

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA

SUPEREXPRESSÃO DE BETACELULINA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
INDUZ SECREÇÃO DE INSULINA IN VITRO E MELHORA QUADRO DE
HIPERGLICEMIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES

ANA HELENA DA ROSA PAZ

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA

SUPEREXPRESSÃO DE BETACELULINA EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
INDUZ SECREÇÃO DE INSULINA IN VITRO E MELHORA QUADRO DE
HIPERGLICEMIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES

ANA HELENA DA ROSA PAZ

Orientadora: Profa. Dra. Luise Meurer

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências em Gastroenterologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor

Porto Alegre, Brasil
2009

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

P348s Paz, Ana Helena da Rosa

Superexpressão de betacelulina em células-tronco mesenquimais induz secreção de insulina in vitro e melhora quadro de hiperglicemia em modelo experimental de diabetes / Ana Helena da Rosa Paz ; orient. Luise Meurer. – 2009. 131 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências em Gastroenterologia. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Diabetes mellitus 2. Receptor do fator de crescimento epidérmico 3. Células-tronco mesenquimais 4. Terapia de genes 5. Células secretoras de insulina I. Meurer, Louise II. Título.

NLM: WK 810

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre- Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Genzentrum da Maximilian Ludwig Universität (Munich, Alemanha) com auxílio financeiro do CNPq, CAPES e FIPE-HCPA.

Aos meus pais, Hugo e
Sílvia, meus professores da vida.
Sem vocês o caminho seria muito
mais difícil.
A vocês dedico essa tese e
todo o meu amor!

AGRADECIMENTOS

Chegando ao fim dessa jornada, não poderia deixar de agradecer a todos, que de uma maneira ou outra, me ajudaram durante o doutorado. Pessoas que conviveram comigo e ajudaram muito a transformar o meu objetivo inicial em realização. Meus sinceros agradecimentos a todas essas pessoas:

À Dra. Luise Meurer, por aceitar me orientar nesse tema tão diferente da sua linha de pesquisa. Por confiar em mim no momento que eu mais precisei e por ser essa profissional tão competente, atarefada e mesmo assim sempre disponível.

À minha sempre orientadora, Dra. Elizabeth Cirne Lima, por ter me colocado no caminho das células-tronco há quase dez anos. Por ter se tornado essa grande amiga e incentivadora. Betty: contigo aprendi muito. Para ti, a minha eterna gratidão.

Ao Dr. Marlon Schneider por ter me recebido em seu laboratório no Genzentrum da Ludwig Maximilian Universität. Por ter sido sempre tão prestativo e disponível. Vielen dank!

Ao Dr. Eduardo Passos, pela confiança e parceria incondicionais. Muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório Ana Ayala, Paula, Belzinha, Wanessa, Faby, Marta, Carol, Cristiano, Gabrielle, Ivan: obrigada pelo ótimo ambiente de trabalho, pelos mates, cafezinhos e principalmente pela amizade.

Também a todos esses amigos: Claudia Laurino, Grazi, Cíntia, Lidi, Nélon, Guilherme, Carol Uribe, Antônio, Álvaro, Rafael, Fer Oliveira, Fer Pereira. Dayane, Everaldo, Eliane, Jéferson, Flavinha, Vera, Maria, Fabíola, Marta, Eduardo, Moema, Jamile, Pâmela.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado, e a CAPES pela bolsa Doutorado Sanduíche na Ludwig Maximilian Universität.

As pessoas mais importantes na minha vida, meus pais Hugo e Sílvia, meu irmão Hugo Filho, minha avó Blanca e meu amor, César. “*Sonho que se sonha junto é realidade*” Obrigada por sonharem junto comigo!!! Para vocês, todo o meu amor!

RESUMO

O Diabetes mellitus (DM) é um grande problema de saúde pública, projeções indicam que em 2030, 366 milhões de indivíduos sofrerão da doença. Durante os últimos anos, tornou-se evidente que a ausência de células produtoras de insulina é um denominador comum em todos os tipos de DM. Assim, várias pesquisas têm procurado desenvolver células produtoras de insulina *in vitro*. A betacelulina (BTC) é uma proteína ligante de EGFR, relacionada com a proliferação de células β pancreáticas *in vitro* e, com o aumento no metabolismo da glicose em modelos animais do diabetes. As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células multipotentes, presentes na medula óssea, e vastamente estudadas para terapia celular. O objetivo do presente trabalho foi

avaliar os efeitos da superexpressão do gene da betacelulina sobre células MSCs de ratos.

Foi estabelecida uma cultura de longo termo de células MSCs. Após caracterização, estas foram submetidas à transfecção gênica com o gene da BTC por eletroporação. Células transfectadas foram cultivadas em meio de cultivo D-MEM suplementado de 10mM Nicotinamida. Análises de radioimunoensaio demonstraram que 10^4 MSCs transfectadas com o gene da BCT foram capazes de produzir até 0,45 ng/mL de insulina *in vitro*. *In vivo*, as células MSC superexpressando BTC foram capazes de diminuir a hiperglicemia induzida por Streptozotocina em ratos. Nossos resultados demonstraram que os efeitos positivos da superexpressão de BTC em MSCs.

ABSTRACT

Betacellulin (BTC), a ligand of the epidermal growth factor receptor, has been shown to promote growth and differentiation of pancreatic β -cells and to improve glucose metabolism in experimental diabetic rodent models. Mesenchymal stem cells (MSCs) have already been proved to be multipotent. Recent work has attributed to rat and human MSCs the potential to differentiate into insulin secreting cells. Our goal was to evaluate the effects of betacellulin overexpression in rat MSCs. MSCs were characterized by flow cytometry and mesoderm differentiation markers. MSCs were electroporated with a plasmid containing BTC cDNA. Transfected cells were cultivated in H-DMEM with 10mM Nicotinamide.

Radioimmunoassay analysis showed that 10^4 MSC-BTC cells produced up to 0,4ng/mL of insulin, in contrast, MSCs transfected with the empty vector produced insignificant levels of insulin. Also MSC-BTC cells were positive for insulin in immunohistochemistry. RT-PCR showed expression of pancreatic marker genes. When transplanted to streptozotocin diabetic rats, MSC-BTC cells could revert hyperglycemia. Our results demonstrate that BTC overabundance enhances glucose-induced insulin secretion in mesenchymal stem cells *in vitro* as well as *in vivo*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Representação esquemática da localização macroscópica e de corte histológico do pâncreas humano
- Figura 2: Transdução de sinal em células β .
- Figura 3: Representação gráfica dos tecidos originados a partir das células-tronco mesenquimais
- Figura 4. Representação esquemática do plasmídeo pCR2.1-TOPO
- Figura 5. Representação esquemática do plasmídeo pIRES2-EGFP e da seqüência do sítio de clonagem múltipla.
- Figura 6: Quadro de desenho dos primers .
- Figura 7: Padrão de digestão com EcoRI do plasmídeo pIRES2-EGFP-BTC e pIRES2-EGFP
- Figura 8: Morfologia de MSCs
- Figura 9: Gráfico do número de dobros populacionais
- Figura 10: Ensaio CFUF
- Figura 11: Diferenciação em tecido adiposo.
- Figura 12: Detecção da diferenciação osteogênica
- Figura 13: Transfecção celular
- Figura 14: Fotomicrografia da imunofluorescência para betacelulina em células BTC- MSCs
- Figura 15: Imunofluorescência para betacelulina e coloração DAPI
- Figura 16: Diferenciação na morfologia detectada 10 dias após a transfecção
- Figura 17: BTC- MSCs apresentaram tendência a agrupamento celular
- Figura 18: *Spheroids islet-like cells*” formadas em culturas células BTC- MSCs
- Figura 19: Imunocitoquímica para insulina.
- Figura 20: Gráfico da secreção de insulina *in vitro*
- Figura 21: Eletroforese dos produtos de RT-PCR.
- Figura 22: Transplante de células
- Figura 23: Gráfico representando a média da glicemia dos animais

Figura 24: Gráfico demonstrando a média de perda de peso corporal nos animais.

Figura 25: Corte histológico do pâncreas em coloração HE

Figura 26: Corte histológico do pâncreas em coloração HE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM – *Diabetes mellitus*

DM1- *Diabetes mellitus* do tipo 1

DM2- *Diabetes mellitus* do tipo 2

NOD- modelo murino de camundongos diabéticos

ES- células-tronco embrionárias - *Embryonic Stem cells*

CT- células-tronco

MSCs- células-tronco mesenquimais- *Mesenchymal Stem Cells*

BTC - betacelulina

EGFR- receptor dos fatores de crescimento epidermais- *Epidermal Growth Factor Receptor*

PCR- reação em cadeia da polimerase

DNA- ácido desoxi-ribonucleico

cDNA- ácido desoxi-ribonucleico complementar

RNA- ácido ribonucleico

LB- meio de cultivo para bactéria -**Luria Bertani**

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

TE- TRIS-EDTA

IRES- sítio de entrada ribossomal

EGFP- variante da proteína verde fluorescente

ECMV- citomegalovírus

D-MEM- meio de cultivo celular- *Dulbeccos Modified Eagle Medium*

PBS- solução salina fosfatada

NPD- numero de dobros populacionais- *Number of Population Doublings*

CFU-F – unidade formadora de colônia fibroblasto -

KRB- tampão Krebs Ringer – *Krebs Ringer Buffer*

DEPC - dietilpirocarbonato

TAE- tampão Tris-acetato-EDTA

HE- coloração Hematoxilina e Eosina

BTC-MSCs – células transfectadas com betacelulina

pIRES-MSCs- células transfectadas com o plasmídeo vazio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1- <i>Diabetes Mellitus</i>	1
1.2- DM do tipo 1.....	2
1.3- DM do tipo 2.....	3
1.4- Ilhotas de Langerhans.....	4
1.5- Métodos de tratamento para o DM.....	5
1.6- Terapia celular para reposição de células β	9
1.7- Células xenogênicas como fonte de células β	11
1.8- Células-tronco embrionárias como fonte de células β	12
1.9- Células-tronco pancreáticas como fonte de células β	14
1.10- Células-tronco da medula como fonte de células β	15
1.11- Células-tronco mesenquimais.....	16
1.12- Betacelulina.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1-Construção do transgene.....	21
3.2- Isolamento e caracterização das células-tronco	31
3.3 – Transfeção gênica e ensaios <i>in vitro</i>	36
3.4 – Ensaios <i>in vivo</i>	45
3.5 – Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS.....	48
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS	76
8. ANEXO: Artigo Científico: Betacellulin overexpression in mesenchymal stem cells induces Insulin secretion in vitro and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus

O Diabetes mellitus (DM) não é uma só doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, que apresentam em comum a hiperglicemia consequente a uma produção ou ação deficiente de insulina pelo organismo, ou ambos. (SPELLMAN, 2008). A hiperglicemia crônica, ocasionada pelo diabetes em longo prazo, acaba por ocasionar lesão e falha em vários órgãos, especialmente olhos, rins e coração. Muitos processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do DM (WHO, 2006). Estes podem variar de auto-imunidade contra células β pancreáticas até anormalidades que resultam em resistência insulínica.

A prevalência do DM aumenta em ritmo alarmante, projeções indicam que 366 milhões de indivíduos serão afetados pela doença em 2030 (WILDING, 2007). Por essa razão, o DM é um grande problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o crescimento nos casos de DM está relacionado com alterações no estilo de vida e no perfil sócio-econômico destes indivíduos, diminuindo a expectativa de vida em 15 anos (WHO, 2006). A incidência do DM tem maior intensidade nos países em desenvolvimento, principalmente devido ao crescimento e envelhecimento da população, a obesidade, aos fatores dietéticos e sedentarismo (WILD et al., 2004).

No Brasil, de acordo com o Vigitel 2007 (Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis- www.saude.gov.br), a ocorrência média de DM na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,2%, o que representa 6.399.187 de pessoas. A prevalência aumenta com a idade: o DM atinge 18,6% da população com idade superior a 65 anos (PAIVA et al., 2006). O Brasil está classificado como um dos dez países com a maior prevalência da doença, juntamente com a Índia, China, EUA, Indonésia, Rússia, Japão, Paquistão e Itália (WHO, 2006). Os gastos públicos diretos e indiretos para o tratamento do DM representam entre 5 e 15% dos gastos totais com doenças no mundo (MERANI e SHAPIRO, 2006).

A classificação do DM, proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: A) DM do tipo 1; B) DM do tipo 2; C) outros tipos de Diabetes, incluindo Diabetes secundário, ou

associado a outras patologias, e D) DM gestacional (SKELLY, 2006). O presente trabalho irá se concentrar nos DM do tipo 1 e 2.

1.2 Diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) – A DM1 acomete cerca de 5-10% dos pacientes diabéticos. Previamente denominada diabetes insulino-dependente ou diabetes juvenil é resultante da destruição de células β pancreáticas, devido a uma resposta celular auto-imune (ATIKINSON e MACLAREN, 1994), a destruição das células β pancreáticas geralmente é realizada por anticorpos anti-insulina, anti-ácido glutâmico (GAD₆₅) e anticorpos contra tirosina fosfatase IA-2 e IA2- β (VOLTARELLI et al., 2007). Usualmente um ou mais desses auto-anticorpos podem ser encontrados em 85-90% dos indivíduos recentemente diagnosticados. O DM1 geralmente manifesta-se na infância, mas pode ocorrer em qualquer idade, até mesmo em idades bem avançadas (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

A destruição auto-imune de células β tem predisposições genéticas. Mais de 17 regiões cromossômicas foram relacionadas à suscetibilidade da doença no modelo murino *Nonobese Diabetic Mouse* (NOD) (LYONS et al., 2001), também está relacionada a fatores ambientais ainda pouco conhecidos (KNIP e AKERBLUM, 1999). A grande maioria dos pacientes torna-se dependente de insulina exógena para sobreviver estando em risco de desenvolvimento de cetoacidose devido à total deficiência de insulina. Pacientes com DM1 também podem apresentar outras doenças auto-imunes como, por exemplo: vitiligo, doença celíaca, hepatite auto-imune.

1.3 Diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) – forma da doença conhecida como diabetes de maturidade, abrange de 90-95% dos pacientes diabéticos. Os pacientes com DM2 geralmente apresentam resistência à ação da insulina, e uma deficiência relativa na produção de insulina. No DM2 os tecidos periféricos como o músculo esquelético e o tecido adiposo são resistentes à ação de insulina, e, nas ilhotas pancreáticas, a produção de insulina é insuficiente para compensar o estado de resistência gerando um estado relativo ou absoluto de insuficiência de insulina (HICKMAN E MACDONALD, 2007). A doença apresenta associação com obesidade e manifesta-se predominantemente após os 40 anos. Na maioria dos casos, não é necessária a

reposição de insulina para a sobrevivência, mas pode ser necessária para a correção da hiperglicemia (DOCHERTY, 2001).

1.4 Ilhotas de Langerhans

As estruturas denominadas ilhotas pancreáticas ou de Langerhans foram identificadas por Paul Langerhans em 1869. Foram descritas por ele como formações anatômicas diferentes do resto do tecido, sem conexão direta com os dutos, como que formando “ilhas celulares” (Fig. 1) (AITA, 2002).

Essas ilhas celulares são as responsáveis pela função endócrina do pâncreas e são compostas por quatro tipos celulares distintos: α , β , γ e PP, produtoras dos hormônios glucagon, insulina, somatostatina e polipeptídeo pancreático, respectivamente (TRUCCO, 2005).

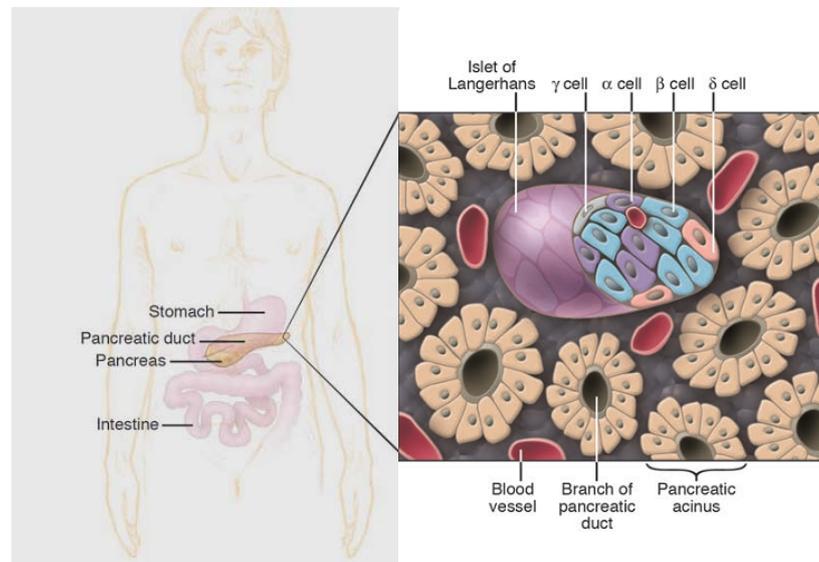


Figura 1: Representação esquemática da localização macroscópica e de corte histológico do pâncreas humano. No detalhe, a composição celular das ilhotas de Langerhans. Fonte: Trucco 2005

O pâncreas humano possui aproximadamente um milhão de ilhotas, isso representa somente 2 a 3% da massa total do órgão. Cada ilhota possui cerca de 2000 células. As células β representam entre 60-80% do total de células em uma ilhota (JONES et al., 2008).

1.5 Métodos de tratamento para DM

O tratamento do DM tem como objetivo a manutenção da normoglicemia, frente às variações da ingestão alimentar. De acordo com resultados do *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT), o controle rigoroso dos níveis glicêmicos está associado à diminuição da incidência de complicações tardias. O tratamento não farmacológico dos pacientes tem como base a dieta e a atividade física. Porém, aproximadamente 40% dos pacientes diabéticos necessitam tratamento com antidiabéticos orais e outros 40% necessitam de aplicações de insulina para o controle da glicemia (AITA, 2002). Em relação ao DM1, o tratamento convencional consiste na administração subcutânea de insulina exógena, geralmente em diversas aplicações diárias, não apenas para o controle glicêmico, mas também para garantir a sobrevivência tendo em vista a absoluta deficiência de insulina nesses pacientes. Embora seja relacionada com uma menor incidência de complicações, a terapêutica de reposição de insulina tem sido considerada incômoda pelos pacientes, devido à necessidade de acompanhamento rigoroso da glicemia e de múltiplas injeções de insulina diárias. Além de induzir freqüentemente episódios de hipoglicemia grave (KOBAYACHI et al., 2009).

Além da insulino terapia intensiva bem sucedida, somente os transplantes de pâncreas (órgão total) e de ilhotas pancreáticas, possibilitam um padrão de secreção de insulina mais próximo do fisiológico. O transplante de pâncreas alogênico é feito com receptor e doador não relacionados geneticamente e apresenta resultados bons (sucesso superior a 85% no primeiro ano) (WISEMAN, 2009). O pâncreas transplantado é capaz de secretar insulina imediatamente após a sua revascularização, induzindo completa independência de insulina exógena. Nesse sentido apresenta efeitos benéficos sobre as complicações crônicas da doença. Entretanto, como qualquer outro transplante alogênico, necessita a utilização de imunossupressores para evitar a rejeição ao enxerto. Além disso, a cirurgia para o transplante de órgão inteiro envolve um procedimento cirúrgico extenso. Atualmente sua aplicação é limitada a pacientes, que apresentam controle metabólico extremamente difícil, nos quais os riscos da hipoglicemia grave são mais sérios, do que os potenciais efeitos colaterais da terapia imunossupressora (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002).

O transplante de ilhotas pancreáticas consiste no isolamento de ilhotas do pâncreas de doadores por tratamento enzimático, e pode ser uma alternativa ao transplante de pâncreas, com a vantagem de dispensar a cirurgia invasiva, já que as ilhotas são transplantadas em processo guiado por ultrassonografia, onde se realiza uma canulação da veia porta e consecutivo transplante das ilhotas para o fígado do receptor. Existem várias técnicas que divergem entre si, principalmente pela quantidade de células transplantadas e tipo de terapia imunossupressora. A técnica que apresenta os melhores resultados é conhecida como o “Protocolo de Edmonton” e tem mantido os níveis normais de glicose através da injeção de grandes quantidades de células das ilhotas, obtidas de pâncreas de cadáveres (RYAN et al., 2001; SHAPIRO et al., 2003). Tal procedimento é dificultado devido à ineficiência de isolamento das ilhotas, que acabam por ser danificadas como o processo enzimático de isolamento. Por essa razão, muitas vezes, se torna necessária a utilização de dois a três pâncreas de doadores para cada paciente receptor, além de múltiplas infusões para estabelecer um quadro de glicemia estável (COLLABORATIVE ISLET TRANSPLANTATION REGISTRY- <http://www.citregistry.org>). Desta forma, mesmo que as técnicas de isolamento de ilhotas sejam aperfeiçoadas e torne-se possível atingir níveis glicêmicos adequados após um único transplante, dificilmente a oferta de pâncreas de doadores será suficiente para atender ao número crescente de pacientes.

Em 2007, um grupo de pesquisadores da USP, coordenado pelo Professor Julio Voltarelli, publicou uma nova alternativa terapêutica para o tratamento do DM1. Trata-se de um ensaio clínico do tipo 1/2, que avaliou a segurança e os efeitos metabólicos do transplante autólogo não-mieloablativo de células-tronco hematopoiéticas em 15 pacientes com DM1 recentemente diagnosticada. A maioria dos pacientes tornou-se insulino-independente, e apresentou aumento nos níveis de peptídeo C e redução de hemoglobina glicada por até dois anos.

O mecanismo exato de ação do transplante de células-tronco hematopoiéticas, para o tratamento de DM1, ainda não está completamente esclarecido. Pode ser devido à supressão de células T regulatórias ou mesmo por deleção clonal (VOLTARELLI et al., 2007). A melhoria na função de células β pancreáticas observada, após a terapia imunossupressora, pode ser explicada por regeneração de células β remanescentes no

órgão. Neste estudo, 93% dos pacientes apresentaram período de independência da administração de insulina exógena, a toxicidade foi considerada baixa, além de não apresentar mortalidade (COURI et al., 2009). Apesar de ser um estudo muito promissor, ainda se faz necessário o estudo de um maior número de pacientes tratados, antes deste protocolo terapêutico ser adotado rotineiramente.

1.6 Terapia celular para reposição de células β

O Protocolo de Edmonton é considerado a “prova de conceito” de que terapias celulares podem ser efetivas para o tratamento do DM. Entretanto, a escassez de doadores, levou a comunidade científica a procurar fontes alternativas para produção de insulina. Nesse sentido, um grande número de células e tecidos tem sido proposto como fontes para produção de insulina *in vitro*. Dentre as principais “candidatas” podem-se citar: células β de outras espécies (xenogênicas), células-tronco embrionárias, células-tronco somáticas de pâncreas, e da medula óssea.

Para serem funcionais, as células β desenvolvidas *in vitro* devem ser capazes de sintetizar e armazenar insulina, e ainda liberar quantidades suficientes do hormônio para manter a homeostasia do organismo frente à ingestão de alimentos (JONES et al., 2008). Células β pancreáticas possuem um complexo sistema de estímulo-resposta para a liberação de insulina (Fig. 2). Células produtoras de insulina desenvolvidas em laboratório devem possuir mecanismos similares, que possibilitem a liberação regulada de insulina em resposta a estímulos do ambiente, como mudanças em nutrientes, hormônios e neurotransmissores. Insulina em escassez ou em demasia pode ser potencialmente letal, dessa forma a célula desenvolvida em laboratório deve apresentar mecanismo similar de controle sobre a liberação de insulina.

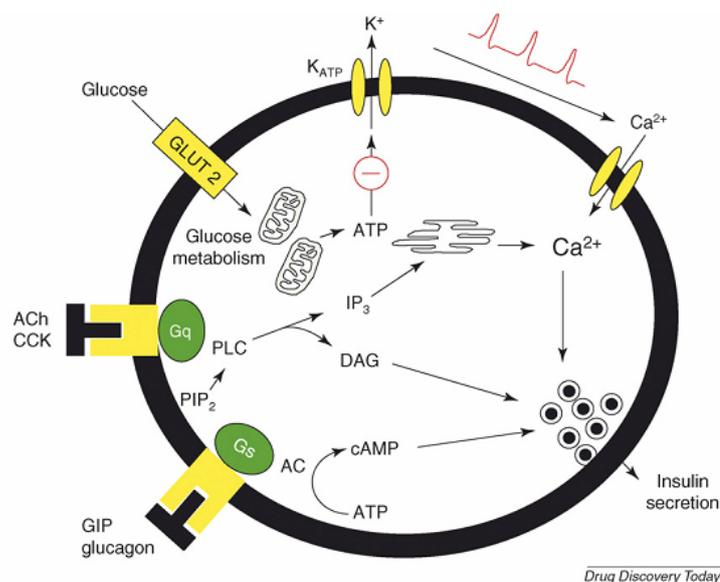


Figura 2: Transdução de sinal em células β . A glicose é transportada para o interior das células β através do transportador GLUT2 e metabolizada no citoplasma gerando ATP. Este ATP liga-se aos canais K_{ATP} ocasionando o fechamento destes canais. A conseqüente inibição do efluxo de K^+ leva a uma despolarização da membrana, que acaba por abrir os canais de Ca^{2+} voltagem dependentes. A entrada de Ca^{2+} do meio extracelular ocasiona elevação de Ca^{2+} no citoplasma e ativa a via de iniciação da secreção de insulina. Fonte: Jones et al., 2008.

