17438-17443.

Li FR, Wang XG, Deng CY, Qi H, Ren LL, Zhou HX (2010) Immune modulation of co-transplantation mesenchymal stem cells with islet on T and dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 161(2):357-363.

Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Filì L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, Maggi L, Pasini A, Lisi V, Santarlasci V, Consoloni L, Angelotti ML, Romagnani P, Parronchi P, Krampera M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F (2008) Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells* 26(1):279-289.

Liu E, Eisenbarth GS (2002) Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 31:391-410.

Longoni B, Szilagyi E, Quaranta P, Paoli GT, Tripodi S, Urbani S, Mazzanti B, Rossi B, Fanci R, Demontis GC, Marzola P, Saccardi R, Cintonino M, Mosca F (2010) Mesenchymal stem cells prevent acute rejection and prolong graft function in pancreatic islet transplantation. *Diabetes Technol Ther* 12(6):435-446.

Loon NR (2003) Diabetic kidney disease: preventing dialysis and transplantation. *Clin Diabetes* 21(2):55-62.

Lu Y, Jin X, Chen Y, Li S, Yuan Y, Mai G, Tian B, Long D, Zhang J, Zeng L, Li Y, Cheng J (2010) Mesenchymal stem cells protect islets from hypoxia/reoxygenation-induced injury. *Cell Biochem Funct* 28(8):637-643.

Ludvigsson J, Faresjö M, Hjorth M, Axelsson S, Chéramy M, Pihl M, Vaarala O, Forsander G, Ivarsson S, Johansson C, Lindh A, Nilsson NO, Aman J, Ortqvist E, Zerhouni P, Casas R (2008) GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 359(18):1909-1920.

Ludvigsson J; Linköping Diabetes Immune Intervention study group (2010) Immune intervention in children with type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 10(5):370-379.

Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, Thivolet C (2009) Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia* 52(7):1391-1399.

Maraschin JF, Musussi N, Witter V, Silveiro SP (2010) Diabetes Mellitus Classification. *Arq Bras Cardiol* 95(2):e40-46.

Martins L, Henriques AC, Dias L, Almeida M, Pedroso S, Freitas C, Pereira S, Fructuoso M, Dorés J, Oliveira F, Almeida R, Cabrita A, Teixeira M (2010) Pancreas-kidney

transplantation: complications and readmissions in 9-years of follow-up. *Transplant Proc* 42(2):552-554.

Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Yamada Y, Fukuda K, Tsukiyama K, Suzuki H, Kawasaki Y, Shimodaira M, Matsuoka K, Shibata T, Kasai Y, Maekawa T, Shapiro J, Tanaka K (2005) Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet *allo*transplantation. *Lancet* 365(9471):1642-1644.

Meirelles L da S, Nardi NB (2009) Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci* 14:4281-4298.

Milech A, Oliveira JEP (2004) *Diabetes Mellitus – Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar*. São Paulo: Atheneu.

Moberg L, Johansson H, Lukinius A, Berne C, Foss A, Källén R, Østraat Ø, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Elgue G, Nilsson Ekdahl K, Korsgren O, Nilsson B (2002) Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet* 360(9350):2039-2045.

Moberg L, Korsgren O, Nilsson B (2005) Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood. *Clin Exp Immunol* 142(1):125-131.

Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H (2001) Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 44 Suppl 2:S14-S21.

Nardi NB, Alfonso ZZ (1999) The hematopoietic stroma. *Braz J Med Biol Res* 32(5):601-609.

Nasef A, Ashammakhi N, Fouillard L (2008) Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. *Regen Med* 3(4):531-546.

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (www2.niddk.nih.gov/) – Acesso em 17/10/2011.

Nesselmann C, Ma N, Bieback K, Wagner W, Ho A, Kontinen YT, Zhang H, Hinescu ME, Steinhoff G (2008) Mesenchymal stem cells and cardiac repair. *J Cell Mol Med* 12(5B):1795-1810.

Nir T, Dor Y (2005) How to make pancreatic beta cells--prospects for cell therapy in diabetes. *Curr Opin Biotechnol* 16(5):524-529.

Noguchi H (2011) Pancreas procurement and preservation for islet transplantation: personal considerations. *J Transplant* 2011:783168, 7p.

