



Avaliação de Células-Tronco Mesenquimais Murinas Órgão-específicas quanto à Capacidade de Diferenciação *in vitro* em Células Produtoras de Insulina e Reversão do Diabetes Mellitus

Patrícia Sesterheim, Nance Beyer Nardi, David Saitovitch

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, PUCRS

Resumo

A terapia celular para o diabetes mellitus tipo 1 tem por objetivo a recomposição biológica da função endócrina pancreática deficiente nestes pacientes. Este trabalho objetiva comparar a capacidade de expansão e diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais murinas em células produtoras de insulina isoladas de diferentes órgãos.

Introdução

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma síndrome auto-imune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva de células β produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas. Dentre as estratégias de tratamento, atingindo a insulino-independência para o diabetes tipo 1, podemos citar o transplante de pâncreas, transplante de ilhotas pancreáticas e, mais recentemente, terapia celular utilizando células-tronco (1).

Uma das abordagens na utilização de células-tronco como fonte de células para o tratamento do diabetes é sua diferenciação em células produtoras de insulina (CPIs), sob condições específicas, e posterior transplante em animais diabéticos. A principal dificuldade nessa área é diferenciar as células-tronco de maneira consistente, originando células capazes de produzir insulina em quantidades equivalentes às produzidas pelas células β e células que respondam ao estímulo de glicose, através da liberação de insulina.

Assim, este projeto de pesquisa tem como objetivo comparar a capacidade de expansão e diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais murinas (mMSCs) em células produtoras de insulina (CPI) isoladas de diferentes órgãos.

Metodologia

Estudo I – Isolamento, expansão e caracterização de células-tronco mesenquimais murinas isoladas de diferentes órgãos. Camundongos C57BL/6N-eGFP+ com 8 semanas de idade foram sacrificados por deslocamento cervical (2,3) (n=3). MSCs foram isoladas de rim, pâncreas, ducto pancreático, fígado e medula óssea, conforme metodologia estabelecida por Meirelles e Nardi (4). Caracterização – além de determinar, através de citometria de fluxo, marcadores de superfície e outras proteínas presentes em células indiferenciadas, as células foram expostas a meios indutores de diferenciação adipogênica e osteogênica. Análise estatística –ANOVA ($p < 0,05$).

Estudo II- Diferenciação das MSCs murinas em CPIs. Serão testados *in vitro*: diferentes concentrações de glicose, nicotinamida, activina A, fator de crescimento de hepatócito (HGF). Real-time RT-PCR, ELISA e imunocitoquímica – análise do grau de diferenciação *in vitro* em CPIs das diferentes culturas de MSCs. Adicionalmente, análise com anticorpos anti-insulina, anti-glucagon e anti-peptídeo C. Análise estatística –ANOVA ($p < 0,05$).

Estudo III – Transplante de CPIs e avaliação da funcionalidade das CPIs *in vivo*. Serão utilizados camundongos da linhagem C57BL/6N com 8 semanas de idade. A indução de diabetes será realizada através de 5 x 40mg/kg de STZ (glicemia > 250mg/dL). Grupo experimental : transplante das CPIs (5×10^6) via subcapsular renal após 7 dias da indução do diabetes mellitus (n=6); Grupo controle 1: animais diabéticos tratados com transplante subcapsular renal de ilhotas pancreáticas (n=6); Grupo controle 2: animais diabéticos não tratados (não transplantados) (n=6). A reversão do diabetes será considerada quando os animais mantiverem sua glicemia ≤ 200 mg/dL por mais de 60 dias. Análise estatística- teste ANOVA, teste t de Student para amostras emparelhadas, Kaplan-Meier; Log-Rank e Breslow ($p < 0,05$).

Resultados preliminares

Estudo I Isolamento, expansão e caracterização de células-tronco mesenquimais murinas isoladas de fígado, medula óssea, baço, rim, pâncreas e ducto pancreático.

Independente da fonte celular estudada, células-tronco foram isoladas e mostraram-se aderentes à placa com características morfológicas fibroblastóides. Quanto à cinética de expansão de cultura, as células da medula óssea e o ducto pancreático apresentaram potencial

de crescimento menos elevado. A análise fenotípica (citometria de fluxo) revelou que as MSCs forma positivas para CD29, CD44 e CD105, mas negativas para CD34, CD45 e CD11b. Além disso, as células-tronco isoladas dos diferentes órgãos quando expostas ao meio indutor, diferenciaram-se em adipócitos e osteoblastos. Assim, através da análise fenotípica, aderência ao plástico e diferenciação osteogênica e adipogênica pode-se caracterizar as células isoladas como células-tronco mesenquimais.

Estudo II- Diferenciação das MSCs murinas em CPIs.

Culturas de MSCs de rim, na quarta passagem, foram expostas a meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10mM de nicotinamida, 2nM de activina-A, 100pM de HGF e 1% de estreptomocina/penicilina. Após 4 dias, as células induzidas foram coradas com ditizona indicando a presença de insulina.

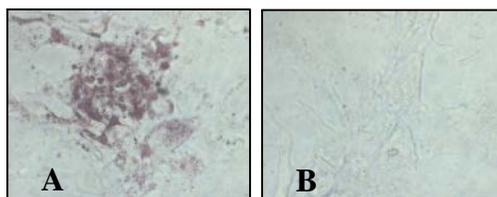


Figura 1 – Cultivo de células tronco mesenquimais, isoladas de rim de camundongo transgênico para eGFP. (A) MSCs submetidas à diferenciação em célula produtora de insulina coradas com ditizona e (B) controle: células em meio de cultivo sem indutores.

Referências

- 1 EFRAT, S. **Generation of insulin-producing cells from stem cells for cell replacement therapy of type 1 diabetes.** Isr Med Assoc J 6:1-3, 2004.
- 2 COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Legislação e Ética.** São Paulo. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 20 mar. 2002.
- 3 Rio Grande do Sul. **Lei 11.915, de 21 de maio de 2003.** Institui o Código Estadual de Proteção aos Animais. Constituição do Estado, art.82 inc IV, 29 mai. 2003.
- 4 MEIRELLES, L.S.;NARDI, N.B. **Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization.** Br J Haematol 123:702-711, 2003.