Além de possuírem controle sobre a liberação de insulina, células β , produzidas em laboratório, devem ter a capacidade proliferativa baixa, de modo a evitar que após o transplante, estas aumentem muito de número e acabem por ocasionar hipoglicemia. Isto não é um problema quando se trata da utilização de células β convencionais (como no transplante de ilhotas, por exemplo), já que estas células são entidades que apresentam uma capacidade proliferativa muito baixa (PARNAUD et al., 2008). Essa combinação de capacidade secretora altamente especializada e capacidade proliferativa baixa é o maior desafio para a produção de células β , a partir de outros tipos celulares *in vitro*.

1.7 Células xenogênicas como fonte de células β

A utilização de ilhotas ou células β de outras espécies, embora pareça um meio bastante plausível para a obtenção de grandes quantidades de tecido funcional necessário para o tratamento do DM, ainda precisa ser discutida em diversos aspectos. Muitos estudos para a utilização de ilhotas suínas como fonte para terapia celular em humanos, têm sido desenvolvidos (TRUCCO et al; 2007). Sob esta possível utilização podem-se destacar principalmente três pontos favoráveis:

- a) pâncreas de suínos foram fonte de insulina para a tratamento bem sucedido de DM1 antes de existir insulina recombinante;
- b) grandes quantidades de ilhotas pancreáticas podem ser obtidas de pâncreas porcinos, a partir do mesmo método de digestão enzimática empregado para a obtenção de células humanas;
- c) suínos são suscetíveis à manipulação genética, dessa forma, pode-se produzir insulina geneticamente semelhante à insulina humana.

Contudo, alguns aspectos importantes impedem a utilização de ilhotas pancreáticas oriundas de porcos para o tratamento de humanos. Após xenotransplante ocorre uma resposta hiperimune (JONES et al., 2008), onde o enxerto acaba por ser totalmente

perdido. Tentativas de proteger o enxerto do sistema imune, como a utilização de cápsulas biocompatíveis ainda não apresentaram resultados positivos, uma vez que a viabilidade das células, bem como a liberação de insulina, foram comprometidas pelo encapsulamento (VAN DER WINDT et al., 2007). Além disso, a comprovação de que as seqüências do retrovirus porcino endógeno (PERV) podem ser ativadas no tecido xenotransplantado (VAN DER LAAN et al., 2000) alertou a possibilidade do desenvolvimento de novas infecções virais em humanos. Diversos estudos estão sendo desenvolvidos com o intuito de esclarecer melhor qual o efeito da utilização desta fonte de células para o tratamento do DM. Recentemente, a *Diabetes Research and Wellness Foundation* (www.springpointproject.org) destinou substancial verba para pesquisa em células β oriundas de suínos, demonstrando que existem grandes perspectivas na utilização desta fonte de células para o tratamento da DM.

1.8 Células-tronco embrionárias como fonte de células β

Células-tronco (CT) embrionárias (ES) são células pluripotentes, derivadas da massa central interna do embrião em estágio de blastocisto. Células ES apresentam grande potencial para terapia celular, por possuírem capacidade de originar os mais de 200 tipos de células especializadas, que formam o organismo adulto (PAZ et al., 2008). São pluripotentes, ou seja, podem produzir células das três camadas germinativas: endoderme, ectoderme e mesoderme. Ainda, células ES podem ser expandidas indefinidamente *in vitro* em estado indiferenciado, sendo, desta forma, capazes de produzir grandes números de células, necessárias para a terapia de transplante. Os primeiros estudos objetivando a produção de células β , a partir de ES, utilizavam células oriundas de camundongos (LUMELSKI et al., 2001; RAJAGOPAL et al., 2003), já que estas eram de muito mais fácil obtenção, além de não estarem relacionadas a questões éticas vinculadas ao uso de embriões humanos como fonte de células para pesquisa. Os resultados positivos sobre a obtenção de células produtoras de insulina *in vitro* a partir de células ES de camundongos estimularam muitos outros estudos, assim, já foi comprovada a diferenciação *in vitro* de ES de primatas (LESTER et al., 2004) e humanos (ASSADY et al., 2001; SEGEV et al., 2004; CHO et al., 2008). Porém, foi observado nos estudos que apenas uma pequena proporção 1-3% de células ES

diferenciam-se espontaneamente em células produtoras de insulina (ASSADY et al., 2001). Tentativas de desenvolvimento de protocolos específicos para aumentar a produção de insulina *in vitro* não obtiveram grande êxito; porém, em camundongos o transplante de células ES humanas, juntamente com frações de pâncreas embrionários de camundongos sob a cápsula renal aumentou a eficiência de diferenciação sugerindo a existência de importantes vias de sinalização nos sistema *in vivo* que certamente não estão disponíveis no sistema *in vitro* (BROLÉN et al., 2005).

Estudos utilizando camudongos *knockout* produziram importantes conhecimentos com relação aos genes envolvidos no desenvolvimento do pâncreas endócrino. Utilizando o conhecimento sobre a seqüência de desenvolvimento do pâncreas, estudos recentes têm desenvolvido protocolos que recapitulam *in vitro*, importantes informações do desenvolvimento *in vivo* do órgão, que levam à formação de endoderme a partir de células ES (SHIN et al., 2007; MICALLEF et al., 2007), potencializando a produção de insulina. Entretanto, embora células ES apresentem elevada plasticidade e possam, através de protocolos otimizados, produzir concentrações maiores de insulina, sua utilização para terapia ainda apresenta grandes riscos como, por exemplo, a formação de teratocarcinomas (FUJIWAKA et al., 2005) e por essa razão ainda devem ser muito estudadas em modelos animais antes de qualquer aplicação clínica em humanos.

1.9 Células-tronco pancreáticas como fonte de células β

Apesar de apresentar um potencial de replicação considerado limitado, hoje, sabe-se que a massa de células β presentes no pâncreas adulto possui capacidade de proliferação (TRUCCO, 2005). O aumento no número de células pode ocorrer por diferenciação a partir do epitélio ductal pancreático (neogênese) ou por replicação das células β já existentes (BONNE-WEIR et al., 2000). Estudos recentes, que empregaram técnicas de rastreamento em células β de camundongos, comprovaram que a maioria das novas células geradas durante a vida são originadas de células β preexistentes (DOR et al., 2004), indicando que existem células-tronco pancreáticas. Dessa forma, poderia-se pensar em isolar células β de doadores e expandi-las *in vitro* a fim de obter um número maior de células viáveis para o transplante. Entretanto, células β

pancreáticas não possuem capacidade proliferativa *in vitro*, sendo assim, só podem originar novas células no organismo em que residem e mesmo assim sob determinadas condições fisiológicas (PARNAUD et al., 2008).

Embora existam evidências de proliferação *in vivo*, na prática, o isolamento, expansão e diferenciação de células progenitoras pancreáticas ainda são procedimentos não bem estabelecidos. Avanços nas pesquisas de isolamento e cultivo destes tipos celulares certamente representarão uma importante ferramenta para a terapia celular do DM.

1.10- Células-tronco de medula como fonte de células β

A medula óssea possui células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais. Estes dois tipos celulares apresentam considerável plasticidade. Nesta seção serão discutidos principalmente dados sobre CT hematopoiéticas, já que CT mesenquimais (que são a ferramenta principal desta tese) serão discutidas a seguir. Quanto à formação de células β funcionais, a partir de CT hematopoiéticas, resultados controversos são encontrados na literatura. Inicialmente foi postulado que CT hematopoiéticas poderiam aderir ao pâncreas *in vivo* e formar, por meio de diferenciação, células produtoras de insulina (IANUS et al., 2003); contudo, esses resultados não puderam ser reproduzidos por outros grupos (EFRAT, 2008). Estudos recentes têm relatado a utilização de CT hematopoiéticas na reversão do DM experimental *in vivo*, e atribuem esses resultados a um efeito sobre a proliferação de células β preexistentes, mas não sobre diferenciação celular propriamente dita (HASEGAWA et al., 2007). Em humanos, as CT hematopoiéticas também foram empregadas com sucesso no tratamento experimental do diabetes (VOLTARELLI et al., 2007).

O potencial terapêutico de CT hematopoiéticas continua sendo muito estudado, e poderá apresentar resultados encorajadores para o tratamento do DM.

1.11- Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células precursoras, que realizam autorenovação clonal, podendo ser isoladas da medula óssea e expandidas em cultura

graças a sua habilidade de adesão e proliferação *in vitro* (MEIRELLES e NARDI, 2003). As primeiras evidências de que a medula óssea continha células precursoras de tecidos mesenquimais não hematopoiéticos surgiram no trabalho de Friedenstein e colaboradores (revisado por PHINNEY, 2002). Em seu trabalho, Friedenstein, evidenciou células da medula óssea com capacidade de adesão à placa de cultivo. Nos anos 80, diversos estudos estabeleceram que as células isoladas pelo método de Friedenstein eram multipotentes, e capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condroblastos, adipócitos, e até mioblastos (PROCKOP, 1997), essas células apresentam morfologia semelhante a fibroblastos, e após dois a quatro dias em cultivo, passam a se multiplicar rapidamente formando colônias.

Hoje, sabe-se que as MSCs podem ser isoladas de diversos órgãos (DA SILVA MEIRELLES et al., 2006); porém, a facilidade de acesso faz com que a medula óssea ainda seja uma das principais fontes para a sua obtenção.

O uso do termo “MSC” para populações simplesmente isoladas da medula óssea por aderência ao plástico, levou a *International Society for Cellular Therapy* a publicar normas, segundo as quais o termo só pode ser usado, quando forem demonstradas propriedades de proliferação e diferenciação das MSCs (HORWITZ et al., 2005). Com maior controle sobre a caracterização das MSCs, os estudos mais recentes têm atribuído a esta população celular, uma maior plasticidade do que se imaginava anteriormente. Hoje acredita-se que MSCs podem, *in vitro* formar células das três camadas germinativas (endo, ecto e mesoderma). A figura 3 apresenta um esquema de tecidos que podem ser originados a partir de MSCs.

Com relação ao diabetes, diversas pesquisas têm empregado MSCs como fonte celular para terapia em modelos animais. Foi demonstrado que as células-tronco mesenquimais podem se diferenciar em células produtoras de insulina através de terapia gênica e adição de fatores ao meio de cultivo (LI et al., 2008; KARNIELI et al., 2007). Considerando a plasticidade das MSCs e capacidade de resposta a diferentes sistemas de indução de diferenciação celular, as células-tronco mesenquimais apresentam, na atualidade, excelentes perspectivas para utilização em terapia celular. Além disso, as MSC apresentam a vantagem de poder ser obtidas do próprio paciente, descartando assim a necessidade de doadores.

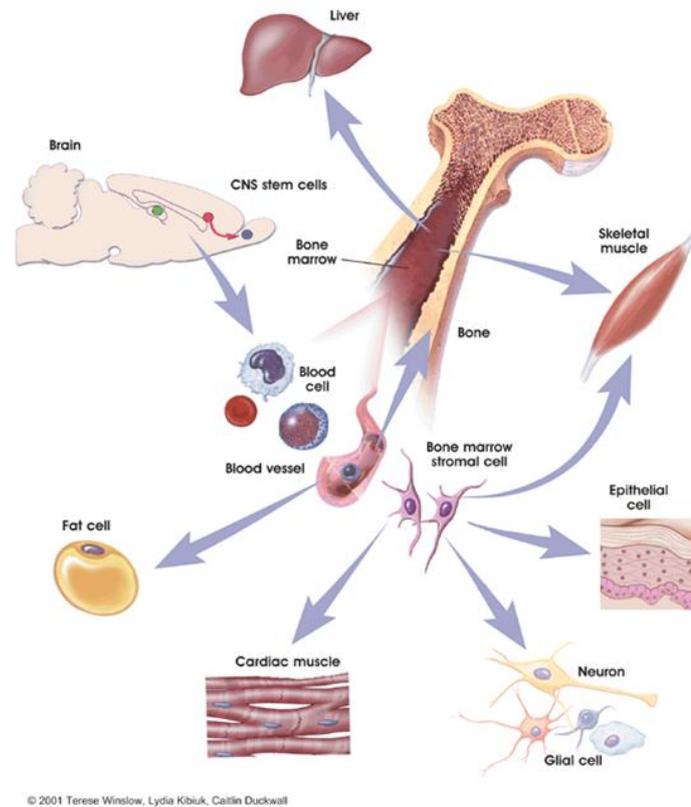


Figura 3: Representação gráfica dos tecidos originados a partir das células-tronco mesenquimais. Fonte: “Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions” publicado e fornecido pelo National Institute of Health, EUA.

1.12- Betacelulina

A betacelulina (BTC) é uma proteína membro da família dos receptores de fatores de crescimento epidermais (EGFR). É inicialmente produzida como uma proteína transmembranar, que pode ser clivada por metaloproteinases para ser liberada na forma circulante (SAHIN et al., 2004). Foi inicialmente isolada e caracterizada como um fator mitogênico, a partir de meio condicionado de uma linhagem celular de carcinoma de células das ilhotas do pâncreas (SHING et al., 1993). Apesar desta ser expressa em vários tecidos e poder desempenhar papéis importantes em diferentes órgãos, a BTC encontra-se mais freqüentemente associada com a função endócrina do pâncreas (DUNBAR e GODDARD, 2000). Diversas evidências indicam que, dentre os

sete ligantes de EGFR, a BTC exerce uma ação considerada única na fisiologia pancreática (DAHLHOFF et al., 2009).

BTC induz a diferenciação de progenitores pancreáticos em células produtoras de insulina (DETEMERCO et al., 2000; LI et al., 2003), mantém a expressão de PDX1 e induz diferenciação de células β a partir de células ES (CHO et al., 2008). Adicionalmente, a expressão de BTC *in vivo* aumenta o metabolismo de glicose através do aumento da massa de células β em modelo animal de DM. Estes resultados sugerem que a BTC tem um importante papel no crescimento e regulação dos precursores de células β .

Levando em consideração a plasticidade das MSCs e a ação da BTC na fisiologia de células β , o objetivo principal desse trabalho foi avaliar os efeitos da superexpressão de BTC em MSCs de ratos. Vislumbrando a utilização destas células como ferramenta para terapia celular do diabetes.

2- OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da superexpressão de betacelulina em células-tronco mesenquimais de ratos, como possível modulador da diferenciação celular para a formação de células produtoras de insulina.

Objetivos Específicos

- Construir um vetor plasmidial para expressão de betacelulina em células eucarióticas.
- Isolar e caracterizar uma cultura de longo termo de células-tronco mesenquimais de ratos Wistar, a partir das normas da Sociedade Internacional de Terapia Celular.
- Realizar a transfecção gênica em células-tronco mesenquimais e avaliar os efeitos da superexpressão de BTC por análise morfológica,

imunocitoquímica, imunofluorescência, radioimunoensaio para insulina e RT-PCR.

- Realizar o transplante das células superexpressando betacelulina para modelo animal de diabetes por Streptozotocina e avaliar a glicemia e peso corporal dos animais receptores.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção do transgene

cDNA total utilizado

Para a clonagem de betacelulina foi utilizado o cDNA produzido a partir de RNA total tecido pulmonar de camundongos. O cDNA foi amplificado a partir dos seguintes oligonucleotídeos iniciadores: BTC 5'-GGC CCA GGA AGG GCA TAG AGA-3' e BTC 5'-ATG AGT CAG GTC TTT TGT AGC TTG-3' para *sense* e *antisense* respectivamente.

Reação Em Cadeia Da Polimerase (PCR)

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi realizada em aparelho termociclador DNA "Thermal Cycler" - MJ Research, modelo PTC 100. A reação continha 1µg de cDNA de pulmão, 0,2 µM dos oligonucleotídeos iniciadores BTC1 e BTC2, 0,2mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em 10X (Tris-Hcl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM), em um volume de um décimo do volume final da reação. A reação foi incubada por um minuto, a 94°C, seguida de 40 ciclos de incubações a 94° C, por um minuto, a 65 ° por um minuto e a 72° C, por um minuto. Por último, seguiu-se incubação a 72° C, por 10 minutos.

Clonagem do produto de PCR de BTC em PCR2.1-TOPO (INVITROGEN).

O plasmídeo pCR2.1-TOPO (Fig. 4) é um plasmídeo comercial que apresenta resistência à Ampicilina e Canamicina, e é utilizado para clonagem de produtos

amplificados por PCR. A reação foi desenvolvida conforme indicação do fabricante. Foram adicionados 4µL do produto de PCR e 1µL de pCR2.1-TOPO. A suspensão foi mantida a 22°C por 20 minutos e depois armazenada a -20°C. Posteriormente, foi utilizada para eletrotransformação de *E. coli* JM109. Os clones foram selecionados com canamicina a 30 µg/mL para a análise da presença do plasmídeo recombinante, foram isoladas 10 colônias obtidas da transformação que foram repicadas em 2 ml de meio cultivo Luria Bertani (LB), contendo canamicina e cultivadas a 37° C por 16 a 18 horas. Os DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina como descrito na seção, para confirmar a presença do inserto nos diferentes clones, foi primeiramente feita uma triagem através de digestão com a enzima de restrição *EcoRI* cujos sítios estão localizados nas regiões flanqueadoras da região de inserção do fragmento no plasmídeo pCR2.1-TOPO. Clones que mostraram a presença de um fragmento de DNA adequado foram tratados concomitantemente, com as endonucleases de restrição.

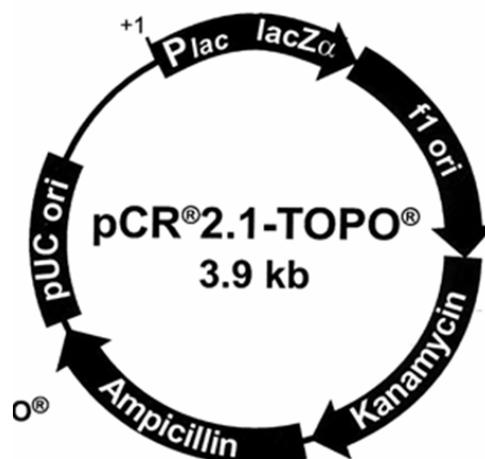


Figura 4. Representação esquemática do plasmídeo pCR2.1-TOPO. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: genes de resistência aos antibióticos ampicilina e canamicina; origem de replicação derivada do vírus f1 (f1 ori) e de PUC (pUC ori); o promotor lac (Plac); a seqüência de LacZ e a seqüência do sítio de clonagem de produtos de PCR e os sítios para as enzimas de restrição. Fonte: http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcr2_1topo_map.pdf.

Isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose

Para o isolamento de fragmentos de DNA de gel de agarose, foi utilizado StrataPrep™ DNA Gel Extraction Kit (Stratagene).

O fragmento de DNA, separado em gel de agarose 1%, foi visualizado por coloração com brometo de etídeo e iluminação com luz ultravioleta em transluminador. A região contendo o fragmento de cDNA foi cortada e retirada do gel, colocada em tubo de microcentrifuga e a ele foram adicionados 300 µl de Tampão de Extração de DNA. O material foi incubado a 55° C, por 10 minutos, para dissolver o gel. A solução foi, então, transferida para uma microcoluna contendo matriz de fibra, que foi colocada em novo tubo de microcentrifuga. Foi realizada uma centrifugação a 14.000 x g por 30 segundos. O líquido foi descartado, e a microcoluna foi novamente assentada sobre o tubo. Adicionaram-se 750 µL de Tampão de Lavagem (Tris-Hcl 5 mM pH7,5; NaCl 50 mM; EDTA 1,25 mM EDTA; Etanol 50%) e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. Descartou-se o líquido, e nova centrifugação foi realizada. A microcoluna contendo o DNA foi, então, transferida para outro tubo de microcentrifuga e a ela foram adicionados 50 µl de TE (Tris-Hcl 10 mM pH8,0; EDTA 1 mM) para eluir o DNA. Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, seguiu-se outra etapa de centrifugação nas mesmas condições anteriores. A microcoluna foi então descartada e o DNA eluído em TE ficou retido no tubo.

Clonagem de BTC em PIRES2-EGFP (CLONTECH)

O fragmento de DNA clivado do sítio EcoRI e extraído do gel de agarose foi clonado no plasmídeo pIRES2-EGFP (Fig. 5). O plasmídeo pIRES2-EGFP foi utilizado como plasmídeo para expressão de BTC em células eucarióticas (nesse caso, células MSCs). Ele apresenta resistência à Canamicina, Neomicina, o gene repórter da proteína verde fluorescente (EGFP) e um sítio de entrada ribossomal (IRES). Isso permitiu que a BTC e a EGFP fossem traduzidas a partir de uma molécula bicistônica de RNA mensageiro.

O produto da clonagem em pCR2.1-TOPO foi liberado por clivagem com a enzima EcoRI e clonado em pIRES2-EGFP no sítio de EcoRI, *downstream* ao promotor de citomegalovírus e *upstream* ao sítio de entrada ribossomal de ECMV, ao

gene EGFP, e a ao sinal de poliadenilação. A clonagem foi realizada por meio de ligação.

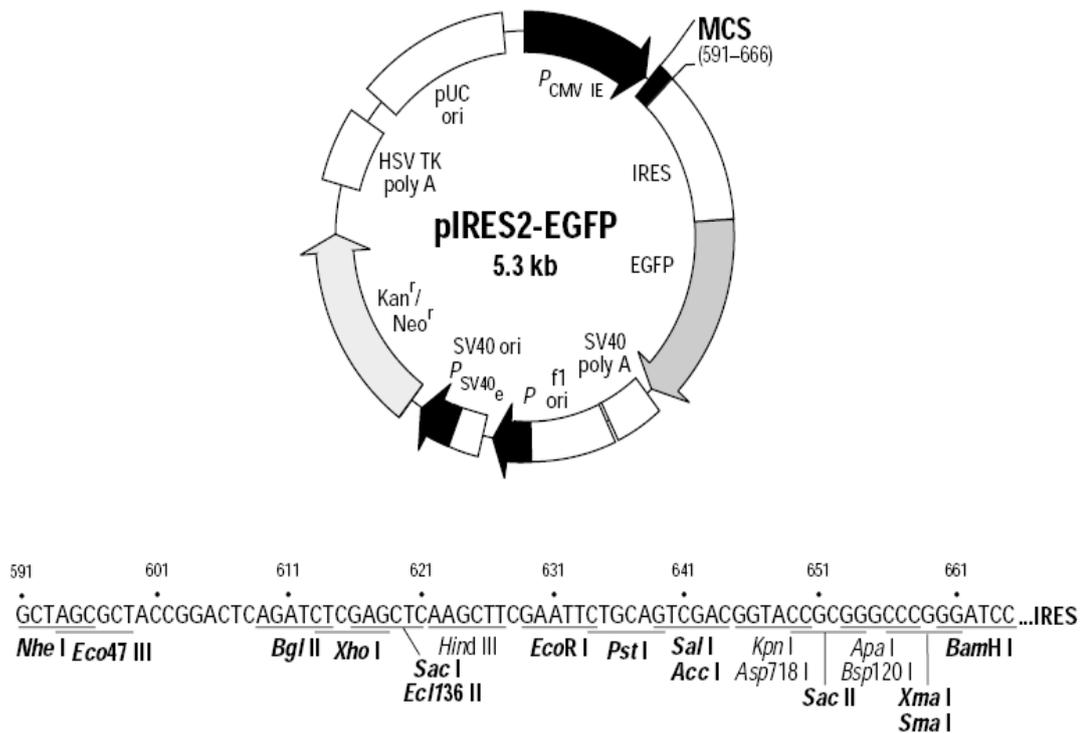


Figura 5. Representação esquemática do plasmídeo pIRES2-EGFP e da seqüência do sítio de clonagem múltipla. Em destaque, na figura, estão os principais elementos do plasmídeo: genes de resistência aos antibióticos canamicina e neomicina (gentamicina); origem de replicação derivada do vírus F1; origem de replicação de PUC; promotor e origem de replicação de SV40; o promotor do CMV, sinal de poliadenilação de SV40, sítio de entrada ribossomal IRES, e o sítio de policlonagem. Na parte inferior da figura, estão representados a seqüência da região de clonagem e os sítios para as enzimas de restrição. Fonte: <http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna4to.pdf>

Ligação de extremidades de DNA

A reação de ligação foi realizada em um volume de 20 µL. Foram utilizados 2 µL de tampão de ligase 10X (Tris-Hcl 400 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, 5 mM ATP; pH 7,8), 1 µL de T4 DNA ligase 5 U/ µL (Fermentas), 5ng de vetor plasmidial e o 50ng do fragmento. A reação foi incubada a 22° C durante 12 horas.