Obayashi H, Hasegawa G, Fukui M, Kamiuchi K, Kitamura A, Ogata M, Kanaitzuka T, Shigeta H, Kitagawa Y, Nakano K, Nishimura M, Ohta M, Nakamura N (2000) Tumor

necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1*1502 DQB1*0601 allele and anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 85(9):3348-3351.

Ohmura Y, Tanemura M, Kawaguchi N, Machida T, Tanida T, Deguchi T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Matsuura N, Ito T, Nagano H, Doki Y, Mori M (2010) Combined transplantation of pancreatic islets and adipose tissue-derived stem cells enhances the survival and insulin function of islet grafts in diabetic mice. *Transplantation* 90(12):1366-1373.

Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407(3):313-319.

Okita K, Yamanaka S (2011) Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2198-2207.

Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Calafiore R, Chang TM, De Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacić I, Shapiro AM, Pedraz JL (2003) Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med* 9(1):104-107.

Park KS, Kim YS, Kim JH, Choi B, Kim SH, Tan AH, Lee MS, Lee MK, Kwon CH, Joh JW, Kim SJ, Kim KW (2010) Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. *Transplantation* 89(5):509-517.

Park KS, Kim YS, Kim JH, Choi BK, Kim SH, Oh SH, Ahn YR, Lee MS, Lee MK, Park JB, Kwon CH, Joh JW, Kim KW, Kim SJ (2009) Influence of human allogenic bone marrow and cord blood-derived mesenchymal stem cell secreting trophic factors on ATP (adenosine-5'-triphosphate)/ADP (adenosine-5'-diphosphate) ratio and insulin secretory function of isolated human islets from cadaveric donor. *Transplant Proc* 41(9):3813-3818.

Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C (2008) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev* 17(4):761-773.

Pisania A, Weir GC, O'Neil JJ, Omer A, Tchipashvili V, Lei J, Colton CK, Bonner-Weir S (2010) Quantitative analysis of cell composition and purity of human pancreatic islet preparations. *Lab Invest* 90(11):1661-1675.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.

Rackham CL, Chagastelles PC, Nardi NB, Hauge-Evans AC, Jones PM, King AJ (2011) Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia* 54(5):1127-1135.

- Raicevic G, Najar M, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L (2011) The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties. *Cell Immunol* 270(2):207-216.
- Rajab A (2010) Islet transplantation: alternative sites. *Curr Diab Rep* 10(5):332-337.
- Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vázquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martín-Burriel I (2011) Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol* 144(1-2):147-154.
- Reiss N, Kleikamp G, Tenderich G, Tschöpe D, Körfer R (2008) Diabetes mellitus and heart failure - incidence and surgical therapy options. *Herz* 33(3):206-210.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM (2005) Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54(7):2060-2069.
- Sá GP, Sogayar MC, Eliaschewitz FG, Genzini T, Letrinta R, Onari ES, Mantovani M, Labriola L, Matos D, Lopes-Filho GJ, Gonzalez AM, Mares-Guia T (2011) Islet versus pancreas transplantation in Brazil: Defining criteria for pancreas allocation decision. *Islets* 3(6). [Epub ahead of print]
- Salminen K, Sadeharju K, Lönnrot M, Vähäsalo P, Kupila A, Korhonen S, Ilonen J, Simell O, Knip M, Hyöty H (2003) Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J Med Virol* 69(1):91-98.
- Scharfmann R (2003) Alternative sources of beta cells for cell therapy of diabetes. *Eur J Clin Invest* 33(7):595-600.
- Schinköthe T, Bloch W, Schmidt A (2008) *In vitro* secreting profile of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17(1):199-206.
- Senior PA, Zeman M, Paty BW, Ryan EA, Shapiro AMJ (2007) Changes in renal function after clinical islet transplantation: four-year observational study. *Am J Transplant* 7: 91–98.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343(4):230-238.
- Skyler JS, Hollander PA, Jovanovic L, Klioze S, Krasner A, Riese RJ, Reis J, Schwartz P, Duggan W; Inhaled Human Insulin Type 1 Diabetes Study Group (2008) Safety and efficacy of inhaled human insulin (Exubera) during discontinuation and readministration of therapy in adults with type 1 diabetes: A 3-year randomized controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 82(2):238-246.

Skyler JS, Krischer JP, Wolfsdorf J, Cowie C, Palmer JP, Greenbaum C, Cuthbertson D, Rafkin-Mervis LE, Chase HP, Leschek E (2005) Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial - Type 1. *Diabetes Care* 28(5):1068-1076.

Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br>) – Acesso em 30/10/2011.

Solari MG, Srinivasan S, Boumaza I, Unadkat J, Harb G, Garcia-Ocana A, Feili-Hariri M (2009) Marginal mass islet transplantation with autologous mesenchymal stem cells promotes long-term islet *allograft* survival and sustained normoglycemia. *J Autoimmun* 32(2):116-124.

Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, Piemonti L (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 106(2):419-427.

Sordi V, Melzi R, Mercalli A, Formicola R, Doglioni C, Tiboni F, Ferrari G, Nano R, Chwalek K, Lammert E, Bonifacio E, Borg D, Piemonti L (2010) Mesenchymal cells appearing in pancreatic tissue culture are bone marrow-derived stem cells with the capacity to improve transplanted islet function. *Stem Cells* 28(1):140-151.

Stevens RB, Matsumoto S, Marsh CL (2001) Is islet transplantation a realistic therapy for the treatment of type 1 diabetes in the near future? *Clinical Diabetes* 19(2):51-60.

Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H (2004) Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 53(8):2143-2152.

Sweet IR, Gilbert M, Maloney E, Hockenbery DM, Schwartz MW, Kim F (2009) Endothelial inflammation induced by excess glucose is associated with cytosolic glucose-6-phosphate but not increased mitochondrial respiration. *Diabetologia* 52(5):921-931.

Taborsky GJ Jr (2010) The physiology of glucagon. *J Diabetes Sci Technol* 4(6):1338-1344.

Tambascia MA, Geloneze Neto B (2005) Resistência à insulina. Em Godoy-Matos AF, editor. *Síndrome Metabólica*. São Paulo: Atheneu; p.47-53.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8(9):726-736.

Valdes-Gonzalez R, Rodriguez-Ventura AL, White DJ, Bracho-Blanchet E, Castillo A, Ramírez-González B, López-Santos MG, León-Mancilla BH, Dorantes LM (2010) Long-term follow-up of patients with type 1 diabetes transplanted with neonatal pig islets. *Clin Exp Immunol* 162(3):537-542.

- van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL (2007) Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 23(3):169-183.
- Vrijzen KR, Chamuleau SA, Noort WA, Doevendans PA, Sluijter JP (2009) Stem cell therapy for end-stage heart failure: indispensable role for the cell? *Curr Opin Organ Transplant* 14(5):560-565.
- Wagner RT, Lewis J, Cooney A, Chan L (2010) Stem cell approaches for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Transl Res* 156(3):169-179.
- Walker MR, Patel KK, Stappenbeck TS (2009) The stem cell niche. *J Pathol* 217(2):169-180.
- Wang J, Wang QH, Xia T, Tan JM (2011) Is islet transplantation ready for widespread use in diabetes? *Chin Med J (Engl)* 124(6):935-938.
- Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG (2009) Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 155(2):173-181.
- World Health Organization (www.who.int/en/) – Acesso em 17/10/2011.
- Wu H, Lu W, Mahato RI (2011) Mesenchymal stem cells as a gene delivery vehicle for successful islet transplantation. *Pharm Res* 28(9):2098-2109.
- Wu H, Ye Z, Mahato RI (2011) Genetically modified mesenchymal stem cells for improved islet transplantation. *Mol Pharm* 8(5):1458-1470.
- Yang Z, Chen M, Ellett JD, Carter JD, Brayman KL, Nadler JL (2005) Inflammatory blockade improves human pancreatic islet function and viability. *Am J Transplant* 5(3):475-483.
- Zecchin HG, Carnevali JBC, Saad MJA (2005) Bases moleculares da resistência à insulina. Em Godoy-Matos AF, editor. *Síndrome Metabólica*. São Paulo: Atheneu; p.19-46.
- Zhang L, Gianani R, Nakayama M, Liu E, Kobayashi M, Baschal E, Yu L, Babu S, Dawson A, Johnson K, Jahromi M, Aly T, Fain P, Barker J, Rewers M, Eisenbarth GS (2008) Type 1 diabetes: chronic progressive autoimmune disease. *Novartis Found Symp* 292:85-94.
- Zhu FF, Zhang PB, Zhang DH, Sui X, Yin M, Xiang TT, Shi Y, Ding MX, Deng H (2011) Generation of pancreatic insulin-producing cells from rhesus monkey induced pluripotent stem cells. *Diabetologia* 54(9):2325-2336.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.