Digestão por endonucleases de restrição

Para checar a orientação e presença do inserto no plasmídeo, foram realizadas clivagens com as seguintes enzimas de restrição: EcoRI (Fermentas); KpnI and SmaI (New England Biolabs). Quantidades de 0,1 µg a 0,5 µg (para análise de clones recombinantes) e 0,5 µg a 1 µg de DNA plasmidial (para extração de fragmentos de DNA em gel de agarose) foram utilizadas. O tampão de restrição 10x específico para a(s) enzima(s) utilizada(s), segundo o fabricante, foi adicionado para concentração final de 1x. Quantidades apropriadas de enzima foram adicionadas, tendo como base que uma unidade de enzima digere 1µg de DNA em uma hora. Para completar o volume final da reação foi adicionada H₂O deionizada. A reação foi incubada na temperatura adequada para a enzima utilizada.

Linhagem de bactéria utilizada

Foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) eletrocompetentes da linhagem JM109.

Meios de cultura para bactérias

Meio LB (Luria-Bertaini) – triptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, extrato de levedura 5 g/L para meio líquido, adicionado de 2% de ágar, quando meio sólido e 0,67% para meio semi-sólido. Meio SOC – triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/l, KCl 2,5 mM, ajustado para pH 7,0 e adicionado MgCl₂ para concentração final de 7 mM e glicose 20 mM.

Preparação de células de *E. coli* eletrocompetentes

Em 500 mL de meio LB, foram inoculados 5 mL de uma pré-cultura de *E. coli* JM109, crescidas por 16 a 18h em meio LB. As células foram crescidas com agitação vigorosa de 300 rpm até que a cultura atingisse uma densidade óptica de 0,5 a 0,7 A_{600nm} e incubadas no gelo por 15 a 30 minutos. A cultura gelada foi, então, centrifugada por 20 minutos a 3.200 x g, em centrífuga Hettich (modelo Rotina 46R, com rotor oscilante modelo 4624) a 4°C. O sobrenadante foi totalmente retirado, e as células ressuspensas em 500 mL de glicerol 10% estéril a 4°C. A suspensão foi

centrifugada como anteriormente e o precipitado foi ressuspenso em 250 mL de glicerol 10% a 4°C. Procedeu-se a nova centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e as células ressuspenso em 20 mL de glicerol 10%. O mesmo passo de centrifugação foi realizado novamente para coletar as células, as quais foram então ressuspenso em um volume final de 1 a 2 mL de glicerol 10% a 4°C. As células foram fracionadas em alíquotas de 40 µl e congeladas a -80°C para posterior utilização.

Transformação de *E. coli* por eletroporação

As alíquotas de 40µL de inóculos de *E. coli* foram descongeladas em temperatura ambiente e colocadas imediatamente no gelo. Ao tubo foi adicionado DNA plasmidial suspenso em água ou TE (Tris-Hcl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) (máximo de 3 µL), que foi incubado no gelo por 1 minuto. As constantes elétricas utilizadas para a eletroporação foram: capacitância, 25µF; resistência, 200 mΩ e voltagem, 2,5 kV (foram utilizadas cubetas de 0,2 cm). A suspensão de células foi transferida para o fundo de uma cubeta gelada, colocada na câmara do eletroporador Gene Pulser XCell (Bio-Rad Laboratories, Inc.), e o pulso elétrico gerado. Após o pulso elétrico, a cubeta foi imediatamente retirada da câmara, e as células foram coletadas com 1 mL de meio SOC. A suspensão foi transferida para um tubo de ensaio e incubada a 37 °C, por uma hora. Após esse tempo, as culturas foram transferidas para tubos de microcentrífuga, e as células foram então centrifugadas a 13.000 x g por três minutos em microcentrífuga Eppendorf (modelo 5417C), ressuspenso em 300 µL de meio SOC, plaqueadas em meio LB ágar contendo canamicina 30 µg/mL e incubadas por 16 horas a 37° C.

Extração de DNA plasmidial

Para a extração de DNA, inocularam-se bactérias de uma colônia isolada em 2 mL de meio LB, contendo o antibiótico para seleção. Essas bactérias foram crescidas a 37°C, com agitação durante 16 horas. Um volume de 1,5 mL das culturas foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado a 12.000 x g por 30 segundos, em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com 1mL de solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. A solução salina foi descartada, as células foram ressuspensas em 100 µL de solução de formação de protoplastos (SFP) (glicose 50 mM, EDTA 10mM, Tris 25 mM pH8,0) através de agitação em vórtex. Após incubação no gelo por 10 minutos, 200 µL de solução de lise (NaOH 200 mM, SDS 1%) foram misturados à suspensão através de agitação em vórtex. O tubo foi incubado no gelo por cinco minutos e após foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3M pH 4,8, misturando-se, novamente, por agitação. O tubo foi incubado no gelo por 15 minutos e centrifugado por cinco minutos, a 12.000 x g obtendo-se o sobrenadante contendo o DNA que foi transferido para novo tubo de microcentrífuga, ao qual foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado. Seguiu-se nova etapa de centrifugação por 10 minutos a 14.000 x g. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado de DNA foram adicionados 500 µL de etanol 70% para retirar o excesso de sal. Nas mesmas condições, foi realizada nova centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi desidratado em temperatura ambiente e ressuspenso num volume de 20 a 50 µL de H₂O deionizada. A essa solução foram adicionados 10 µg de RNase-A (Invitrogen), incubando-se por 20 minutos em temperatura ambiente.

Extração de dna plasmidial de bactérias utilizando “kit” comercial

Para extração de DNA plasmidial de bactérias através de kit, foi utilizado o *Transfection -grade plasmid DNA Nucleobond PC500* (Macherey Nagel) conforme a indicação do fabricante. Uma colônia isolada de *E. coli* foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB contendo 30 µg/mL de canamicina cultivadas por 16 a 18 horas, sob agitação a 37°C. O clone foi, então, repicado com 1% (5mL) de pré-inóculo em 500 mL de LB com canamicina na mesma concentração, sob agitação (250 rpm) a 37°C. O cultivo foi

expandido a 37° C, sob agitação, por 12 a 16 horas até atingir uma OD₆₀₀. A cultura foi centrifugada a 3.200 x g, por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 12mL de Solução de Ressuspensão (Tris-Hcl 50 mM pH7,5; EDTA 10 mM; RNase 100 µg/mL) por agitação em vórtex. As células foram transferidas para tubos cilíndricos de 50 mL e foram adicionados 12mL de Solução de Lise Celular (200 mM NaOH; SDS 1%). A solução foi misturada cinco vezes por inversão e foi incubada a temperatura ambiente por cinco minutos. Foram adicionados 12mL de Solução de Neutralização (guanidina hidrocloreídrico 4,09 M; Acetato de potássio 0,759 M; Ácido acético glacial 2,12 M) e imediatamente misturou-se quinze vezes por inversão. A mistura foi centrifugada a 14.000 x g, durante 10 minutos. Para o isolamento e purificação do DNA plasmidial, o lisado foi transferido para uma coluna de purificação, que foi inserida em um tubo cilíndrico coletor de 50 mL. Após, foram adicionados 25mL de Solução de Lavagem de Coluna (Acetato de potássio 60 mM; Tris-Hcl 8,3 mM pH7,5; 0,04 EDTA pH8,0, Etanol 60%) . O filtrado foi descartado. A coluna foi acoplada a um tubo cilíndrico de 50 mL. O DNA foi eluído por adição de 15mL de solução de eluição (Tris-Hcl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM). Após, a coluna foi descartada e ao tubo foi adicionado 10,5mL de isopropanol a temperatura ambiente em vórtex por dois minutos para promover a precipitação do DNA. Seguiu-se uma etapa de centrifugação a 15.000 x g por 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi desidratado em temperatura ambiente e ressuspenso num volume de 1mL de H₂O deionizada. O DNA plasmidial foi armazenado a -20°C.

3.2- Isolamento e caracterização das MSCs

Extração das MSCs

Para a extração de células-tronco mesenquimais foram utilizados como doadores ratos Wistar com peso entre 200 a 350g fornecidos pelo Biotério da UFRGS (CREAL). Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do HCPA e dissecados com utilização de material cirúrgico estéril. Os fêmures foram removidos, acondicionados em placa de Petry estéril contendo aproximadamente 10mL de PBS estéril (8 g of NaCl, 0.2 g of KCl, 1.44 g of Na₂HPO₄, 0.27 g of KH₂PO₄ para 1 litro H₂O) suplementado com 1% de

solução de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) (Invitrogen) e levados até o laboratório onde foram processados em fluxo laminar.

Os fêmures foram então transferidos para uma nova placa de Petry esteril. As epífises dos ossos foram retiradas. A agulha de uma seringa contendo meio D-MEM (Invitrogen) suplementado com 1% solução antibiótica foi inserida em uma extremidades do osso, o êmbolo da seringa foi pressionada promovendo assim a liberação da medula em um tubo falcon de 15mL. A medula óssea foi desagregada com a seringa (por aspirações e despejos sucessivos).

Cultivo primário das MSCs.

A suspensão celular formada pela desagregação da medula foi centrifugada 300-400 x g por 5 minutos a temperatura ambiente (Eppendorf) o sobrenadante foi descartado. As células foram novamente ressuspensas em 10 mL de PBS esteril e centrifugadas a 300-400 x g por 5 minutos. O meio de cultivo do sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 5mL de meio DMEM completo (10% SFB, 1% AB, 15 mM HEPES) e quantificadas em câmara de Neubauer. Foram plaqueadas 1×10^7 células/ frasco de cultivo T25 (TPP). Os frascos de cultivo foram incubadas em estufa umidificada com 5% de CO₂ no ar, a 37° C. Após 72 horas do plaqueamento, o meio de cultivo foi aspirado (juntamente com as células não aderentes) e foi adicionado novo meio DMEM completo. Quando as células apresentaram confluência de 70% foram subcultivadas.

Subcultura das MSCs

Quando atingiam 70-80% de confluência, as MSCs foram subcultivadas. Removia-se o meio de cultivo, e a monocamada era lavada por pelo menos duas vezes com PBS. Após, era adicionado aproximadamente 1mL de tripsina-EDTA (Gibco) e as células eram incubadas a 37°C por 5 minutos. Após a incubação, a tripsina era inativada por adição de 5mL meio de cultivo completo. As células eram quantificadas em câmara de Neubauer e semeadas na concentração $12,5 \times 10^4$ células /frasco de cultivo T25.

Curva de crescimento (*Number of population doublings*)

Para ter uma estimativa do crescimento populacional, durante o experimento frascos T25 foram semeadas com $12,5 \times 10^4$ células. Após 48 horas de cultivo, os frascos eram tripsinizados e o número de células quantificado em câmara de Neubauer. A estimativa de dobros populacionais foi realizada utilizando-se a fórmula:

$$NPD = \text{Log}_{10} (N/N_0) \times 3,33$$

onde N_0 = Número de células plaqueadas e N = número de células obtidas após 48 horas de cultivo.

Ensaio CFU-F

Foram plaqueadas $2,25 \times 10^5$ células viáveis/poço, em uma placa de 6 poços. As células foram incubadas em estufa umidificada com 5% de CO_2 no ar, a 37°C . 72 horas após o plaqueamento, o meio foi aspirado e foi adicionado 2 mL de meio fresco em cada poço. No 13º dia, o meio foi removido, as células fixadas com formalina 4% e coradas com Giemsa por 2,5 minutos a temperatura ambiente.

Imunofenotipagem

As células foram avaliadas por imunofenotipagem nas seguintes passagens P0 (no momento da extração), P1 (após a primeira tripsinização), P2 (após a segunda), P3 (após a terceira tripsinização). As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e aproximadamente 1×10^6 células foram preparadas em cada dia de análise. As suspensões celulares foram transferidas para tubos cilíndricos estéreis e lavadas duas vezes com PBS por centrifugação $500 \times g$ por 5 minutos. As células foram então ressuspensas em 200 μL de PBS e incubadas por 20 minutos a 4°C com os seguintes anticorpos: anti-CD45/FITC, anti-CD34/PE, anti-CD90/FITC, anti-CD11b/c/PE, anti-CD44/FITC e anti-CD29/PECy5. Anticorpos anti IgG1, IgG2a e IgM com PE e FITC foram utilizados como controle de isotipo das imunoglobulinas dos anticorpos primários. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS por centrifugação e finalmente ressuspensas em 500 μL . A suspensão celular foi analisada no citômetro de fluxo BD FACS-Calibur (Becton & Dickson), que possui um sistema com laser capaz de detectar até três fluorocromos excitados por 488nm. As amostras foram analisadas em cellquest e PAINT-A-GATE software.

Diferenciações

Após a décima passagem, $0,9 \times 10^4$ MSCs foram semeadas em placas de cultivo de 6 poços (TPP). Quando as culturas atingiram 60% de confluência, foi iniciado o protocolo de diferenciação que consiste na adição de reagentes específicos ao meio de cultivo. Quando em confluência, as células tiveram o meio de cultivo removido e substituído por meio de indução de diferenciação. O qual era substituído 2 vezes por semana, durante 3 a 4 semanas.

Meio para indução osteogênica-(PHINNEY et al., 1999) – DMEM 15 mM HEPES, 10% SFB, 1% AB, 10^{-8} mol/L Dexametasona, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Ácido Ascórbico 2-Fosfato (Sigma) e 10 mM/L β -Glicerolfosfato (Sigma).

Meio para indução adipogênica-(MEIRELLES e NARDI, 2003)- DMEM 15 mM HEPES, 10% SFB, 1% AB, 10^{-8} mol/L Dexametasona (Sigma) , 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulina e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Indometacina (Sigma).

Detecção das diferenciações

A detecção das diferenciações foi realizada por coloração com corantes específicos. Desta forma, a diferenciação osteogênica foi detectada por coloração com Vermelho de Alizarina, que cora matriz extracelular rica em Cálcio, e a diferenciação osteogênica foi detectada por coloração com Oil Red que tingem vacúolos de gordura. As colorações foram realizadas da seguinte forma: A monocamada de células foi lavada com PBS, fixada por 20 minutos com Paraformaldeído 1x (4g de paraformaldeído em 100 mL de PBS). Após a fixação as células foram lavadas uma vez com água deionizada e a monocamada foi coberta com solução de Vermelho de Alizarina (2g de Vermelho de Alizarina em 100 mL de água deionizada pH 4,1), ou solução de Oil Red (3,75 g de Oil Red O em 100 mL de Isopropanol). A solução corante permaneceu em contato com a monocamada por 5 minutos. Após, a monocamada de células foi lavada várias vezes com água deionizada e a placa de cultivo foi levada ao microscópio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-U) para análise microscópica e fotodocumentação.

3.3- Transfecção Gênica e ensaios *in vitro*

Transfecção das MSCs por eletroporação

MSCs entre entre 10^a e 15^a passagem foram transfectadas por eletroporação. As células foram trispsinizadas e removidas de garrafas de cultivo T75 (TPP), quantificadas em câmara de Neubauer. Um milhão de células foi ressuspenso em meio de cultivo DMEM sem soro e sem antibiótico. A suspensão celular foi colocada em Cubeta de 4mm. Neste momento, foram adicionados 60 µg do plasmídeo pIRES2-BTC-EGFP (plasmídeo que contem como inserto o gene da Betacelulina) ou 60 µg do plasmídeo pIRES2-EGFP (somente o plasmídeo comercial, sem o inserto). Este último foi utilizado como controle. Após a adição do DNA, a suspensão de células foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seqüência, a cubeta foi transferida para o eletroporador Gene Pulser XCell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) e o pulso elétrico foi gerado. As constantes elétricas utilizadas para a eletroporação foram: capacitância 950 µF, resistência 200Ω m e voltagem 350 V. Após a eletroporação as células foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e então colocadas em placas de cultivo de 6 poços (TPP) contendo 10 ml de meio H-DMEM 15 mM Hapes, 10% SFB, 1% AB, 10 mM Nicotinamida (Acros) e armazenadas em incubadora de CO₂ a 37°C. Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio de cultivo foi substituído por meio fresco e a transfecção avaliada em microscópio invertido com filtro de fluorescência procurando evidenciar células EGFP positivas. Quarenta e oito horas após a transfecção iniciou-se a seleção das células transfectadas.

Seleção das células em cultivo

Para a seleção das células transfectadas foi adicionada Geneticina (Gibco) ao meio de cultivo. O plasmídeo continha o gene de resistência ao antibiótico, dessa forma, as células positivamente transfectadas sobrevivem à presença do antibiótico, enquanto células que não expressam o plasmídeo morrem. Para a seleção foi inicialmente realizada um curva de sensibilidade a Geneticina em MSCs. As concentrações utilizadas na curva de sensibilidade foram 200 , 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 e 1600 µg de Geneticina por mL de meio de cultivo completo. Durante o estabelecimento da curva de sensibilidade o meio de cultivo contendo geneticina era substituído por meio fresco contendo a mesma concentração de antibiótico a cada 24

horas e as células avaliadas em microscópio invertido. Após uma semana de curva de sensibilidade, a identificação da concentração ideal para a seleção da população transfectada foi evidenciada, esta concentração foi utilizada na seleção de células durante todo o experimento.

Imunofluorescência para BTC

Para a comprovação da expressão de BTC em MSCs, foi realizado ensaio de imunofluorescência com anticorpo *anti-mouse BTC* (R&D Systems). Para tal, MSCs 4 dias após a eletroporação foram fixadas com 4% Formaldeído em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram permeabilizadas pela adição de Metanol 100% a 4°C e incubadas por 10 minutos a -20°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS por duas vezes e bloqueadas com PBS/Triton 5% BSA por 60 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção do PBS/Triton 5% BSA, as células foram lavadas uma vez com PBS/Triton e incubadas com o anticorpo anti-mouse BTC (R&D Systems) na concentração 1:100 em PBS/Triton *overnight*. Após a incubação, o anticorpo primário foi removido, e foi adicionado o anticorpo secundário *Anti-Goat IgG Cy3* (Sigma) na concentração 1:500 e incubado por 1 hora em câmara escura a temperatura ambiente. Após o final de reação, as células foram analisadas e fotodocumentadas em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TE 2000-U) com filtro para fluorescência vermelha.

Ensaio de liberação estática de insulina

As células transfectadas foram plaqueadas em uma concentração 1×10^5 células/poço em uma placa de 24 poços (TPP). A secreção de insulina nas células transfectadas foi capturada pelo método de liberação estática (LUMELSKY et al., 2001). As células foram incubadas em tampão *Krebs-Ringer Buffer* (KRB) (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl_2 , 1.1 mM MgCl_2 , 25 mM NaHCO_3 e 0,1% BSA). Um inibidor dos canais de Cálcio (Nifepidina, Sigma) foi adicionado ao meio 30 minutos antes da substituição do meio de cultivo pelo tampão KRB. O meio foi removido, as células lavadas com KRB e incubadas por 15 minutos com tampão KRB 2,7 mM Glicose a 37°. Após, a primeira incubação, as células foram incubadas por 1 hora a 37°C com diferentes concentrações de glicose em 200 μL de KRB (5 mM, 30 mM e 50 mM glicose). Após o período de incubação, o KRB foi coletado e armazenado em microtubos a -80°C até a realização do radioimunoensaio para a dosagem da insulina. Foram analisadas células transfectadas com pIRES2-EGFP-BTC e com o plasmídeo vazio nos dias 4, 8, 12 e 16 pós transfecção. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Radioimunoensaio

A quantidade de insulina imunorreativa nos sobrenadantes foi determinado por radioimunoensaio utilizando o kit *Rat Insulin RIA 13K* (Linco) de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente a cada tubo foi adicionado 100 μL de anticorpo anti-insulina, 100 μL de ^{125}I - insulina (insulina marcada com iodo radioativo) e 100 μl das amostras. Procedeu-se um período de incubação de 24 horas e os imunocomplexos foram precipitados com solução de 160 mL/L Polietileno Glicol. Um contador gama foi utilizado para determinar a presença de radioatividade nos precipitados. As determinações foram realizadas em duplicata. O ensaio radioativo foi realizado no Serviço de Patologia Clínica do HCPA- Bioquímica e Imunoensaio, por técnica licenciada na Comissão Nacional de Energia Nuclear.

Imunocitoquímica insulina

Para detecção da presença de insulina nas células transfectadas foi realizado ensaio de imunocitoquímica com anticorpo anti-insulina. As MSCs 10 dias após a

eletroporação foram fixadas com 4% Formaldeído em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram permeabilizadas pela adição de Metanol 100% a 4°C e incubadas por 10 minutos a -20°C. Após, foi adicionado peróxido de hidrogênio 5%. Em seguida, as células foram lavadas com PBS por duas vezes e bloqueadas com PBS/Triton 5% BSA por 60 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção do PBS/Triton 5% BSA, as células foram lavadas uma vez com PBS/Triton e incubadas com o anticorpo Anti-insulina policlonal (Dako) na concentração 1:300 em PBS/Triton *overnight*. Após a incubação, o anticorpo primário foi removido, as células foram lavadas por 3 vezes com PBS e foi adicionado o anticorpo secundário na 1:3000 as células foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora, o anticorpo foi então removido e as células lavadas por duas vezes com PBS. Em seguida foi adicionado Streptoavidina (incubando por 30 segundos) e DAB (também por 30 segundos). A monocamada de células foi lavada com água destilada e contracorada com Hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após, as células foram analisadas em microscópio óptico.

Extração de RNA das células transfectadas

Para verificar a expressão gênica nas células transfectadas, foi realizada extração de RNA em células MSCs 14 dias após a transfecção utilizando-se o kit *SS III First Strand super mix* (Invitrogen). O protocolo de extração seguiu as normas do fabricante. Um volume de 0,3 mL de solução de lise (NaOH 200 mM, SDS 1%) foi utilizado para 1×10^6 células. Com uma seringa com agulha de 18 gauge foram realizadas múltiplas aspirações e despejos para auxiliar no processo de lise celular. O material foi então centrifugado a $2.600 \times g$ por 5 minutos e transferido para um novo tubo de microcentrifuga. Ao novo tubo foi adicionado 0,3 mL de Etanol 70% em água DEPC (1 mL de Dietilpirocarbonato (Sigma) a 1 litro de água destilada). A solução foi, então, transferida para uma microcoluna contendo matriz de fibra que foi colocada em novo tubo de microcentrifuga. Foi realizada uma centrifugação a $12.000 \times g$, por 30 segundos.

O líquido foi descartado, e a microcoluna foi novamente assentada sobre o tubo. Adicionaram-se 700 μ L de Tampão de Lavagem (Tris-HCl 5 mM pH7,5; NaCl 50 mM;

EDTA 1,25 mM EDTA; Etanol 50%) e centrifugou-se novamente nas mesmas condições. Descartou-se o líquido, e nova centrifugação foi realizada. A microcoluna contendo o DNA foi, então, transferida para outro tubo de microcentrífuga e a ela foram adicionados 50 µL de H₂O DEPC para eluir o DNA. Após cinco minutos de incubação a temperatura ambiente, seguiu-se outra etapa de centrifugação nas mesmas condições anteriores. A microcoluna foi então descartada, e o RNA eluído ficou retido no tubo.

Análise da integridade de RNA e quantificação

Para avaliar a integridade do RNA obtido, 5 µL de volume da extração foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 2% em 0,5X TBE (Tris-HCl 44,5mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1mM). A amostra de RNA foi adicionada de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%, EDTA 1 mM) e aplicada no gel que continha 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi submetido a voltagem de 80-100 V em tampão 0,5X TAE. O RNA foi visualizado por iluminação ultravioleta a 512 nm, e fotografado em máquina digital (Nikon). A concentração de RNA foi determinada por mensuração de densidade óptica em filtro de 260 nm (OD₂₆₀) utilizando a calculadora GeneQuant RNA/DNA.

Síntese de cDNA

Os RNAs extraídos de MSCs após quatorze dias de transfeção com pIRES2-EGFP-BTC, pIRES2-EGFP (plasmídeo vazio) , MSCs não transfectadas (controle negativo para expressão gênica) e células de insulinoma da linhagem RINm5f (controle positivo para expressão gênica) foram utilizados para a síntese de cDNAs. As reações para síntese de cDNA foram realizados em DNA "Thermal Cycler" (MJ Research). Foram realizadas reações de 20 µL que continham 1µg de RNA, 1,6 µL de Oligod(T)₁₆ (50 µM m 10 mM Tris-HCl pH 8.3) (Invitrogen), 2 µL de 10 µM dNTPs (Invitrogen), 1 µL de MuLV transcriptase reversa (50 U/µL - Invitrogen), 4 µL 5X buffer MuLV (Invitrogen), 1 µL de 0,1M DTT (Invitrogen). As reações foram mantidas por uma hora a 42°C, 5 minutos a 99°C, resfriados a 4°C e armazenados a -20°C até o uso.

Reações de PCR

As reações de polimerização em cadeia (PCR) foram realizadas em aparelho termociclador DNA “Thermal Cycler” (MJ Research), modelo PTC 100. As reações continham 1 µg de cDNA, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em 10x (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM) em um volume de um décimo do volume final da reação. A reação foi incubada por um minuto, a 94 °C, seguida de 40 ciclos de incubações a 94°C, por um minuto, a 55°C – 65°C, por um minuto (dependendo do conjunto de iniciadores utilizados) e a 72°C, por um a dois minutos (dependendo do tamanho do fragmento que estava sendo amplificado). Por último, seguiu-se incubação a 72° C, por 10 minutos.

Desenho dos Iniciadores (primers)

Os iniciadores utilizados para as reações de PCR foram desenhados com base nas seqüências codificadoras dos genes: INS1, PDX1, PAX4, NKX6.1, β-TUBULINA.

Nome do primer	Seqüência
Insulina 1 (187 bp)	5'- GGG GAA CGT GGT TTC TTC TA-3'
	5'- TAG ACG AGG GAG ATG GTT GAC C-3'
PDX1 (490bp)	5'- TAG TGA GGA GCA GTA CTA CG-3'
	5'- AGA ATT CCT TCT CCA GCT CC-3'
PAX4 (241 bp)	5'- TGG CTT TCT GTC CTT CTG TGA GG-3'
	5'- TCC AAG ACT CCT GTG CGG TAG TAG-3'
NKX6.1 (279bp)	5'- ATG GGA AGA GAA AAC ACA CCA GAC-3'
	5'- TAA TCG TCG TCG TCC TCC TCG TTC-3'
BTC (659bp)	5'-GGC CCA GGA AGG GCA TAG AGA-3'
	5'-ATG AGT CAG GTC TTT TGT AGC TTG-3'
B- TUBULINA (317bp)	5'-GGAACATAGCCGTAACACTGC-3'
	5'-TCACTGTGCCTGAACTTACC-3'

Figura 6: Quadro com o desenho dos primers .

Eletroforese horizontal de DNA em gel de agarose e documentação

Eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% em 0,5X TAE (Tris-HCl 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM). A amostra de DNA foi adicionada de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%, EDTA 1 mM), e aplicada no gel contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. O gel foi submetido à voltagem de 80–100V em tampão 0,5X TAE. O DNA foi visualizado por iluminação ultravioleta, a 512 nm, e fotografado em máquina digital (Nikon).

3.4- Ensaio in vivo

Modelo Animal

O experimento seguiu as Diretrizes para a Utilização de Animais em Experimentos Científicos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ratos Wistar machos, adultos jovens pesando entre 250 e 350 g foram obtidos Biotério da UFRGS (CREAL). Os animais foram alimentados com ração e água “ad libitum”, em ciclo de sono vigília de 12 horas e foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do HCPA. A indução de diabetes foi realizada por uma única injeção intraperitoneal de Streptozotocina (Sigma) 70 mg/kg em Tampão Citrato Fosfato (Citrato de Sódio 0,1 M, Ácido Cítrico 0,1 M pH4,5). A glicemia foi avaliada utilizando glucômetro (Optium Xceed, Abbott). Foi realizada medida da de glicemia antes e uma semana após a injeção da droga. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 300 mg/dL.

Transplante das células

Os animais foram divididos em dois grupos, cada um contendo 11 ratos.

Grupo BTC – os animais receberam 4×10^6 células-tronco mesenquimais transfectadas com o plasmídeo pIRES2-BTC-EGFP.

Grupo controle- os animais receberam 4×10^6 células-tronco mesenquimais transfectadas com pIRES2-EGFP (plasmídeo vazio).

Para o transplante, os animais foram anestesiados com Ketamina 100 mg/kg Xilasina 10 mg/kg. Após a anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal, foi realizada tricotomia na área abdominal e assepsia com álcool iodado. Foi realizada uma incisão na linha alba e o rim esquerdo foi exposto. Com uma seringa de 1mL, as células foram depositadas suavemente entre o parênquima do rim e a cápsula renal em um volume de 50 μ L de PBS. Após, a injeção foi realizada sutura utilizando fio *mononylon* 3.0. Como analgesia, os animais receberam uma injeção de dipirona 400 mg/kg intramuscular.

Análise pós transplante

Após o transplante, os animais foram mantidos em ciclo de sono vigília de 12 horas e foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas sem restrição na dieta. Nos dias 14, 21, 28 e 35 após o transplante os animais foram pesados em balança de precisão e a glicemia foi mensurada através de glucômetro.

Eutanásia

No 35º dia após o transplante, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os rins e pâncreas foram coletados, fixados em formalina 10% e incluídos em bloco de parafina para confecção de lâminas. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e analisadas em microscópio óptico.

3.5- Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e erro padrão. Foi utilizado o teste Anova para medidas repetidas, seguido, se necessário pelo teste de Bonferroni. O nível de significância estabelecido foi de 5% para todas as análises. Foi utilizado o programa SPSS versão 16.

4- RESULTADOS

Construção do transgene

Foi construído um vetor de expressão plasmidial com base no vetor comercial pIRES2-EGFP (Clontech) onde, no sítio EcoRI , foram inseridos 649 pares de bases referentes ao cDNA da BTC. Este vetor foi denominado pIRES2-BTC-EGFP e contém 5,7 kilobases. Durante o experimento, foi utilizado como controle, o plasmídeo comercial sem o inserto (pIRES2-EGFP), para que fosse possível ter a certeza que os resultados obtidos deviam-se unicamente a expressão da BTC e não a algum dos outros componentes presentes no vetor, nem mesmo ao método de seleção *in vitro*.

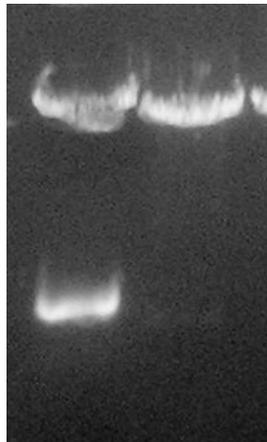


Figura 7: Padrão de digestão com EcoRI do plasmídeo pIRES2-EGFP-BTC e pIRES2-EGFP. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e observado sob luz ultravioleta. Linha 1: plasmídeo pIRES2-EGFP-BTC clivado com EcoRI mostrando um fragmento de aproximadamente 649 pb; linha 2: plasmídeo pIRES2-EGFP clivado com EcoRI não apresentando qualquer fragmento.

Caracterização do cultivo de longo termo de MSCs

Foi estabelecido o cultivo de longo termo de MSCs a partir de células obtidas da medula óssea de ratos Wistar adultos jovens. As células foram selecionadas por capacidade de adesão ao plástico do frasco de cultivo, e apresentaram-se como células morfológicamente afiladas, fibroblastóides, com núcleo bem delimitado, dois a três nucléolos bem evidentes e citoplasma amplo, com limites imprecisos e borda irregular (Fig. 8).

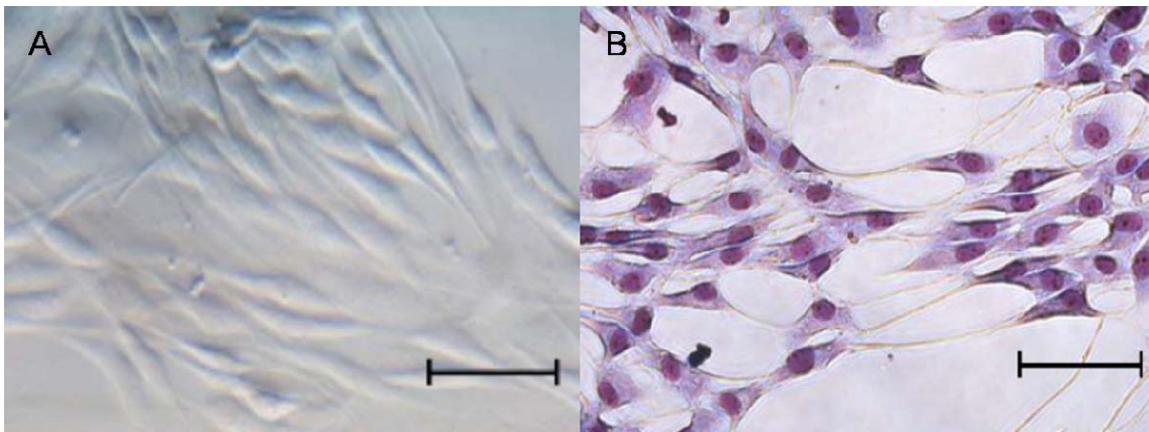


Figura 8: Morfologia de MSCs (barras de escala representam 100 μ m). A) Morfologia das MSCs em microscopia de contraste de fase. B) Morfologia de MSCs coradas com HE.

As células semeadas a uma concentração de 1×10^7 tornaram-se confluentes em aproximadamente 7 dias. Período este onde começaram os subcultivos celulares. Sempre que as MSCs atingiam confluência de aproximadamente 80% ou mesmo, quando podiam-se evidenciar algumas colônias muito confluentes na placa, estas eram tripsinizadas.

Curva de crescimento –“*Number of population doublings*”

Para estimarmos o crescimento populacional, realizamos um ensaio de curva de crescimento através do cálculo de dobros populacionais “*Number of population doublings*”, utilizando a seguinte fórmula: $NPD = \text{Log}_{10} (N/N_0) \times 3,33$.

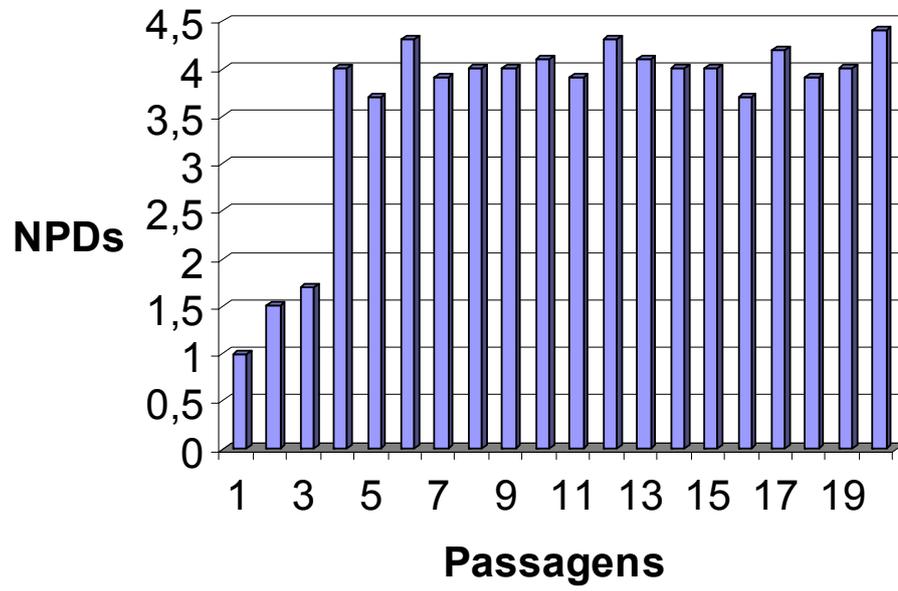


Figura 9:
Gráfico do
número de
dobros
populacionais

Observamos que a partir da terceira passagem, a população celular apresentou aproximadamente 4 dobros populacionais a cada 48 horas sem apresentar qualquer indício de senescência ou diminuição na proliferação celular.

Ensaio de CFU-F

A formação de CFU-F é considerada indicativa da presença de MSCs em uma amostra, realizamos ensaios de CFU-F com células obtidas da medula óssea de cada rato doador. Obtivemos formação de colônias em todas as amostras, indicando a presença de MSCs. Plaqueadas em baixa densidade, MSCs após 13 dias formaram colônias com mais de 50 células (Fig.10).

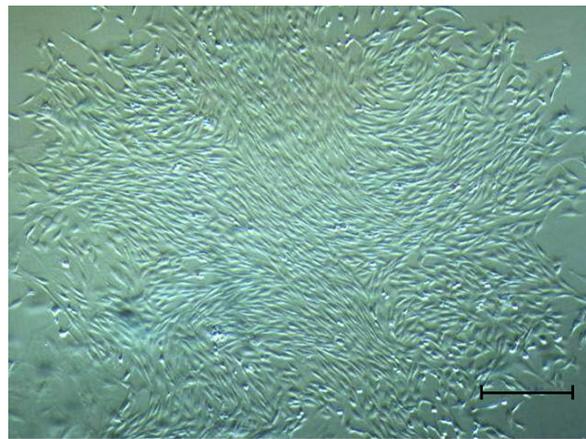


Figura 10: Ensaio colônia de MSCs fase. A barra de

CFUF. A) Aspecto de uma em microscopia de contraste de escala representa 100 μm .

Imunofenotipagem

Um milhão de células foram analisadas a cada passagem (P0, P1, P2, P3). Foi elaborado um painel de anticorpos disponíveis para MSCs de ratos. O painel formado consistiu dos seguintes anticorpos: *Seleção Positiva* – CD29, CD44 e CD90; *Seleção Negativa*- CD34, CD45 e CD11bc.

Na terceira passagem, a grande maioria das células apresentou positividade para a expressão dos antígenos de superfície CD44 (99.3%), CD90 (99,8%), e CD29 (99.5%). Como esperado, somente uma pequena população de células apresentou positividade para CD45 (0,9%) e CD111b/c (0,52%). Ainda, nenhuma expressão de CD34 foi detectada na terceira passagem. Devido ao padrão uniforme de expressão de antígenos de superfície, estes dados sugerem que a população de células em cultivo, nesta etapa (aproximadamente 24 dias de cultivo), poderia ser considerada como MSCs.

Ensaio de Diferenciação Celular

MSCs devem ser capazes de diferenciarem-se em adipócitos, condrócitos e osteócitos. As MSCs utilizadas nesse trabalho foram submetidas a protocolo de diferenciação em osteócitos e adipócitos. As diferenciações puderam ser evidenciadas já na primeira semana de indução.

A diferenciação adipogênica pôde ser visualizada devido à presença de vacúolos de gordura no citoplasma das células (Fig.11a). A comprovação da diferenciação foi realizada através de coloração com Oil Red (Fig 11b).

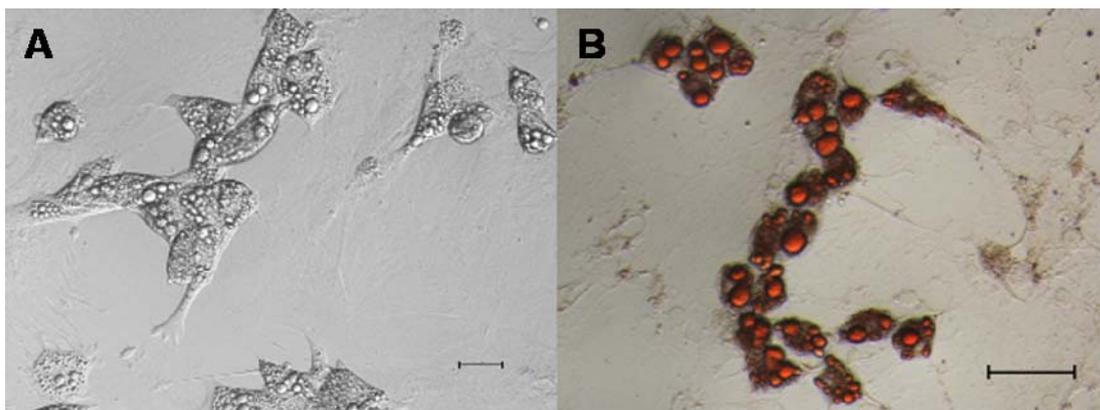
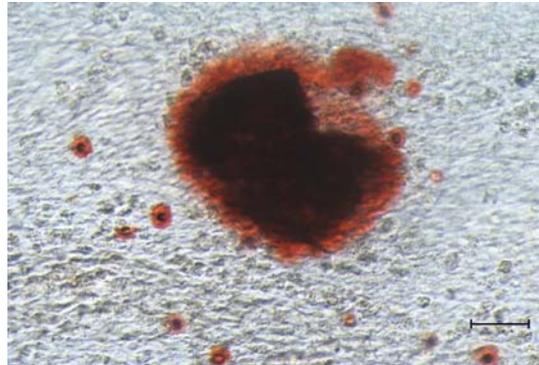


Figura 11: Diferenciação em tecido adiposo. Barras de escala representam 100 μm . A) Aspecto de MSCs sob indução de diferenciação adipogênica em microscopia de contraste de fase. B) Comprovação da diferenciação, vacúolos de gordura corados por Oil Red.

Após a indução, a diferenciação osteogênica foi detectada por coloração com Vermelho de Alizarina, que cora de vermelho a matriz extracelular rica em cálcio secretada pelos osteoblastos.

Figura 12:
osteogênica. Matriz
de Alizarina. Barra



Detecção da diferenciação
extracelular corada com Vermelho
de escala= 100 μ m.

Transfecção

A transfecção gênica de MSCs, assim como de qualquer cultura primária, não é facilmente realizada. Neste trabalho, utilizamos o método de transfecção por eletroporação com sucesso. Atingimos aproximadamente 40% de eficiência de transfecção (Fig. 13). Após a transferência gênica, células transfectadas com o plasmídeo pIRES2-EGFP foram denominadas pIRES-MSCs; e células transfectadas com pIRES2-BTC-EGFP foram denominadas BTC-MSCs.

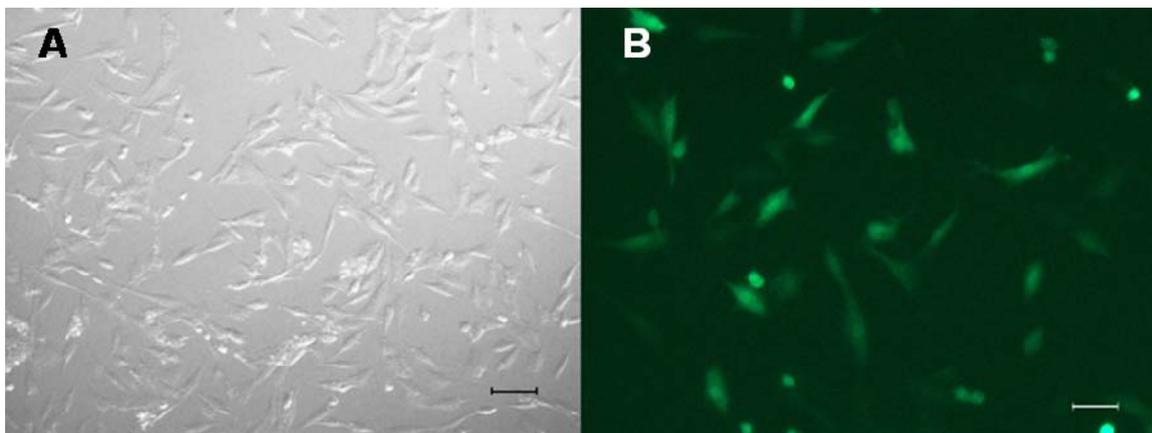


Figura 13: Transfecção celular. Barras de escala representam 100 μ m. A) Fotomicrografia de contraste de fase- células MSCs 24 horas após a transfecção com pIRES2-EGFP. B) Expressão da proteína verde fluorescente nas células transfectadas com pIRES2-EGFP.

Seleção das células MSCs transfectadas

Foi realizada curva de sobrevivência de MSCs não transfectadas com o antibiótico geneticina. Foram testadas as seguintes concentrações: 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 e 1600 μg de Geneticina por mL de meio de cultivo completo. A concentração utilizada no trabalho foi a de 1400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, uma vez que esta apresentou 100% de morte celular, após uma semana de seleção.

Imunofluorescência para BTC

Com o intuito de verificar se as células MSC transfectadas e selecionadas com geneticina realmente expressavam o gene de interesse (BTC), foi realizado ensaio de imunofluorescência. Com este, foi possível observar a expressão de BTC evidenciada por fluorescência vermelha. Verificamos que existe co-localização entre EGFP (gene repórter do plasmídeo) e BTC (Fig. 14). Na Figura 15, podemos evidenciar células expressando betacelulina contra-coradas com o corante nuclear DAPI.

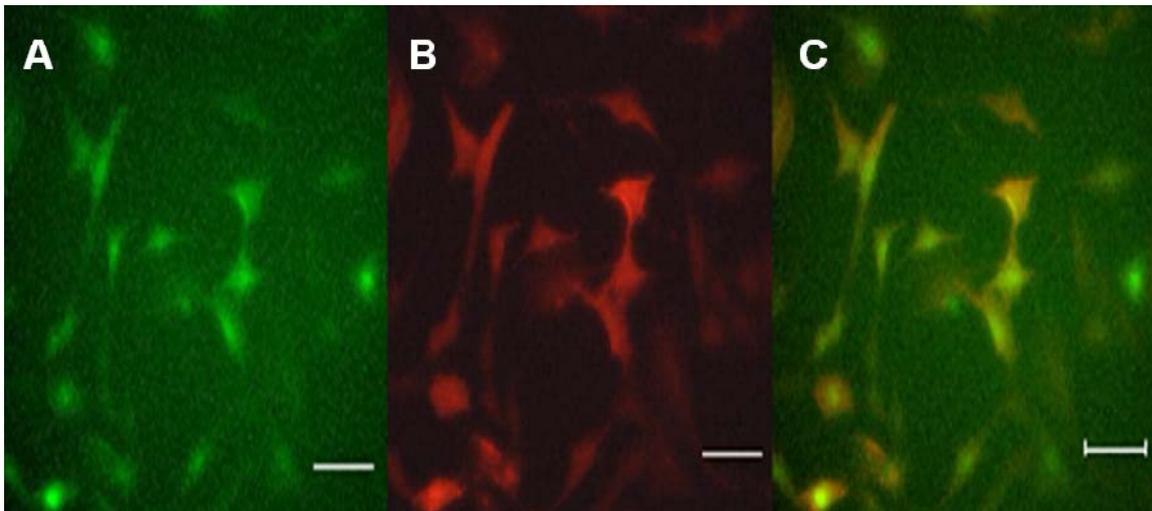


Figura 14: Fotomicrografia da imunofluorescência para betacelulina em células BTC-MSCs. A) Expressão de EGFP. B) Expressão de BTC (R&D Systems e Anti-Goat IgG Cy3 (Sigma)). C) Merge.

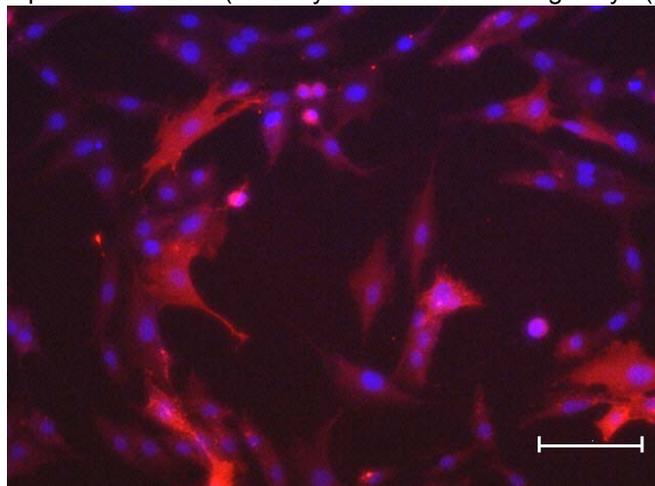


Figura 15: Imunofluorescência para betacelulina. Células expressando BTC- CY3. Núcleos com fluorescência DAPI. Barra de escala representa 100 μm .

Análise do efeito da superexpressão de betacelulina *in vitro*

Análise morfológica

Dez dias após a transfecção, BTC-MSCs sofreram diferenciação morfológica, passando a apresentar morfologia epitelíóide, conforme demonstrado na Figura 16. Enquanto que as células pIRES-MSCs, mantiveram sua morfologia fibroblastóide.

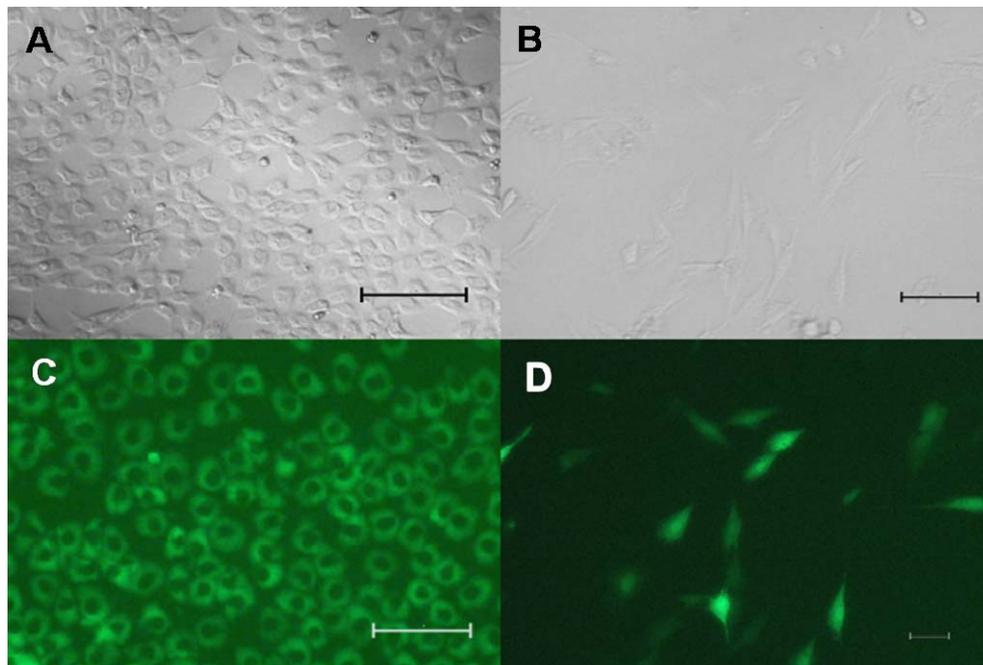
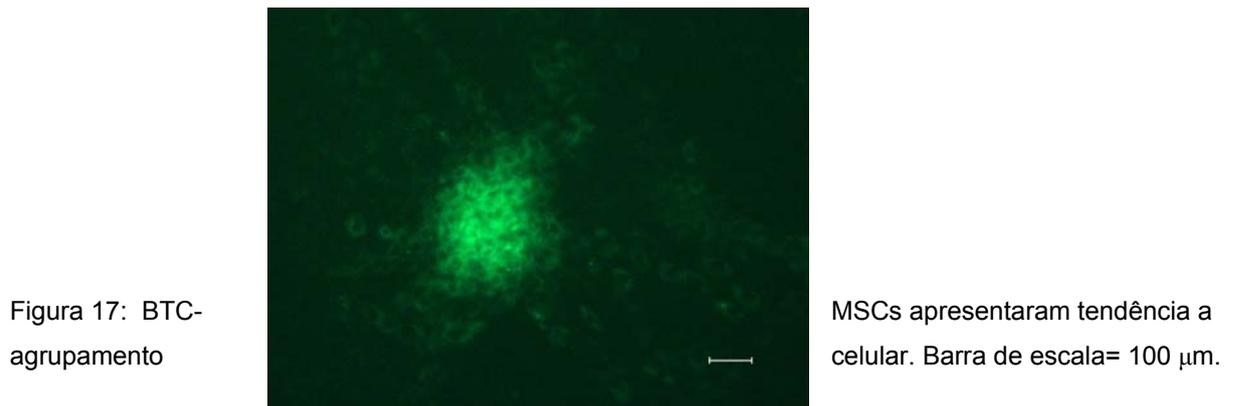


Figura 16:

Fotomicrografia demonstrando a diferenciação na morfologia das células BTC-MSCs detectada 10 dias após a transfecção. Barras de escala representam 100 μm . A) Células BTC-MSCs com morfologia epitelíóide em contraste de fase. B) Células pIRES-MSCs com morfologia fibroblastóide em contraste de fase. C) Células BTC-MSCs com morfologia epitelíóide, expressando EGFP em microscopia de fluorescência. D) Células pIRES-MSCs com morfologia fibroblastóide, também expressando EGFP em microscopia de fluorescência.

Além da diferenciação morfológica, as células BTC-MSCs também apresentaram, quando cultivadas por períodos mais longos (após 23 dias de cultivo), uma tendência a formar grupamentos celulares (Fig17).



Após a formação dos grupamentos celulares descritos acima, estes formavam estruturas tridimensionais semelhantes a esferóides, denominados “*spheroids islet-like cells*”, como pode ser observado na Figura 18.

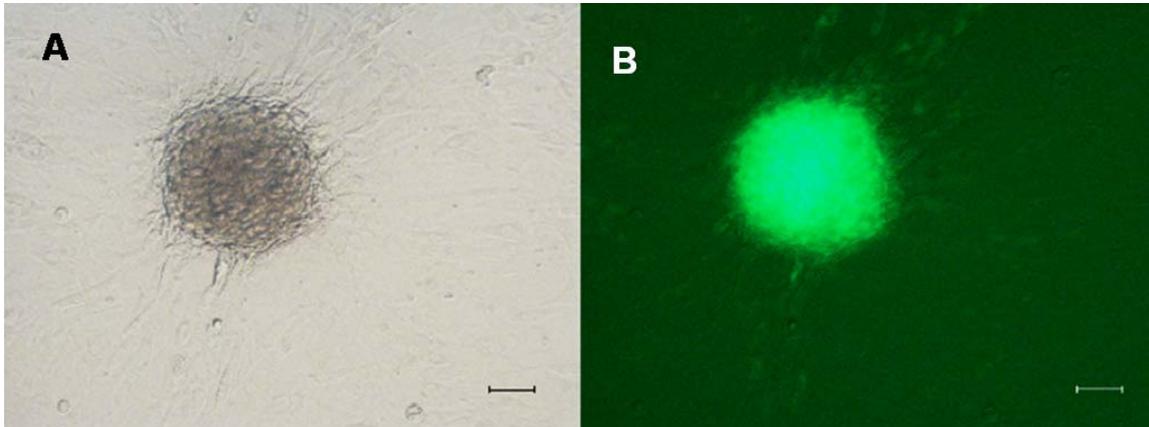


Figura 18: “*Spheroids islet-like cells*” formadas em culturas células BTC-MSCs. Barra de escala = 100 μm . A) Esferóide observado em microscopia de contraste de fase. B) Esferóide observado em microscopia de fluorescência.

Imunocitoquímica anti-insulina

Células MSCs de ratos transfectadas com o gene BTC apresentaram positividade para a expressão de insulina, comprovada por imunocitoquímica.

Pode-se visualizar, em um mesmo campo microscópico, células apresentando marcação de peroxidase intracitoplasmática, o que indica positividade para insulina e células negativas para a produção de insulina.



Figura 19: Imunocitoquímica demonstrando a produção de insulina pelas células BTC-MSCs. A seta vermelha indica um grupo de células com morfologia epitelióide com marcação positiva para insulina. A seta azul indica células com morfologia fibroblastóide e ausência de marcação com peroxidase para insulina. Barra de escala representa 100 μm .

Ensaio de liberação estática de insulina

A secreção de insulina nas células MSCs transfectadas foi capturada pelo método de liberação estática (LUMELSKY et al., 2001). A quantidade de insulina imunorreativa nos sobrenadantes foi determinada pela técnica de radioimunoensaio, utilizando-se o kit *Rat Insulin RIA 13K* (Linco) e quantificada por contador gama.

Foi possível detectar a secreção de insulina pelas células BTC-MSCs a partir do 8º dia de cultivo pós-transfecção. Por outro lado, as células pIRES-MSCs, conforme o esperado, não produziram valores detectáveis de insulina durante todo o experimento.

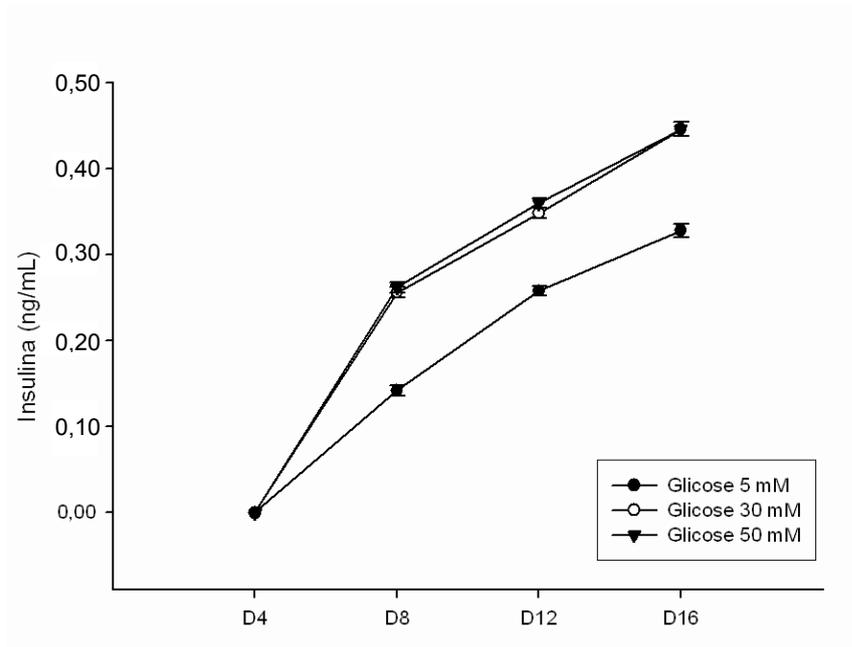


Figura 20: Gráfico demonstrando a secreção de insulina *in vitro* pelas células BTC-MSCs, quantificada por radioimunoensaio.

Observou-se que a produção de insulina por células BTC-MSCs aumenta de acordo com os dias em cultivo e que sofre influência da concentração de glicose no meio. Essa diferença é estatisticamente significativa ($p=0,01$), quando se compara a dose de 5mM e 30mM de glicose ou entre 5mM e 50mM de glicose. Não houve diferença significativa entre as concentrações de glicose 30mM e 50mM ($p=0,83$).

RT-PCR

Através da análise das amostras de mRNA das células transfectadas por RT-PCR, foi possível encontrar transcritos dos genes INS1, PAX4, PDX1 E NKX6.1 em BTC-MSCs. A Figura 21 demonstra a eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das amostras. A seqüência de β -tubulina foi utilizada como controle interno da reação e RINm5f foi utilizada como controle positivo para a expressão de genes pancreáticos.

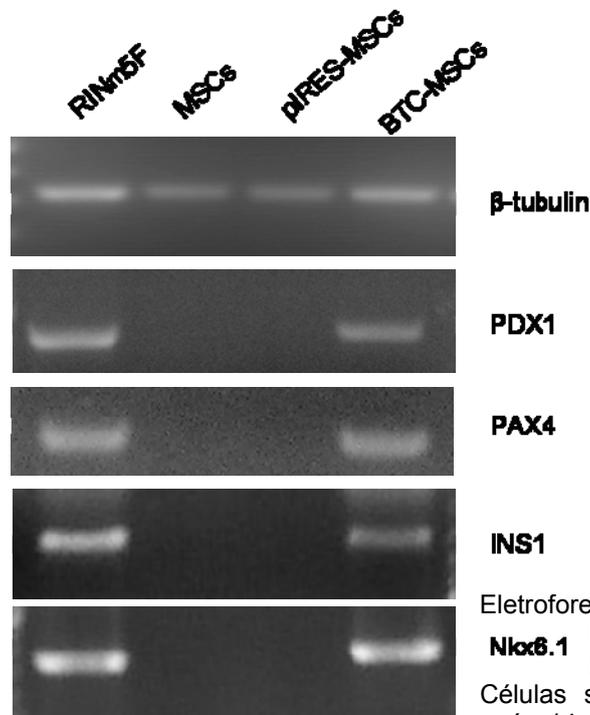


Figura 21: de amostras de células MSCs e BTC-MSCs . MSCs) apresentam,

Eletroforese dos produtos de RT-PCR RINm5 (controle positivo); de (controle negativo); pIRES-Células superexpressando BTC (BTC- após 14 dias de cultivo, expressão dos

genes PDX1, PAX4, INS1 E NKX6.1, típicos de células β -pancreáticas.

Transplante das células BTC-MSCs para modelo animal de DM

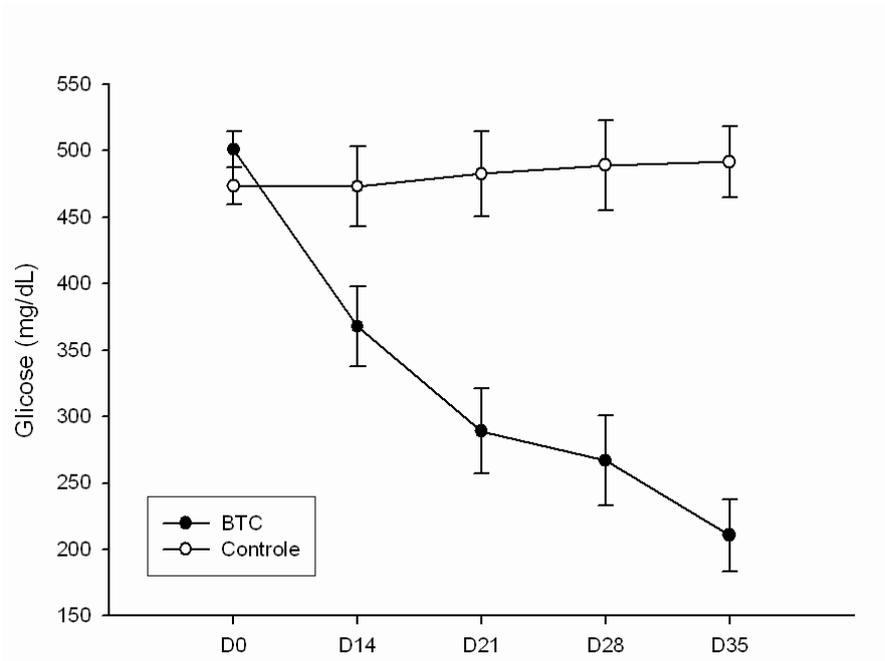
O modelo animal de DM induzido por Streptozotocina foi estabelecido com uma única dose intraperitoneal de 70mg/kg da droga. Os animais apresentaram alteração nos níveis glicêmicos 2 ou 3 dias após o tratamento. Após duas semanas de controle das dosagens de glicose, todos os animais apresentaram glicemia superior a 300 mg/dL e foram utilizados como receptores. As células transfectadas foram transplantadas após 12 dias de cultivo em meio de seleção, para o rim esquerdo dos receptores, conforme Figura 22.



Figura 22: Transplante de células BTC-MSCs para ratos com DM induzido por Streptozotocina. A) Momento da injeção de células sob a cápsula renal. B) Sutura da incisão abdominal após o transplante.

Células MSCs de rato superexpressando betacelulina, quando transplantadas sob a cápsula renal de ratos com diabetes, induzida por Streptozotocina, foram capazes de reduzir a hiperglicemia. A diminuição nos níveis de glicose teve início 14 dias após o transplante. A média de glicemia do grupo BTC passou de 500mg/dL para menos de 200mg/dL ($p=0,001$). Em contraste, o grupo controle (que recebeu células pIRES-MSCs) não sofreu redução nos níveis de glicose (Fig. 23).

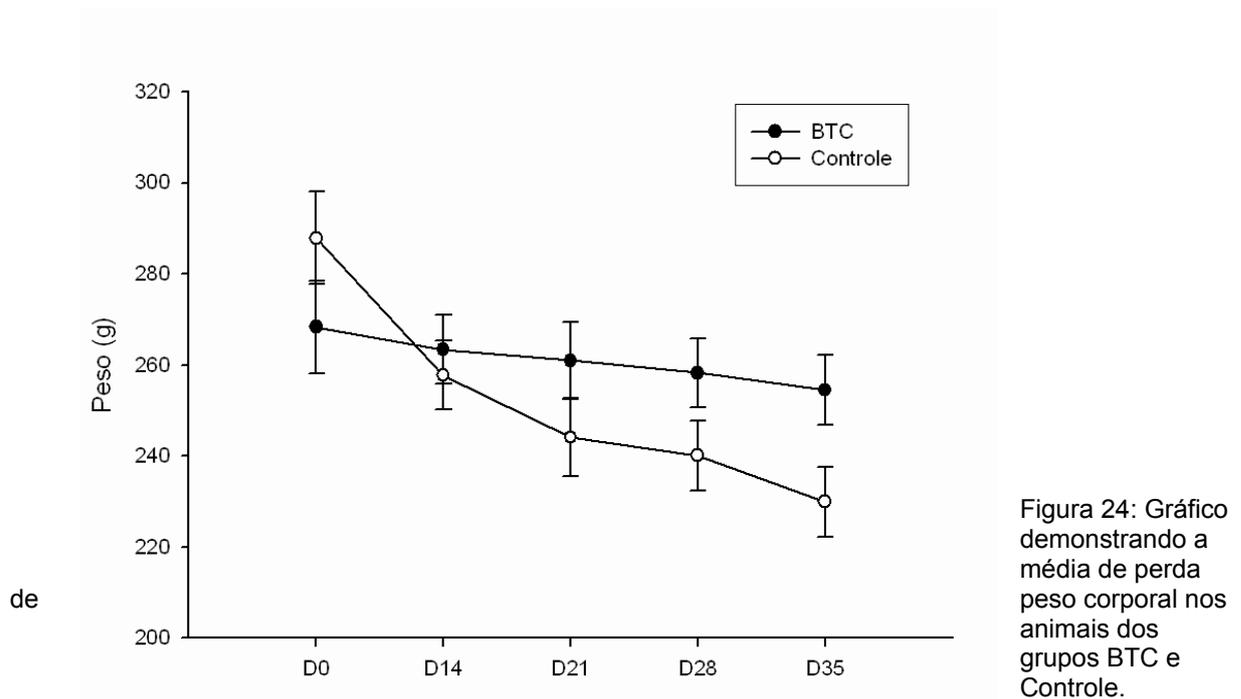
Figura
a média
dos



células
(BTC) e dos animais que receberam transplante de células pIRES-MSCs (controle).

23: Gráfico representando da glicemia animais que receberam transplante de BTC-MSCs

Além da diferença detectada nos valores da glicemia dos animais, foi possível também observar que houve uma menor perda de peso pelos animais que receberam transplante de células MSCs superexpressando betacelulina, esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,01$) (Fig. 24).



Após 35 dias, os animais transplantados foram eutanasiados. Os rins e pâncreas destes foram coletados, para a realização de análise histológica. Na análise macro e microscópica dos rins, não foi possível evidenciar qualquer indício de formação de tumor ou crescimento celular intenso. Na análise microscópica do pâncreas (Fig. 25 e 26), foi possível observar um número muito reduzido de Ilhotas de Langerhans nos animais diabéticos, o que comprova que a melhora na glicemia dos animais do grupo BTC foi ocasionada por produção de insulina oriunda das células transplantadas (BTC-MSCs) e não por uma regeneração pancreática espontânea.

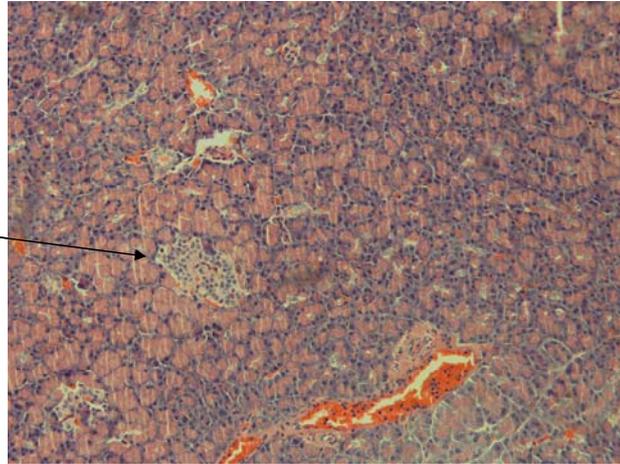
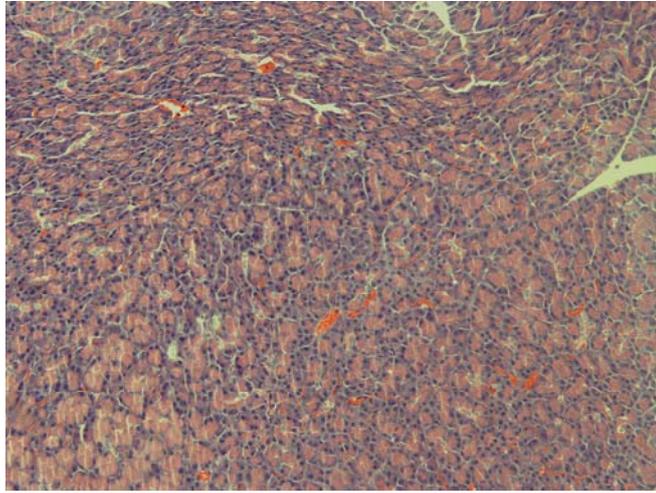


Figura 25: Corte de rato diabético, células BTC-MSCs, de HE. Pode-se visualizar apenas uma ilhota (indicada pela

seta). Aumento= 20x

Figura 26: Corte de rato diabético, células BTC-MSCs de HE. Neste maioria, não foi presença de nenhuma ilhota pancreática. Aumento= 20x.



histológico do pâncreas transplantado com submetido à coloração campo, assim como na possível visualizar a

5- DISCUSSÃO

Mesmo com os avanços da indústria farmacêutica, o rígido controle da glicemia não consegue eliminar completamente as complicações ocasionadas pelo DM. O transplante de pâncreas, ou ilhotas pancreáticas pode reconstituir a função de regulação da glicose, mas é limitado devido à escassez de doadores para transplante, necessidade de imunossupressão, e perda da função de ilhotas, após o transplante (CHEN et al., 2007). Neste sentido, fontes de células produtoras de insulina, outras que não células β pancreáticas são necessárias.

No presente trabalho, desenvolvemos uma estratégia para induzir a formação de células produtoras de insulina, a partir da superexpressão de BTC em MSCs de ratos cultivadas na presença de nicotinamida. Evidências de estudos anteriores, demonstraram que existem duas vias para a regeneração pancreática e formação de novas células β : A) replicação de células exócrinas e endócrinas preexistentes e B) proliferação e diferenciação de células do epitélio ductal (TRUCCO, 2005). A BTC está envolvida nessas duas vias, ela induz a proliferação de linhagens celulares de insulinoma *in vitro* (HUOTARI et al., 1998) e induz a diferenciação da linhagem celular exócrina AR42J em células produtoras de insulina (MASHIMA et al., 1996). Esse potencial de indução de diferenciação para células β pancreáticas da BTC pode ser explicado pela ativação de EGFR, que acaba por afetar a função celular em diversos níveis, dependendo da via de sinalização que for ativada (MIETTINEN et al., 2008). Nossos resultados *in vitro* sugerem que a superexpressão de BTC em MSCs de ratos possivelmente ativou a expressão de importantes fatores de transcrição pancreáticos, induzindo a diferenciação *in vitro* de MSCs em células produtoras de insulina.

Em concordância com Gershengorn e colaboradores e baseado nas modificações morfológicas observadas em nosso trabalho, podemos postular que a diferenciação das MSCs induzida por betacelulina ocorreu inicialmente através de uma transição mesenquimal-epitelial e em seqüência ocorreu a diferenciação endócrina, que resultou na produção de insulina (GERSHENGORN et al., 2004). Os mecanismos moleculares relacionados com a diferenciação de MSCs em células produtoras de insulina não estão completamente esclarecidos. Não é possível afirmar se a

superexpressão de BTC ativou genes que estavam silenciados nas células MSCs ou, se a expressão de BTC, estimulou a expressão de genes não-silenciados.

Com base em nossos resultados, podemos especular que, na medula óssea, residem células pluripotentes em estado quiescente, e que estas células, sob determinados estímulos, podem atravessar a barreira de comprometimento com a camada germinativa de que se originam e gerar células diferenciadas de endoderme, ectoderme ou mesoderme. Desafiando o conceito, aceito por muitos, de que células-tronco adultas são células multipotentes, que só podem gerar células da mesma camada germinativa a que pertencem. Por essa lógica, MSCs, que são de origem mesodérmica, não teriam a capacidade de formar células β pancreáticas, que são originárias da endoderme.

Em nosso trabalho, durante o cultivo, as BTC-MSCs modificaram seu padrão de expressão gênica e passaram a expressar marcadores determinantes para o desenvolvimento pancreático. Os dados de RT-PCR demonstraram a expressão de quatro importantes genes pancreáticos (PDX1, NKX6.1, PAX4 e INS1) em BTC-MSCs. A expressão combinada de PDX1 e NKX6.1 é encontrada tanto em progenitores pancreáticos, quanto em células β pancreáticas adultas (RUDNICK et al., 1994), indicando que BTC-MSCs apresentaram perfil de expressão característico de células β . A nicotinamida, que desempenha efeito inibitório sobre a enzima nuclear poli-ADP-ribose-sintetase, está relacionada com diferenciação celular em muitos tipos de células. Tem efeito proliferativo sobre células β (SUGIYAMA et al., 1991) e é uma potente indutora de diferenciação em células fetais pancreáticas (OTONKOSKI et al., 1993). Estes efeitos estão relacionados a mudanças na ribolização do ADP de proteínas nucleares, resultando em modificações na estrutura de cromatinas nucleares, que habilitariam a transcrição de genes previamente inativados no DNA das células. Durante nosso trabalho, células BTC-MSCs e pIRES-MSCs foram cultivadas em meio contendo 10 mM Nicotinamida, assim, sem dúvidas, a diferenciação celular observada ocorreu devido ao somatório das ações da BTC e da Nicotinamida. Uma vez que, células mesenquimais transfectadas com plasmídeo não contendo o inserto (pIRES-MSCs) foram também cultivadas na presença de Nicotinamida e não apresentaram produção de insulina, nem diferenciação morfológica.

O papel fundamental das células β pancreáticas é produzir e secretar insulina em resposta a variação de glicose. Em nosso trabalho, as células BTC-MSCs foram capazes de produzir insulina detectada através das técnicas de imunocitoquímica e radioimunoensaio. A secreção de insulina por BTC-MSCs *in vitro* foi regulada por glicose; porém, ocorreu também em concentrações acima das fisiológicas. Enquanto que a secreção fisiológica de insulina por células β ocorre entre 5-10mM de glicose, as células BTC-MSCs produziram a maior quantidade de insulina em resposta a concentrações mais elevadas (30mM de glicose), indicando uma possível diferença existente entre a modulação da liberação de insulina entre as células β pancreáticas e as células BTC-MSCs. Ainda, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre a secreção de insulina pelas células BTC-MSCs *in vitro* em concentrações de 30 e 50mM de glicose. Acreditamos que talvez estas células possam ter atingido seu platô de secreção de insulina.

Foi claramente demonstrado que o transplante de células BTC-MSCs para a cápsula renal de ratos diabéticos, resultou em uma importante redução nos níveis de glicose sanguínea. Este processo teve início 14 dias após o transplante. Os valores de referência para a normalidade na glicemia de roedores variam entre 50-135 mg/dL (HARKNESS e WAGNER, 1995). Em nosso trabalho, animais que receberam pRES-MSCs apresentaram, no dia 35 pós-transplante, valores médios de $492 \pm 30,5$ mg/dL. Em contraste, animais diabéticos que receberam 4×10^6 BTC-MSCs apresentaram, no mesmo dia, valores médios $210 \pm 122,5$ mg/dL, uma redução de 58%. Esta diminuição da glicemia, observada no grupo BTC, pode ser atribuída à produção de insulina por BTC-MSCs, já que não encontramos regeneração das ilhotas pancreática nas análises histológicas dos órgãos dos animais receptores.

Além disso, não foi observada formação de tumor ou proliferação celular, no parênquima renal dos animais transplantados, como encontrado por Fujiwaka e colaboradores nos transplantes de células β diferenciadas a partir de células-tronco embrionárias (FUJIWAKA et al., 2005). Diferentemente, em nosso trabalho, utilizamos células-tronco adultas, que tem menor potencialidade para a formação de tumores, associadas a um sistema de expressão gênica não viral, para obter a expressão de BTC de um modo seguro.

Nossos resultados estão em conflito com relatos de uma pesquisa anterior, onde Li e colaboradores (LI et al., 2008) não encontraram diferenciação em MSCs pela expressão de BTC isolada. Neste trabalho, para obter diferenciação morfológica e produção de insulina, os autores realizaram também a co-expressão do fator de transcrição PDX1. Essa diferença entre nossos resultados pode ser atribuída à plasticidade das células MSCs utilizadas. Diferentemente de Li, nossas culturas de longo termo de células de medula óssea, obedeceram os critérios requeridos pela *International Society of Cellular Therapy* (HORWITZ et al., 2005), comprovando assim a real identidade de células-tronco mesenquimais destas. Acreditamos que podem existir sub-tipos de MSCs com menor plasticidade que também podem ser obtidas da medula. Entretanto, em concordância com nossos resultados Hisanaga e colegas (HISANAGA et al., 2008) publicaram um artigo demonstrando que BTC adicionada ao meio de cultivo de MSCs, promoveu a diferenciação destas em células produtoras de insulina. No presente trabalho, as células BTC-MSCs foram capazes de produzir insulina *in vitro* e *in vivo* e diminuíram a hiperglicemia induzida por Streptozotocina. Este efeito foi enfatizado pela menor perda de peso, observada nos animais que receberam BTC-MSCs. Refletindo uma melhora na condição física geral destes animais.

No que se refere à produção de insulina, acreditamos que estratégias que combinem a superexpressão de BTC associada à nicotinamida e outros fatores solúveis, que possam mimetizar o microambiente pancreático, poderiam proporcionar uma maior produção do hormônio. Assim como Kobayachi e colegas (KOBAYACHI et al., 2009), acreditamos que, para que se possa desenvolver células β funcionais *in vitro*, deve ser necessária a reprodução da estrutura de tecido das ilhotas pancreáticas. Neste sentido, as estruturas tridimensionais formadas espontaneamente por BTC-MSCs podem representar o início de uma reorganização tecidual, que poderá aumentar a comunicação célula-célula, necessária para uma maior produção de insulina. Além disso, as estruturas tridimensionais poderiam também contribuir para uma melhor organização do citoesqueleto e outras propriedades que poderiam resultar até mesmo na gênese de novas ilhotas pancreáticas.

A estratégia de geração *in vitro* de células produtoras de insulina para terapia celular do diabetes parece estar se tornando uma realidade. Entretanto uma questão

ainda precisa ser discutida. O DM1 é uma doença auto-imune e como tal, é caracterizado pela ação do sistema imune do próprio paciente contra suas células β autólogas. Assim, a tolerância do sistema imune, desses pacientes, às células produtoras de insulina, produzidas *in vitro*, também deverá ser comprometida. É como se no processo de diferenciação *in vitro*, a célula, ao assumir alguns componentes de células β , assumisse também alguns alvos antigênicos desencadeadores da auto-imunidade (EFRAT, 2005). Nesse sentido, o transplante isolado de células produtoras de insulina não seria eficaz para estes pacientes. Assim, uma associação com terapia imunossupressora (VOLTARELLI et al., 2007) poderia ser a melhor alternativa para o tratamento do DM1 com células produzidas *in vitro*.

Acreditamos que a maior contribuição deste trabalho é a formulação de mais um protocolo para a diferenciação de células-tronco adultas, em células produtoras de insulina. O somatório dos conhecimentos obtidos a partir dos diferentes protocolos já estabelecidos, no futuro, poderá servir para o desenvolvimento de uma metodologia mais eficaz para a produção de insulina a partir de células-tronco adultas. Assim, abre-se uma perspectiva de terapia celular para reposição de células β , a partir de células autólogas de pacientes diabéticos, eliminando o principal problema enfrentado nas alternativas terapêuticas disponíveis no momento, que é a escassez de doadores.

6- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que:

1. Foi construído um vetor plasmidial funcional contendo o cDNA de Betacelulina.
2. Foi possível isolar e caracterizar uma cultura celular de longo termo de células-tronco mesenquimais de ratos, de acordo com as normas de *International Society of Cellular Therapy*.
3. A superexpressão de Betacelulina em células-tronco mesenquimais induziu diferenciação destas em células produtoras de insulina. A diferenciação pôde ser comprovada por análise morfológica, imunocitoquímica, radioimunoensaio para insulina e RT-PCR para genes marcadores pancreáticos.
4. O transplante de células-tronco mesenquimais superexpressando betacelulina para modelo animal de diabetes provocou uma melhora nos níveis sanguíneos de glicose e menor perda de peso nos animais transplantados.
5. O transplante de células mesenquimais superexpressando betacelulina para ratos com diabetes induzida por Streptozotocina parece ser uma metodologia segura, sendo que não foi evidenciado qualquer indício de formação de tumor ou proliferação celular aumentada no parênquima do rim.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITA, C.A.M. Clonagem e caracterização de genes regulados por glicose em ilhotas pancreáticas humanas. **USP, São Paulo**, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-12062003-151325/>> Acesso em: julho/2009.

American Diabetes Association. Position Statement. Pancreas Transplantation for Patients with Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**. v. 25, n. 1, p. 111, 2002.

ASSADY, S.; MAOR, M.; AMIT, M.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SKORECKI, K.L.; TZUKERMAN, N. Insulin production by human embryonic stem cells. **Diabetes**. v. 50, n. 8, p. 1691-1697, 2001.

ATKINSON, M.A.; MACLAREN, N.K. The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**. v. 331, p. 1428-1436, 1994.

BONNER-WEIR, S.; TANEJA, M.; WEIR, G.C.; TATARKIEWICZ, K.; SONG, K.H.; SHARNA, A.; O'NEIL, J.J. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 97, p. 7999–8004, 2000.

BROLÉN, G.K.; HEINS, N.; EDSBAGGE, J.; SEMB, H. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2867-74, 2005.

CHEN, S.; DING, J.; YU, C.; YANG, B.; WOOD, D.R.; GRAYBURN, P.A. Reversal of streptozotocin-induced diabetes in rats by gene therapy with betacellulin and pancreatic duodenal homeobox-1. **Gene Ther.** v. 14, n. 14, p.1102-1110, 2007.

CHO, Y.M.; LIM, J.M.; YOO, D.H.; KIM, J.H.; CHENG, S.S.; PARK, S.G.; KIM, T.H.; OH, S.K.; CHOI, Y.M.; MOON, S.Y.; PARK, K.S.; LEE, H.K. Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic β -cell differentiation in human embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 366, p.129-134, 2008.

COURI, C.E.; OLIVEIRA, M.C.; STRACIERI, A.B., MORAES, D.A., PIERONI, F.; BARROS, G.M.; MADEIRA, M.I.; MALMEGRIM, K.C.; FOSS-FREITAS, M.C.; SIMÕES, B.P.; MARTINEZ, E.Z.; FOSS, M.C.; BURT, R.K.; VOLTARELLI, J.C. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes. **JAMA.** v. 301, p. 1573-1579, 2009.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci.** v. 119, p. 2204-2213, 2006.

DAHLHOFF, M.; DAMES, P.M.; LEECHNER, A.; HERBACH, N.; VAN BURCK, L.; WANKE, R.; WOLF, E.; SCHNEIDER, M.R. Betacellulin overexpression in transgenic mice improves glucose tolerance and enhances insulin secretion by isolated islets in vitro. **Mol. Cell. Endocrinol.** v. 299, p. 188-193; 2009.

DETEMERCO, C.; BEATTIE, G.M.; DIB, S.A.; LOPEZ, A.D.; HAYEK, A. A role for activin and betacellulin in human fetal pancreatic cell differentiation and growth. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 85, p. 3892-3897, 2000.

DOCHERTY, K. Growth and development of the islets of Langerhans: implications for the treatment of diabetes mellitus. **Curr Opin Pharmacol.** v.1, p. 641-650, 2001.

DOR, Y.; BROWN, J.; MARTINEZ, O.I.; MELTON, D.A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem cell differentiation. **Nature.** v.429, p. 41-46, 2004.

DUNBAR, A.J.; GODDARD, C. Structure-function and biological role of betacellulin. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 32, p. 805-815, 2000.

EFRAT, S. Beta-cell replacement for insulin-dependent diabetes mellitus. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 14, n. 60, p.114-123, 2008.

EFRAT, S. Insulin-producing cells form tissue stem/progenitor cells: autologous cells preferable to allogeneic? **Rev Diabet Stud.**v.2, p.6-8, 2005.

FUJIWAKA, T.; OH, S.H.; PI, L.E.; HATCH, H.M.; SHUOPE, T.; PETERSEN, B.E. Teratoma formation leads to failure of treatment for type 1 diabetes using embryonic stem cell-derived insulin producing cells. **Am. J. Pathol.** v. 166, p. 781-791, 2005.

GERSHENGORN, M.C.; HARDIKAR, A.A.; WEI, C.; GERAS-RAAKA, E.; MARCUS-SAMUELS, B.; RAAKA, B.M. Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. **Science.** v. 306, p. 2261-2264, 2004.

HASEGAWA, Y.; OGIHARA, T.; YAMADA, T.; ISHIGAKI, Y.; IMAI, J.; UNO, K.; GAO, J.; KANEKO, K.; ISHIHARA, H.; SASANO, H.; NAKAUCHI, H.; OKA, Y.; KATAGIRI, H. Bone marrow (BM) transplantation promotes beta-cell regeneration after acute injury through BM cell mobilization. **Endocrinol.** v. 148, n. 5, p. 2006-2015, 2007.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. The biology and medicine of rabbits and rodents, 4th ed. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1995.

HICKMAN, I.J.; MacDONALD, G.A. Impact of diabetes on the severity of liver disease. **Am J Med.** v. 120, p. 829-834, 2007.

HISANAGA, E.; PARK, K.I.; YAMADA, S.; HASHIMOTO, H.; TAKEUCHI, T., MORI, M.; SENO, M.; UMEZAWA, K.; TAKEI, I.; KOJIMA, I. A simple method to induce differentiation of murine bone marrow mesenchymal stem cells to insulin-producing Conophylline and betacellulin-delta4. **Endrocr J.** v. 55, p. 535-543, 2008.

HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTHEBACH, I.; MARINI, F.C.; DEANS, R.J.; KRAUSE, D.S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.** v. 7, p. 393-395, 2005.

HUOTARI, M.A.; PALGI, J.; OTONKOSKI, T. Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen. **Endocrinology.** v. 139, p. 1994-1999, 1998.

IANUS, A.; HOLZ, G.G.; THEISE, N.D.; HUSSAIN, M.A. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. **J Clin Invest.** v. 111, n. 6, p. 43-50, 2003.

JONES, P.M.; COURTNEY, M.L.; BURNS, C.J.; PERSAUD, S.J. Cell based treatments for diabetes. **Drug Discov Today**. v. 13, p. 888-893, 2008.

KARNIELI, O.; IZHAR-PRATO, Y.; BULVIK, S.; EFRAT, S. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. **Stem Cells**. v. 25, p;2837-2844, 2007.

KNIP, M.; AKERBLON, H.K. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 7, p. 93-100, 1999.

KOBAYASHI, N.; YUASA, T.; OKITSU, T. Regenerative medicine for diabetes mellitus. **Cell Transplant**. v. 18, p. 491-962, 2009.

LESTER, L.B.; KUO, H.C.; ANDREWS, L.; NAUERT, B.; WOLF, D.P. Directed differentiation of rhesus monkey ES cells into pancreatic cell phenotypes. **Reprod Biol Endocrinol**. v.16, n. 2, p. 42, 2004.

LI, L.; FURONG, L., QI, H.; FENG, G.; YUAN, K.; DENG, H.; ZHOU, H. Coexpression of Pdx1 and betacellulin in mesenchymal stem cells could promote the differentiation of nestin-positive epithelium-like progenitors and pancreatic islet-like spheroids. **Stem Cells Dev**. v. 17, p. 815-823, 2008.

LI, L.; SENO, M.; YAMADA, H.; KOJIMA, I. Betacellulin improves glucose metabolism by promoting conversion of intraislet precursor β -cells in streptozotocin-treated mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 285, p.577-583, 2003.

LUMELSKY, N.; BLONDEL, O.; LAENG, P.; VELASCO, I.; RAVIN, R.; MCKAY, R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. **Science**. v. 292, p.1389-1394, 2001.

LUMELSKY, N.; BLONDEL, O.; LAENG, P.; VELASCO, I.; RAVIN, R.; MCKAY, R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. **Science**. v. 292, p. 1389-1394, 2001.

LYONS, P.A; ARMITAGE, N.; LORD C.J.; PHILLIPS, M.S.; TODD, J.A.; PETERSON, L.B.; WICKER, L.S. Mapping by genetic interaction: high-resolution congenic mapping of the type 1 diabetes loci Idd10 and Idd18 in the NOD mouse. **Diabetes**, v.50, p. 2633-2637, 2001.

MASHIMA, H.; OHNISHI, H.; WAKABAYASHI, K., MINE, T.; MIYGAWA, J.; HANAFUSA, T.; SENO, M.; YAMADA, H.; KOJIMA, I. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. **J Clin Invest**. v. 97, p. 1647-1654, 1996.

MEIRELLES, L.S.; NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion and characterization. **Br J Haematol.** v. 123, p. 702-711, 2003.

MERANI, S.; SHAPIRO, A.M.J. Current status of pancreatic islet transplantation. **Clinical Science.** v. 110, p. 611-625, 2006.

MICALLEF, S.J.; LI, X.; JANES, M.E.; JACKSON, S.A.; SUTHERLAND, R.M.; LEW, A.M.; HARRISON, L.C.; ELEFANTY, A.G.; STANLEY, E.G.. Endocrine cells develop within pancreatic bud-like structures derived from mouse ES cells differentiated in response to BMP4 and retinoic acid. **Stem Cell Res.** v. 1, n. 1, p. 25-36, 2007.

MIETTINEN, M.; ORMIO, P.; HAKONEN, E.; BANERJEE, M.; OTONKOSKI, T. EGF receptor in pancreatic β -cell mass regulation. **Biochem Soc Trans.** v. 36, p. 280-285, 2008.

OTONKOSKI, T.; BEATTIE, G.M.; MALLY, M.I.; RICORDI, C.; HAYEK, A. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. **J Clin Invest.** v. 92, p.1459-1466, 1993.

PAIVA, D.C.P; BERSUSA, A.A.S.; ESCUDER, M.M.L. Avaliação da assistência ao paciente e/ou hipertensão pelo programa Saúde da Família do Município de Francisco Morato, São Paulo, Brasil. **Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro.** v. 22, n. 2, p. 377-385, 2006.

PARNAUD, G.; BOSCO, D.; BERNEY, T.; PATTOU, F.; KERR-CONTE, J.; DONATH, M.Y.; BRUN, C.; MANDRUP-POULSEN, T.; BILLESTRUP, N.; HALBAN, P.A. Proliferation of sorted human and rat beta cells. **Diabetologia.** v.51, p. 91-100, 2008.

PAZ, A.H.; AYALA, A.; TERRACIANO, P.B.; MEURER, L. PASSOS, E.P., CIRNE-LIMA, E. In vitro differentiation of embryonic stem cells into cardiac-like and neuronal-like cells. **Revista HCPA.** v. 28, n. 2, p. 96-100, 2008.

PHINNEY, D.G. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem Suppl.** v. 38, p. 7-12, 2002.

PHINNEY, D.G.; KOPEN, G.; ISAACSON, R.L.; PROCKOP, D.J. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth and differentiation. **J Cell Biochem.** v. 15, n. 72, p. 570-585, 1999.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science.** v. 284, p.143-47, 1999.

PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science.** v. 4, n. 276, p. 71-74, 1997.

RAJAGOPAL, J.; ANDERSON, W.J.; KUME, S.; MARTINEZ, O.I.; MELTON, D.A. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. **Science**. v.17, n. 299, p. 363, 2003.

RUDNICK, A.; LING, T.Y.; ODAGIRI, H.; RUTTER, W.J.; GERMAN, M.S. Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 91, p.12203-12207, 1994.

RYAN, E.A.; LAKEY, J.R.; SHAPIRO, A.M. Clinical results after islet transplantation. **J Investig Med**. v. 49, n. 6, p. 559-562, 2001.

SAHIN, U.; WESKAMP, G.; KELLY, K.; ZHOU, H.M.; HIGASHIYAMA, S.; PESCHON, J.; HARTMANN, D.; SAFTIG, P.; BLOBEL, C.P. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. **J Cell Biol**. v. 164, p. 769-779, 2004.

SEGEV, H.; FISHMAN, B.; ZISKIND, A.; SHULMAN, M.; ISTOVITZ-ELDOR, J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. **Stem Cells**. v. 22, n. 3, p. 265-274, 2004.

SHAPIRO, A.M.; RICORDI, C.; HERING, B. Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. **Lancet**. v. 11, n. 362, p. 1242, 2003.

SHIM, J.H.; KIM, S.E.; WOO, D.H.; KIM, S.K.; OH, C.H.; MCKAY, R.; KIM, J.H. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell
SHING, Y.; CHRISTOFORI, G.; HANAHAN, D.; ONO, Y.; SASADA, R.; IGARASHI, K.; FOLKMAN, J. Betacellulin: a mitogen form pancreatic beta cell tumors. **Science**. v. 259, p. 1604-1607, 1993.

SKELLY, A.H. Type 2 diabetes mellitus. **Nursing Clinics of North America**. v. 41, p. 531-547, 2006.

SPELLMAN, C.W. Aggressively managing type 2 diabetes mellitus, hyperlipidemia, and bone loss. **J. Am Osteopath Assoc**. v. 5, n. 3, p. 20-27, 2008.

SUGIYAMA, K.; YONEMURA, H.; OKAMOTO, H. Effects of poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor on B-cells of a canine páncreas alter massive pancreatectomy. **Int J Pancreatol**. V. 8, p. 85-95, 1991.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 26, p.S5-S20, 2003.

TRUCCO, M. Regenation of pancreatic β cell. **J Clin Invest**. v. 115, p. 5-12, 2005.

TRUCCO, M.; CASU, A.; BOTTINO, R. The pig as the donor of pancreatic islets for men. **Vet Res Commun**, v. 31, p. 27-33, 2007.

VAN DER LAAN, L.J.; LOCKEY, C.; GRIFFETH, B.C.; FRASIER, F.S.; WILSON, C.A.; ONIONS, D.E.; HERING, B.J.; LONG, Z.; OTTO, E.; TORBETT, B.E.; SALOMON, D.R. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. **Nature**, v.7, n. 407, p.90-94. 2000.

Van Der WINDT, D.J.; BOTTINO, R.; CASU, A.; CAMPANILE, N.; COOPER, D.K. Rapid loss of intraportally transplanted islets: an overview of pathophysiology and preventive strategies. **Xenotransplantation**, v. 14, n. 4, p. 288-297, 2007.

VOLTARELLI, J.C.; COURI, C.E.; STRACIERI, A.B.; OLIVEIRA, M.C.; MORAES, D.A.; PIERONI, F.; COUTINHO, M.; MALMEGRIM, K.C.; FOSS-FREITAS, M.C.; SIMÕES, B.P.; FOSS, M.C.; SQUIERS, E.; BURT, R.K. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cells transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 297, p. 1568-1576, 2007.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H.G. Prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047-1053, 2004.

WILLDING, J.P.H. The importance of free fatty acids in the development of type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 24, p. 934-945, 2007.

WISEMAN, C.A. Simultaneous Pancreas Kidney Transplantation: A Critical Appraisal of the Risks and Benefits Compared With Other Treatments Alternatives. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 16, n. 4, p. 278-287, 2009.

World Health Organization. Definition and diagnosis of classification of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF consultation, 2006.

SITES CONSULTADOS:

Collaborative Islet Transplantation Registry- (<http://www.citregistry.org>)

Diabetes Research and Wellness Foundation - (www.springpointproject.org)

Ministério da Saúde do Brasil- (www.saude.gov.br)

USA National Institutes of Health - (www.nih.gov)

8- ANEXO – Artigo Científico publicado na revista *Stem Cells and Development*

Title: Betacellulin overexpression in mesenchymal stem cells induces insulin secretion in vitro and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats

Authors: Ana H Paz^{1,5}, Gabrielle Dias Salton², Ana Ayala¹, Cristiano Gomes¹, Paula Terraciano¹, Rosana Scalco³, Claudia Cilene Fernandes Correia Laurino², Eduardo Pandolfi Passos¹, Marlon R. Schneider⁴, Luise Meurer^{3,5} and Elizabeth Cirne-Lima¹.

¹Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisas UFRGS- HCPA, Porto Alegre 90035-903 RS-Brazil

² Laboratório de Biologia Molecular e Doenças auto-imunes, Centro de Pesquisas UFRGS- HCPA, Porto Alegre 90035-903 RS -Brazil

³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 90035-903 RS- Brazil

⁴ Institute of Molecular Animal Breeding and Biotechnology, Gene Center, LMU Munich 81377 Germany

⁵ Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia- Faculdade de Medicina- UFRGS Porto Alegre 90035-003 RS –Brazil

⁶ Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Faculdade de Veterinária

Suggested running title: Betacellulin in MSCs ameliorates diabetes in rats

Address correspondence to: Elizabeth Cirne Lima

Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular- Centro de Pesquisas HCPA-

Ramiro Barcelos 2350 Porto Alegre 90035-903 RS-Brazil

Tel: + 55 51 3359 8989

Fax + 55 51 3359 8761

Email: elizabethcirnelima@gmail.com

Abstract:

Betacellulin (BTC), a ligand of the epidermal growth factor receptor, has been shown to promote growth and differentiation of pancreatic beta-cells and to improve glucose metabolism in experimental diabetic rodent models. Mesenchymal stem cells (MSCs) have already been proved to be multipotent. Recent work has attributed to rat and human MSCs the potential to differentiate into insulin secreting cells. Our goal was to transfect rat MSC with a plasmid containing betacellulin cDNA in order to guide MSC differentiation into insulin producing cells. Prior to induce cell MSC transfection, MSCs were characterized by flow cytometry and the ability to in vitro differentiate into mesoderm cell types were evaluated. After rat MSC characterization, these cells were electroporated with a plasmid containing BTC cDNA. Transfected cells were cultivated in H-DMEM with 10mM Nicotinamide. Then, the capability of MSC-BTC to produce insulin in vitro and in vivo was evaluated. In this vein, was possible to demonstrated by radioimmunoassay analysis that 10^4 MSC-BTC cells produced up to 0,4ng/mL of insulin, in contrast, MSCs transfected with the empty vector (negative control) produced no detectable insulin levels. Moreover, MSC-BTC were positive for insulin in immunohistochemistry assay. In parallel, the expression of pancreatic marker genes was demonstrated by molecular analysis of MSC-BTC. Furthermore, when MSC-BTC were transplanted to streptozotocin diabetic rats BTC transfected cells ameliorates hyperglycemia from over 500 to about 200mg/dl 35 days post cell transplantation. In this way, our results clear cut demonstrate that BTC overabundance enhances glucose-induced insulin secretion in mesenchymal stem cells *in vitro* as well as *in vivo*.

Key words: Mesenchymal stem cells, betacellulin, diabetes, in vitro differentiation

Introduction

Despite a wide variety of pharmacological treatments for type 1 diabetes including insulin therapy, adequate control of blood sugar levels is often difficult, in part because pharmacological agents are not able to duplicate the glucose regulatory function of normal islets (1). At the moment, transplantation of cadaveric pancreatic islets is the most preferred cell replacement available to treat type 1 diabetes (2). However, the scarcity of transplantable human islets poses a major obstacle in the widespread use of this therapy (2). This scenario has evoked a large scale search for alternative sources of β -cells. Although embryonic stem (ES) cells may differentiate into nearly all cell types and be used to assemble functional organs, the source of ES cells presents ethical and legal concerns, and the tumorigenic tendency of ES cells is at the moment not under control (3). Other cell types like intestinal (4), hepatic (5-7), ductal or pancreatic stem cells (8-10) have been studied as candidates to replace β -cells. However, scarcity of the source and the invasive procedures required to isolate and culture these cells have limited their use.

Bone marrow derived stem cells (hematopoietic and mesenchymal) carry significant potential for clinical applications, because they are easily accessible for an autograft and routinely collected from adults without ethical concern inherent to fetal embryonic tissues (11).

Mesenchymal stem cells (MSCs) can be isolated from bone marrow based on their ability to adhere to plastic substrates (12). Under appropriate conditions, they differentiate into multiple mesenchymal cell types including cartilage, bone, adipose and fibrous tissues and myelosupportive stroma (13). Recent work has attributed to MSCs the potential to differentiate into cells of all three primary germ layers, including mesoderm, neuroectoderm and endoderm; they are also reported to be immunoprivileged and immunosuppressive (11). Rat (14) and human MSCs (15), have been shown to differentiate into insulin secreting cells.

Davani and colleagues (16) have shown that human islet-derived precursor cells (hIPCs) are capable of differentiating to adipocyte, chondrocyte and osteocyte, hIPCs also express MSCs markers indicating that these cells could be mesenchymal stem cells that are present in adult islets in situ.

Betacellulin (BTC) is a multifunctional polypeptide growth factor belonging to the family of epidermal growth factor receptor (EGFR) ligands (17). BTC was firstly described as a mitogen from a mouse pancreatic insulinoma cell line (18). BTC is initially produced as transmembrane protein that can be cleaved by metalloproteinase to release the mature circulating form (19). Regarding the tissue distribution, BTC is expressed abundantly in the pancreas and intestine (20). There are several evidences indicating that, among the seven EGFR ligands, BTC exerts unique actions in pancreatic islet physiology.

BTC converts pancreatic progenitors to insulin secreting cells *in vitro* (21-23), sustains PDX1 expression and induces β -cell differentiation in human ES cells (24).

In addition, the administration of this growth factor *in vivo* improves glucose metabolism by increasing the β -cell mass in diabetic animal models (22, 25). These results suggest that BTC plays an important role in regulating growth and differentiation of pancreatic endocrine precursor cells.

Considering the plasticity of mesenchymal stem cells and the action of betacellulin in differentiation and proliferation of β -pancreatic cells, our aim was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effects of betacellulin overexpression in rat MSCs.

Material and Methods:

Transgene construction

The BTC-coding sequence was amplified from mouse lung cDNA by PCR using the primers: BTC 5'-GGC CCA GGA AGG GCA TAG AGA-3' and BTC 5'-ATG AGT CAG GTC TTT TGT AGC TTG-3' (26). The product was inserted into the pCRII-TOPO cloning vector (Invitrogen, CA, USA), after sequencing, cDNA was cloned into EcoRI site downstream of the cytomegalovirus promoter and upstream to the internal ribosome entry site (IRES) and the enhanced green fluorescent protein (EGFP) in the expression vector pIRES2-EGFP (Clontech, CA, USA). Correct orientation was checked by digestion with KpnI and SmaI. The constructed vector was named pIRES2-BTC-EGFP.

Isolation and culture of bone marrow cells

Eight-week-old Wistar rats were purchased from the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório- CREAL/UFRGS. The procedures were performed in accordance with the guidelines for animal experimentation of UFRGS University. Bone marrow cells were obtained from femurs and tibias. After isolation, 1×10^7 bone marrow derived cells were cultured (37°C , 5% CO_2) in T25 culture flasks (TPP, Schaffhausen, Switzerland) with D-MEM (Invitrogen, CA, USA) medium containing 15 mM HEPES, 15% inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, CA, USA), 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin antibiotic solution (Gibco, NM, USA). On the third day of culture medium was changed and non-adherent cells were removed. Adherent cells gaining 80% of confluence were passaged with the use of 0,05% trypsin-EDTA solution (Gibco, NM, USA) and then maintained in D-MEM with 10% FBS (complete medium).

Differentiation assays

In order to characterize MSCs in accordance with The International Society for Cellular Therapy Statement (27), two different experimental procedures were employed. Osteogenic differentiation was induced by culturing MSCs for up to 3 weeks in D-MEM 10% FBS, 15 mM HEPES, supplemented with 10^{-8} M/l dexamethasone (Sigma, MO, USA), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid 2-phosphate (Sigma, MO, USA) and 10 mM/l β -glycerolphosphate (Sigma MO, USA). To observe calcium deposition cultures were stained with Alizarin Red S stain (Nuclear, SP, Brazil).

Secondly, to induce adipogenic differentiation MSCs were cultured with 10^{-8} mol/l dexamethasone (Sigma, MO, USA), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Indomethacin (Sigma, MO, USA). Adipocytes were easily discerned from the undifferentiated cells by phase-contrast microscopy. To further confirm their identity, cells were fixed with 4% paraformaldehyde with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with Oil Red (Sigma, MO, USA) on day 21 of adipogenic differentiation.

Flow Cytometry

Approximately 1×10^6 MSCs were prepared. They were placed in sterile tubes and washed 2 times by centrifugation at $300 \times g$ for 5 minutes at 4°C . MSCs were then resuspended in PBS and incubated for 20 minutes at 4°C with phycoerythrin (PE) or fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated antibodies against rat CD34, CD45, CD11bc, CD44, CD90 and CD29. All assays were conducted using antibodies concentrations as recommended by the manufactures. Phycoerythrin-PE and FITC mouse anti-rat IgG1, IgG2a and IgM were used as isotype controls. Cells were collected and washed with PBS by centrifugation and fluorescence analysis was carried out with the BD FACS-Calibur flow cytometry system (Becton-Dickinson, NJ, USA) with a one-laser system that is capable to detect three fluorochromes excited by the 488nm laser in a multiparameter manner. Data samples were analyzed using Cellquest and PAINT-A-GATE software.

Cell Transfection

MSCs were harvested by trypsinization and then pelleted via centrifugation. Excess media was removed to obtain a tight cell pellet, which was resuspended in 4°C D-MEM without serum or antibiotics. Cells were quantified in Neubauer's chamber and 1×10^6 cells in pure D-MEM were transferred to a 4 mm cuvette with $60 \mu\text{g}$ of pIRES2-BTC-EGFP or pIRES2-EGFP (empty vector used as negative control) were added to the cell suspension. After an incubation time of 5 minutes at room temperature cells were electroporated using Gene Pulser XCell (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) applying the following parameters: $950 \mu\text{F}$, $200 \Omega\text{m}$ and 350V . After electroporation, cells were incubated for 5 minutes at room temperature and plated in H-DMEM complete medium supplemented with 10 mM nicotinamide (Acros, NJ, USA). Twenty-four hours after electroporation, medium was replaced and cells were analyzed under fluorescence microscopy. After 48 hours cells were submitted to the selection media using G418 (Geneticin, Gibco NM, USA).

Immunocytochemistry assay

For BTC immunofluorescence, pIRES2-BTC-EGFP transfected cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS. The primary antibody, goat anti-mouse betacellulin, (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) was diluted 1:100

and incubated overnight at 4°C. A Cy3-conjugated rabbit anti-goat secondary antibody (Sigma, MO, USA) was used. Detection of fluorescence was analyzed using fluorescence microscopy (Nikon Eclipse TE 2000-U, Nikon Instruments Inc.).

For insulin immunocytochemistry assay pIRES2-BTC and pIRES-EGFP transfected cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS. We used a 1:500 dilution of guinea pig anti-insulin, (Dako, CA, USA) and Universal Dako LSAB Kit Peroxidase (Dako, CA, USA). Cells were analyzed under microscopy (Nikon Eclipse TE 2000-U, Nikon Instruments Inc). The same antibody was used for immunohistochemistry of the grafts.

Insulin Radioimmunoassay (RIA)

The static incubation method was applied as described by Lumelski (28).

Briefly, 10⁵ adherent cells at 4, 8, 12 and 16 days post transfection were rinsed twice with Krebs-Ringer with bicarbonate buffer (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 0.1% bovine serum albumin). An inhibitor of insulin secretion (Nifedipine, Sigma, MO, USA) was added to the medium 30 minutes prior to the medium replacement with Krebs-Ringer containing 2.7 mM glucose. Cells were incubated for 15 minutes at 37°C with Krebs-Ringer and then in buffer containing 5, 30 or 50 mM glucose for 1 hour.

Insulin levels in cell supernatants were measured using an immunoradiometric assay kit (RIA 13k, Linco Research, MO, USA). To each polypropylene tube anti-insulin, ¹²⁵I-Insulin and 100 µl of the samples were added. Immune complexes were precipitated 24 hours later with polyethylene glycol solution, and a gamma counter was used to determine the radioactivity in the precipitates. Four determinations were carried out in duplicate and the means and standard error were obtained.

RNA extraction and RT-PCR

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to assess the expression of pancreatic β-cells related genes (PDX1, PAX4, INS1, NKX6.1).

Total RNA was isolated from non transfected MSCs, MSCs 14 days after transfection with pIRES2-EGFP-BTC or pIRES2-EGFP and RINm5f cell line (used as a positive control for pancreatic genes expression). Total RNA was isolated using the SS III First Strand super mix (Invitrogen, NM, USA).

Standard RT was performed using M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Reactions mixtures for PCR included 1 μ g of cDNA, 0.2 μ M of each antisense and sense primer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, NM, USA). PCR was performed on a thermocycler "Techne TC412" (Barloworld Scientific, NJ, USA). Amplification conditions consisted of an initial denaturation step at 94°C for 1 min followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing for 1 min, extension of 72°C for 30s, and final polymerization at 72°C for 10 min. β -tubulin was used as an internal standard.

Diabetes animal model

Male Wistar rats housed at 22°C in an air-conditioned environment, with a 12h light-dark cycle, and fed a regular unrestricted diet, received a single intraperitoneal injection of 70mg/kg streptozotocin (Sigma, MO, USA) freshly dissolved in 0.1M citrate buffer (pH 4.5).

Blood glucose was measured weekly with a glucometer (Optium Xceed, Abbott, CA, USA). Animals whose blood glucose level exceeded 300 mg/dl were considered diabetic.

Cell Transplantation

Under anesthesia a medial abdominal laparotomy was performed and the left kidney was exposed. 4×10^6 cells in 50 μ l of PBS were transplanted into the kidney parenchyma by direct insertion of a 24 gauge syringe into the kidney capsule at the upper pole and cells were gently discharged into the parenchyma. Blood glucose levels were monitored once a week (days 14, 21, 28 and 35) in samples obtained from the tail vein using a glucometer.

At the end of the experiment (day 35), rats were euthanatized and kidneys and pancreas removed for hematoxylin and eosin staining for histological analysis.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SE and statistical differences between groups were determined by Repetitive Measure ANOVA in SPSS version 16. Bonferroni post-hoc test was applied when necessary. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Phenotypic characteristics of expanded undifferentiated MSCs

Bone marrow mesenchymal stem cells were obtained from rats by plating bone marrow cell suspension in tissue culture dishes and propagation of adherent cells. The isolated cells developed to visible systematic colonies of adherent fibroblast-like cells at about 7-10 days after initial plating, and became morphologically more homogeneous (Figs.1a and 1b) with time in culture by the depletion of hematopoietic and other bone marrow stromal cells. Rat MSCs are known to be positive for CD44, CD90 and CD29 and negative for CD34, CD45 and CD11bc. Cell flow cytometry was performed from the moment of MSCs extraction to the third trypsinization step. By the third passage the vast majority of cells stained for the markers CD44 (99.3%), CD90 (99.8%), CD29 (99.5%) and only a small proportion manifested expression of the markers CD45 (0.9%), CD11b/c (0.52% and CD34 (0.05). According to this pattern of cell surface marker expression, the cell population at this time point (approximately 24 days in culture) was quite uniform and can be considered *bona fide* MSCs.

The MSC differentiation potency was shown using protocols know to induce differentiation into bone and adipose cells. The results showed a clear potency for adipogenic differentiation as detected by Oil red staining, and for osteogenic differentiation as detected by deposit of calcium (Figs. 1c and 1d respectively).

BTC expression in vitro modified the morphology and gene expression pattern in MSCs

After characterization, MSCs within 12 passages were transfected by electroporation with the expression vector pIRES2-BTC-EGFP or the empty vector. The vector included neomycin-resistance gene and an internal ribosome entry site (IRES) sequence of the encephalomyocarditis virus in the multiple cloning site permitting both BTC and EGFP cDNAs to be translated from a bicistronic mRNA.

The efficiency of transfection with this vector as evaluated by the number of GFP-positive cells was approximately 40%. Following selection, the surviving cells (termed BTC-MSCs or pIRES-MSCs, depending on the vector employed) were analyzed.

BTC-MSCs showed GFP expression and immunofluorescence for BTC (Fig. 2). No expression of BTC was detected in MSCs and pIRES-MSCs (data not shown).

Under inverted microscope it was possible to observe within 10 days that the morphology of BTC-MSCs cells changed from spindle-like (Fig. 3B) to flat epithelial-like cells (Fig. 3A).

To assess the mRNA expression of typical β -cell genes (PDX1, PAX4, INS1 and NKX6.1), RT-PCR was applied on RINm5f insulinoma cells (used as positive control for pancreatic gene expression), MSCs (negative control), pIRES-MSCs and BTC-MSCs. Transcripts of PDX1, PAX4, INS1 and NKX6.1 were detected 14 days after transfection in MSC-BTC but not in MSCs or MSC-pIRES as expected. (Fig. 4).

The results strongly suggest that the overexpression of BTC may induce the expression of multiple islet-genes involved in the β -cell differentiation pathway.

After 23 days of culture, different from pIRES-MSCs some BTC-MSCs presented aggregating tendency and formed a 3-D structure (Figs. 5a and 5b) similar to the structures described by other authors during specific differentiation protocols (29, 30, 31).

MSC-BTC cells develop insulin expression and secretion

To evaluate the functional differentiation of MSC-BTC, they were tested for insulin content and glucose-induced insulin secretion in vitro.

Immunocytochemistry demonstrated positive staining for insulin (data not shown) in BTC-MSCs cells with the epithelial-like morphology after 12 days of culture. As expected we could not detect positive stain for insulin in pIRES-MSCs.

To assess the cell ability to produce and secrete insulin, RIA was used to measure the insulin secretion from BTC-MSCs and pIRES-MSCs at different time points: 4, 8, 12 and 16 days after transfection.

In vitro insulin secretion from BTC-MSCs was modulated by glucose, and was firstly detected on day 8 and continued until day 16 post transfection (Fig. 6). In contrast, in pIRES-MSCs insignificant immunoreactive insulin could be detected in all time points ($p=0.01$).

Transplantation of BTC-MSCs reverts hyperglycemia in streptozotocin diabetic rats

Transplantation of BTC-MSCs under the renal capsule of streptozotocin diabetic rats was able to modulate glycaemia in vivo as confirmed by the reduction of blood glucose levels, beginning 14 days post-transplantation from over 500 mg/dl to about 200 mg/dl at 35 days post-transplantation ($p=0.001$) (fig. 7a). In contrast, in STZ-diabetic rats transplanted with control pIRES-MSCs blood glucose levels continued high.

In parallel, STZ-diabetic animals that received BTC-MSCs showed a less severe weight loss (Fig. 7b) when compared to the pIRES-MSC animals ($p=0.01$).

No gross tumor formation was seen in the animals and no tumor-like structures were observed among the grafts by histological analysis (Fig.8). It was possible to observe the presence of insulin positive cells in the renal subcapsular area of BTC-MSC transplanted animals (Fig. 9)

Discussion

Although pharmacological therapy for diabetes has continued to improve, tight glucose control has not eliminated the complications of diabetes. Pancreas or islet transplantation can reconstitute the glucose-

regulatory function of normal islets but are limited by an inadequate donor supply, need for immunosuppression, and loss of function of the transplanted islets (1).

In this regard, sources of pancreatic β -cells other than those from organ donors are needed. In the present study we have devised a strategy to induce the formation of insulin-producing cells by overexpressing of BTC in rat mesenchymal stem cells cultivated with nicotinamide. Previous studies have provided evidences that there are two pathways of pancreatic regeneration: (a) replication of preexisting differentiated exocrine and endocrine cells and (b) proliferation and subsequent differentiation of duct epithelium to form new islets (32). BTC is involved in both pathways, it is known to induce proliferation of insulinoma cells in vitro (33), improve glucose tolerance and enhances insulin secretion (34), reverse streptozotocin-induced hyperglycemia in mice (35) and induce endocrine differentiation of the exocrine cell line AR42J (23). This differentiation potency can be explained because EGFR activation affects cell function on multiple levels, depending on the signaling pathways that are activated (18). Our in vitro results indicate that the overexpression of BTC in rat MSCs may induce the expression of PDX1 as well as other important pancreas transcription factors, and the consequent production of insulin in agreement with Moriscot's conclusions about MSCs (36). We observed, that the morphology of BTC-MSCs cells changed from spindle-like to flat epithelial-like cells. This morphologic differentiation could be related to the findings of Gershengorn (37) and Russ (38) who believes in the theory of epithelial to mesenchymal transition where cell morphology differentiation is related to changes in gene expression from mesenchymal to epithelial patterns (MET) and vice-versa (EMT).

In this way, others have observed similar morphologic differentiation trying to obtain endocrine cells from MSC and attributed to mesenchymal to epithelial transition (14). Nevertheless, epithelial-mesenchymal transition theory is controversial and there are authors (39) who believes that this transition does not take place in cell culture.

The molecular mechanisms underlying the differentiation are not clear and it can only be speculated whether MSCs were induced to activate silent genes, or whether BTC overexpression enhanced the expression of already active genes.

It can be hypothesized that pluripotent stem cells reside in the adult bone marrow in a standby state, and that these cells under certain circumstances may cross tissue (or germ-layer) boundaries to originate cells of a different lineage, challenging the notion of what it is believed, that adult stem cells are committed to the germ-layer where they are derived from (15).

In our work during culture the BTC-MSCs changed their undifferentiated status, start to produce betacellulin, and gain some transient elements that allow them to modify their gene expression profile.

Nicotinamide- a poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor- is also known to increase the indices of β -cells after pancreatectomy (40) and it's a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells (41). Therefore, nicotinamide might play an important role in the endocrine differentiation observed in this study.

RT-PCR data showed the expression of 4 key pancreatic genes in BTC-MSCs (PDX1, NKX6.1, Pax4 and INS1) that are not expressed in MSCs.

The combined expression of PDX1 and NKX6.1 is found in the earliest pancreatic progenitor cells as well as in mature β -cells (42), indicating that BTC-MSCs have achieved expression of at least some typical β -cell genes.

The fundamental role of pancreatic β -cells is to secrete insulin in response to glucose variation. In the present study we demonstrated the secretion of insulin from BTC-MSCs using a radioimmunoassay detection technique. Insulin secretion from BTC-MSCs was regulated by glucose, however it occurred also in response to glucose concentrations above the physiological range. While most of the response of normal islet occurs between 5-10mM glucose, BTC-MSCs secreted most of the insulin in response to 30mM glucose indicating a possible difference between BTC-MSCs and β -cell, regarding the modulation of insulin release. Cell transplantation in vivo resulted in reduction of blood glucose levels, beginning 14 days post-transplantation. The glucose physiological values for rats range between 50-135mg/dl (43). In our work, diabetic animals that received bone marrow MSCs overexpressing betacellulin under the renal capsule, presented on day 35 post-transplant reduced glycaemic values compared to control group. The ameliotation observed in the animals can be attributed to the insulin production of transplanted BTC-MSCs.

In parallel, no gross tumor formation was seen in the animals as found by Fujiwaka and colleagues (3). Differently, in this work we use adult stem cells that have a lower tumorigenic ability associated with a non viral expression system to express BTC in a safer way.

Our findings are in conflict with an early report (14) by Li and co-workers who could not find differentiation by the expression of BTC alone. This can be attributed to the different protocols used and also the plasticity of the MSCs. Our cells presented all the characteristics required from the International Society for Cellular Therapy (27) confirming MSC identity and plasticity. On the other hand, in agreement with our results Hisanaga and colleagues have reported the *in vitro* differentiation of murine MSCs by the addition of betacellulin to the medium (44).

BTC-MSCs were capable to secrete insulin *in vitro*. *In vivo* transplanted BTC-MSCs could ameliorate the glycaemic values of diabetic rats. This concept is supported by the reduced weight loss in BTC-MSCs transplanted animals.

Regarding the insulin production, strategies combining BTC overexpression and other soluble factors that mimic the *in vivo* microenvironment could be adopted to cause the differentiated cells to produce higher levels of insulin. The pancreatic islets in the adult are among the most vascularised of all organs in the body with a unique dense glomerular-like angioarchitecture (45), in this way beta cells are exposed to other cells derived molecules that can affect the physiological regulation of glucose-induced insulin secretion. It was demonstrated that endothelial-derived molecules like endothelin-1, thrombospondin-1 and laminins, among others can improve beta cell function (45, 46, 47). This data show the importance of soluble factors secreted by islet vicinity suggesting that the addition of soluble factors can also interfere in cell differentiation.

In agreement with Kobayachi and co-workers (48) we believe that, to create highly functional pancreatic β -cells such as those existing in the body, it may be necessary to reproduce the tissue structure of the pancreatic islets. Thus, the spontaneously formed 3D structures observed in our study, could be a good start to improve necessary cell-cell communications.

In conclusion, our findings demonstrate the positive effects of betacellulin overexpression in MSCs as a tool for cell therapy able to revert hyperglycaemia in an streptozotocin-induced diabetes animal model. Our results also highlight the therapeutic potential of adult bone marrow stem cells to treat diabetes.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Apoio a Pesquisa (FIPE-HCPA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD).

Author Disclosure Statement

All authors declare no disclosure statement

References

1. Chen S, Ding J, Yu C, Yang B, Wood DR and PA Grayburn. (2007). Reversal of streptozotocin-induced diabetes in rats by gene therapy with betacellulin and pancreatic duodenal homeobox-1. *Gene Ther.*14:1102-1110.
2. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM and RV Rajotte. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343:230-238; 2000.
3. Fujiwaka T, Oh SH, Pi LE, Hatch HM, ShuopeT and BE Petersen. (2005). Teratoma formation leads to failure of treatment for type 1 diabetes using embryonic stem cell-derived insulin producing cells. *Am. J. Pathol.* 166:1781-1791.
4. Kojima H, Nakamura T, Fujita Y, Kishi A, Fujimiya M, Yamada S, Kudo M, Nishio Y, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Kojima I, Seno M, Wong NC, Kikkawa R and A Kashiwagi. (2002). Combined expression of pancreatic duodenal homeobox 1 and islet factor 1 induces immature enterocytes to produce insulin. *Diabetes* 51:1398–1408.
5. Li WC, Horb ME, Tosh D and JM Slack. (2005). In vitro transdifferentiation of hepatoma cells into functional pancreatic cells. *Mech. Dev.* 122:835-847.
6. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen PE and AB Peck. (2002). In vitro transdifferentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:8078–8083.
7. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einay Y, Goldberg I, Barshack I, Seiffers R, Kopolovic J, Kaiser N and A Karasik. (2000). Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat. Med.* 6:568–572.
8. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharna A and JJ O'Neil. (2000). In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97:7999–8004.

9. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB and JG Cornelius. (2000). Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat. Med.* 6:278–282.
10. Parnaud G, Bosco D, Berney T, Pattou F, Kerr-Conte J, Donath MY, Bruun C, Mandrup-Poulsen T, Billestrup N and PA Halban. (2008). Proliferation of sorted human and rat beta cells. *Diabetologia* 51:91-100.
11. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S and F Annunziato. (2006). Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6:435-441.
12. Meirelles LS and Nardi NB. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion and characterization. *Br. J. Haematol.* 123:702-711.
13. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and DR Marshak. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-47.
14. Li L, Furong L, Qi H, Feng G, Yuan K, Deng H and H Zhou. (2008). Coexpression of Pdx1 and betacellulin in mesenchymal stem cells could promote the differentiation of nestin-positive epithelium-like progenitors and pancreatic islet-like spheroids. *Stem Cells Dev.* 17:815-823.
15. Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S and S Efrat. (2007). Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells* 25:2837-2844.
16. Davani B, Ikonomou L, Raaka BM, Geras-Raaka E, Morton RA, Marcus-Samuels B and MC Gershengon. (2007). Human islet-derived precursor cells are mesenchymal stromal cells that differentiate and mature hormone-expressing cells in vivo. *Stem Cells* 25:3215-3222.
17. Schneider MR and E Wolf. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J. Cell. Physiol.* 218:460-466.
18. Miettinen M, Ormio P, Hakonen E, Banerjee M and T Otonkshi. (2008). EGF receptor in pancreatic β -cell mass regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 36:280-285.

19. Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P and CP Blobel. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell. Biol.* 164:769-779.
20. Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K and J Folkman. (1993). Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 259:1604-1607.
21. Detemercio C, Beattie GM, Dib SA, Lopez AD and A Hayek. (2000). A role for activin and betacellulin in human fetal pancreatic cell differentiation and growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:3892-3897.
22. Li L, Seno M, Yamada H and I Kojima. (2003). Betacellulin improves glucose metabolism by promoting conversion of intraislet precursor β -cells in streptozotocin-treated mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285:E577-E583.
23. Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miygawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada, H and I Kojima. (1996). Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J. Clin. Invest.* 97:1647-1654.
24. Cho, YM, Lim JM, Yoo DH, Kim JH, Cheng SS, Park SG Kim TH, Oh SK, Choi YM, Moon SY, Park KS and HK Lee. (2008). Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic β -cell differentiation in human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366:129-134.
25. Li L, Yi Z, Seno M and I Kojima. (2004). Activin A and Betacellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells in neonatal streptozotocin-treated rats. *Diabetes* 53:608-615.
26. Schneider MR, Dahlhoff M, Herbah N, Renner-Mueller I, Dalke C, Puk O, Graw J, Wanke R and E Wolf. (2005). Betacellulin overexpression in transgenic mice causes disproportionate growth, pulmonary hemorrhage syndrome, and complex eye pathology. *Endocrinology* 146:5237-5246.
27. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Corthenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS and A Keating. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393-395.

28. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R and R Mckay. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292:1389-1394.
29. Chandra V, Swetha G, Phadnis S, Nair PD, Bhonde RR. (2009). Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells* 27:1941-1953.
30. Gao F, Wu DQ, Hu YH, Jin GX, Li GD, Sun TW, Li FJ. (2008). In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived Mesenchymal stem cells. *Transl. Res.* 151:293-302.
31. Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim SB, Kim, CW. (2005). In vitro trans-differentiation of rat Mesenchymal stem cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330:1299-1305.
32. Trucco M. (2005). Regeneration of pancreatic β cell. *J. Clin. Invest.* 115:5-12.
33. Huotari MA, Palgi J and T Otonkoski. (1998). Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen. *Endocrinology* 139:1994-1499.
34. Dahlhoff M, Dames PM, Leechner A, Herbach N, van Burck L, Wanke R, Wolf E and MR Schneider. (2009). Betacellulin overexpression in transgenic mice improves glucose tolerance and enhances insulin secretion by isolated islets in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 299:188-193.
35. Yanomoto Y, Yamada S, Kodera T, Hara A, Motoyoshi K, Tanaka Y, Nagaoka T, Seno M and I Kojima. (2008). Reversal of streptozotocin-induced hyperglycemia by continuous supply of betacellulin in mice. *Growth Factors* 26:173-179.
36. Moriscot C, Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D, Fravot M and PY Benhamou. (2005). Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells* 23:594-604.

37. Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B and BM Raaka. (2004). Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* 306:2261-2264.
38. Russ HA, Ravassard P, Kerr-Conte J, Pattou F, Efrat S. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cells expanded in vitro from lineage-traced adult human pancreatic beta cells. *Plos One* 4:e6417.
39. Atouf F, Park CH, Pechhold K, Ta M, Choi Y, Lumelsky NL. (2007). No evidence for mouse pancreatic B-cell Epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Diabetes* 56:699-702.
40. Sugiyama K, Yonemura H and H Okamoto. (1991). Effects of poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor on B-cells of a canine pancreas alter massive pancreatectomy. *Int. J. Pancreatol.* 8:85-95; 1991.
41. Otonkoski T, Beattie GM, Mally MI, Ricordi C and A Hayek. (1993). Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *J. Clin. Invest.* 92:1459-1466.
42. Rudnick A, Ling TY, Odagiri, H. Rutter WJ and MS German. (1994). Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12203-12207.
43. Harkness JE and JE Wagner. 4th ed. *The biology and medicine of rabbits and rodents.* (1995). Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
44. Hisanaga E, Park KI, Yamada S, Hashimoto H, Takeuchi T, Mori M, Seno M, Umezawa K, Takei I and I Kojima. (2008) A simple method to induce differentiation of murine bone marrow mesenchymal stem cells to insulin-producing Conophylline and betacellulin-delta4. *Endrocr. J.* 55:535-543.
45. Johansson A, Lau J, Sandberg M, Borg LA, Magnusson PU, Carlsson, PO. (2009). Endothelial cell signaling supports pancreatic beta cell function in the rat. *Diabetologia* 52:2385-2384.
46. Chu KY, Lau T, Carlsson PO, Leung PS. (2006). Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* 55:367-374. Lau T, Carlsson PO, Leung PS. (2004). Evidence for local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia* 47:240-248.

48. Kobayashi N, Yuasa T and T Okitsu. (2009). Regenerative medicine for diabetes mellitus. *Cell Transplant.* 18:491-496.

Figure legends:

Figure 1: Characterization of mesenchymal stem cells – scale bars represent 100µm. (A) Phase contrast of adherent fibroblast-like cells colony 10 days after plating. (B) MSC morphology stained with H&E. (C) Induced adipogenic differentiation evidenced by Oil Red-O stained fat vacuoles. (D) Induced osteogenic differentiation, stained with Alizarin Red. E) FACS analysis for CD34, CD45, CD11b/c, CD44, CD29 e CD90.

Figure 2: Expression of BTC and GFP in BTC-MSCs and pIRES-MSCs (A) BTC-MSCs GFP positive. (B) BTC-MSCs cells positive for -anti-betacellulin (diluted 1:100) traced with Cy3-conjugated rabbit anti-goat secondary antibody. (C) Merge of A and B. (D) pIRES-MSCs GFP positive cells. (E) pIRES-MSCs negative for the expression of betacellulin traced with Cy3. (D) Merge of D and E.

Bars represent 100 µm

Figure 3: Morphologic analysis of BTC-MSCs and pIRES-MSCs 10 days after transfection. Bar= 100 µm. (A) Phase contrast: BTC-MSCs developed an epithelium-like morphology. (B) Phase contrast: pIRES-MSCs maintained a fibroblast-like morphology. (C) Fluorescence microscopy: BTC-MSCs epithelium-like cells are EGFP-positive. (D) pIRES-MSCs in fluorescence microscopy.

Figure 4: RT-PCR analysis of mRNA expression of the indicated genes in RINm5F, MSCs, pIRES-MSCs and BTC-MSCs.

Figure 5: BTC-MSCs tended to aggregate and form a 3-D structure similar to islet-like spheroids. (A) Phase contrast of islet-like spheroids. (B) Fluorescence microscopy of islet-like spheroids. Bars represent 100 μm

Figure 6: In vitro glucose-induced insulin secretion in BTC-MSCs. The amount of insulin in the supernatant was determined by RIA.

Figure 7: Functional analysis of BTC-MSCs and pIRES-MSCs in vivo. (A) Blood glucose levels (mean \pm SE). BTC-MSCs and pIRES-MSCs are significantly different from day 14 on ($p=0.001$). (B) Body weight (mean \pm SE). BTC-MSCs transplanted animals had a less severe weight loss when compared to pIRES-MSC-transplanted animals ($p=0.01$).

Figure 8: Histological analysis of the graft area. Hematoxylin eosin staining showing the presence of transplanted cells under the renal capsule. A=200x.

Figure 9: Immunohistochemistry of the transplanted kidney. (A) Insulin positive cells in the border of tubule structures A= 400x. (B) Negative control with the omission of primary antibody. A=200x

Figure 1

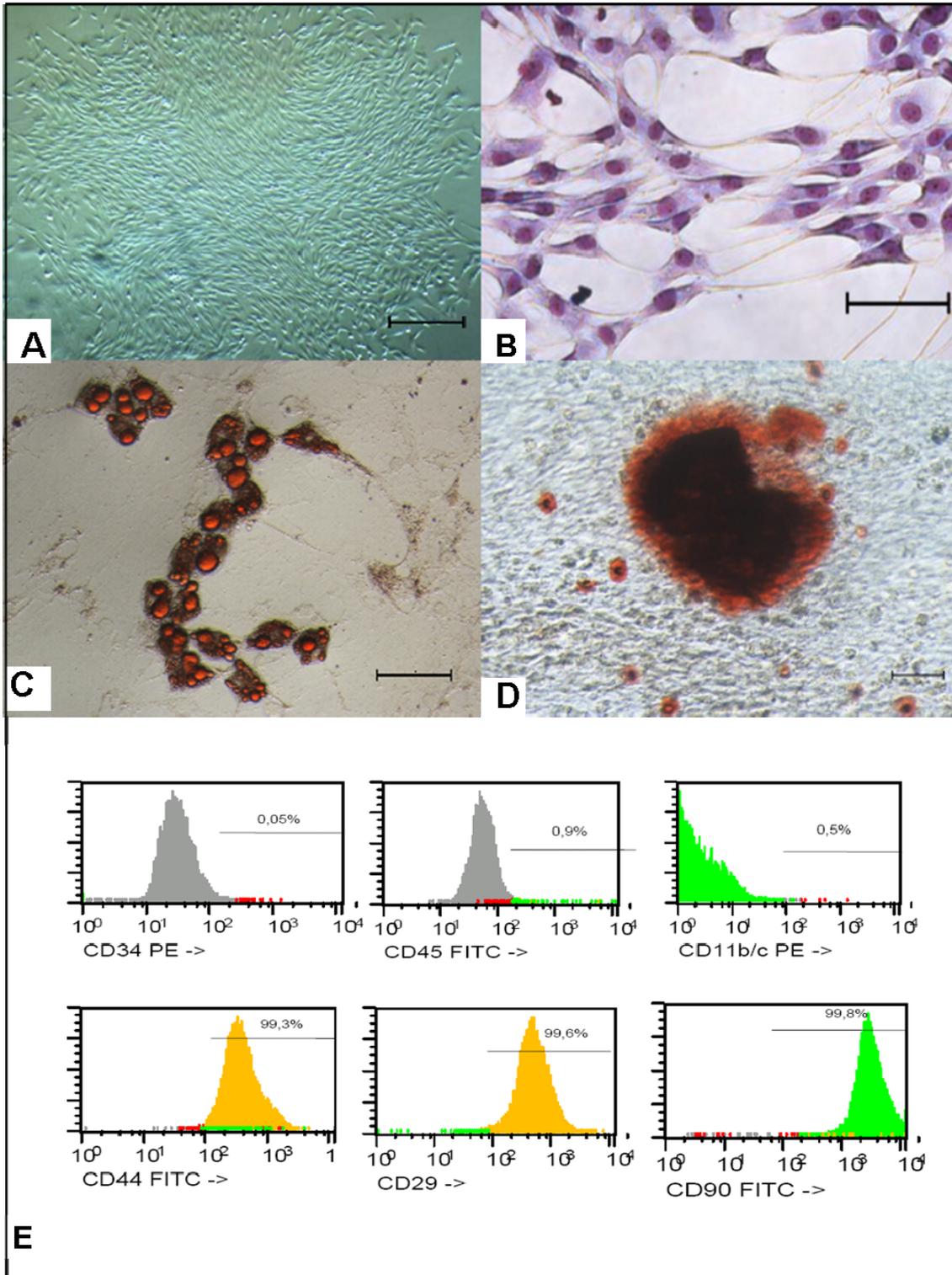


Figure 2

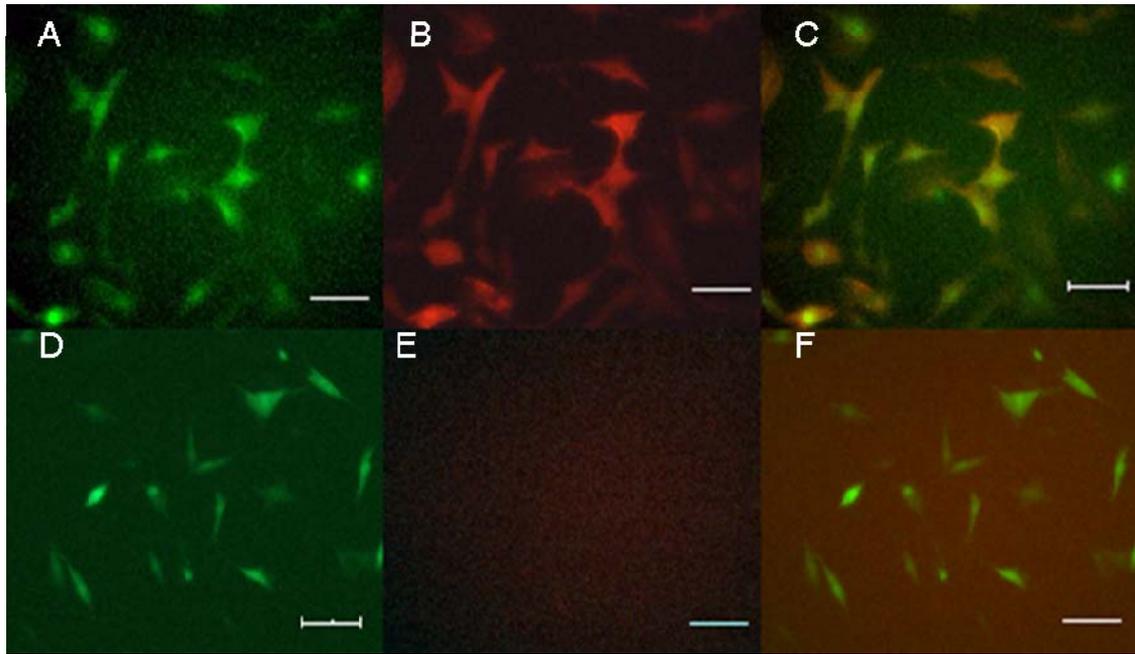


Figure 3

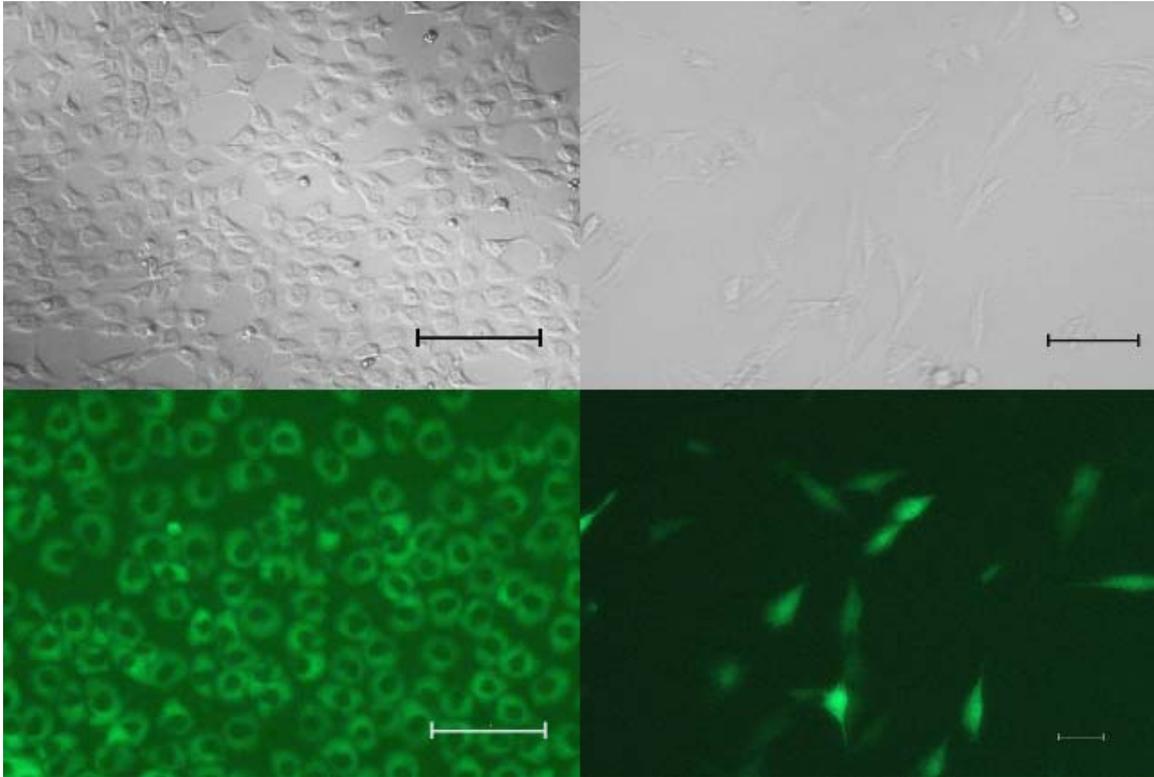


Figure 4

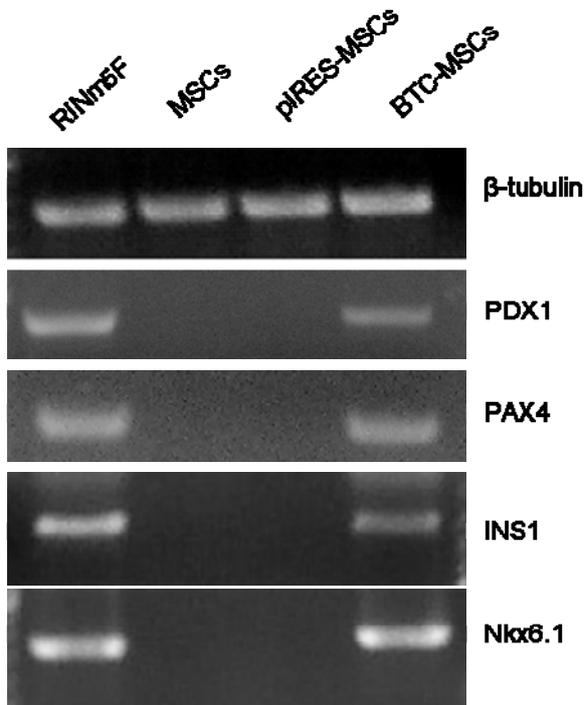


Figure 5

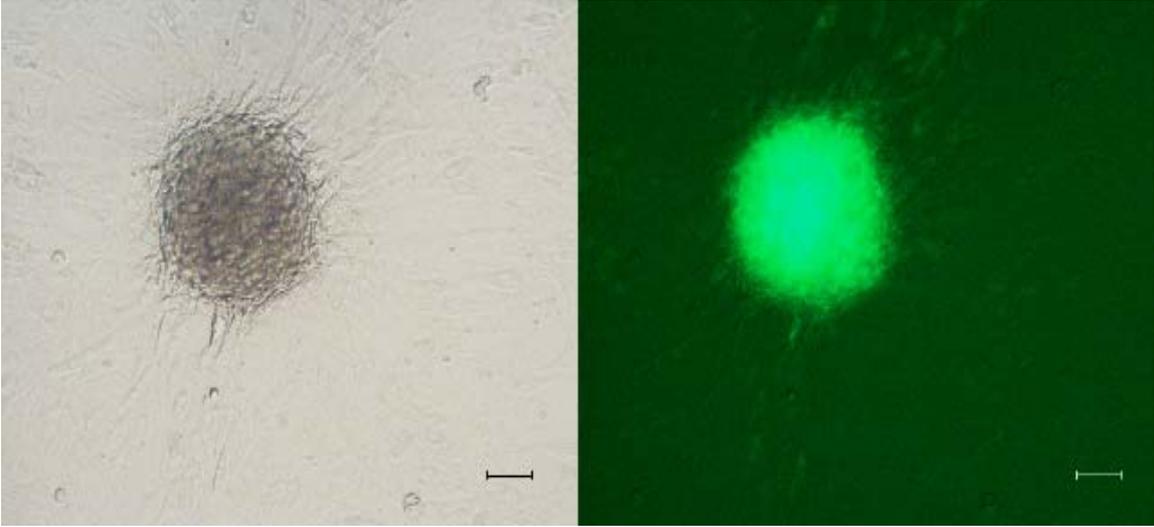


Figure 6

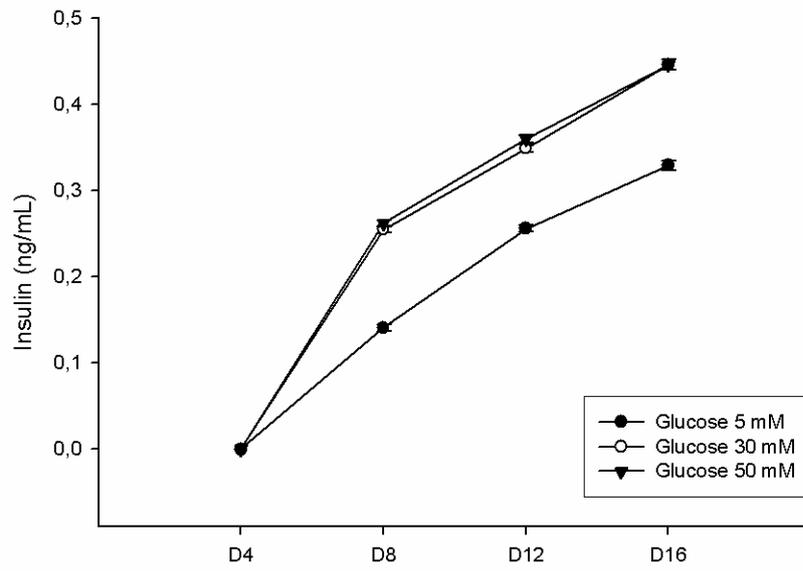
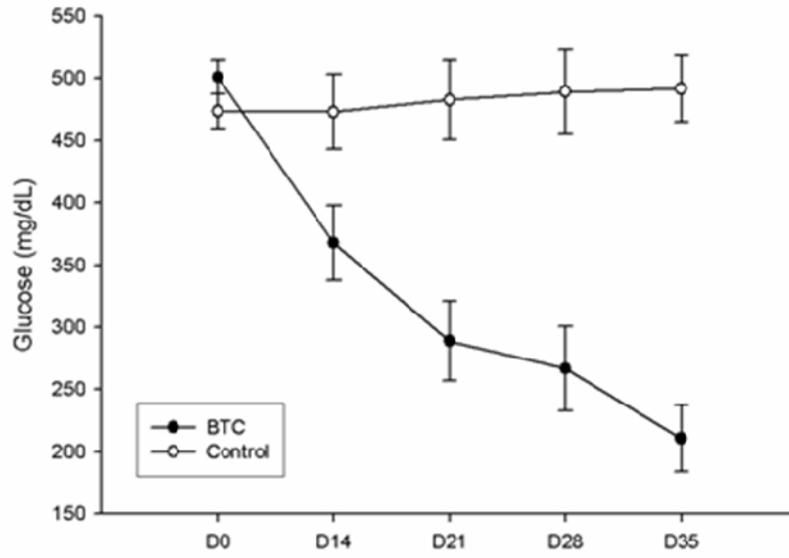


Figure 7

A



B

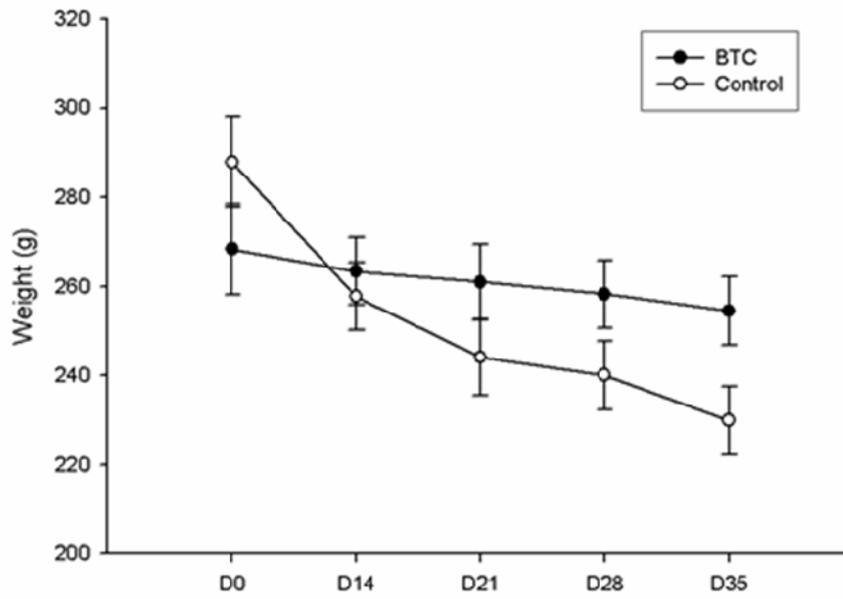


Figure 8

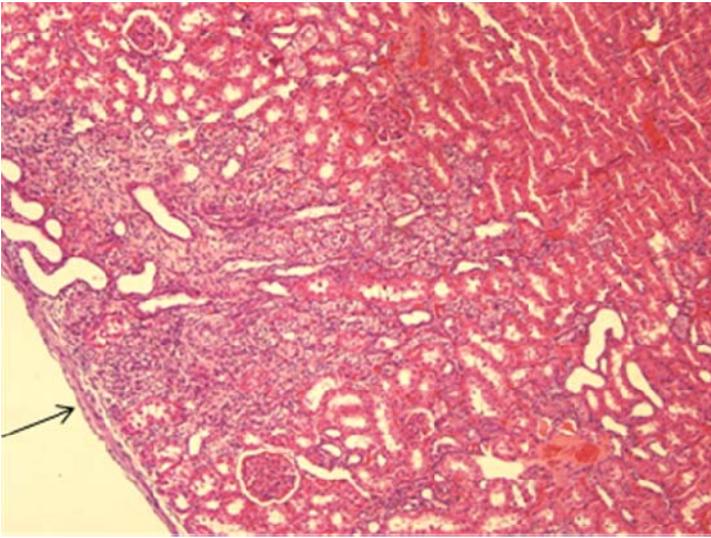


Figure 9

