



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e
Biologia Molecular**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POTENCIAL ANGIOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA NO TRANSPLANTE DE
ILHOTAS PANCREÁTICAS**

TIAGO OLIVEIRA RIBEIRO

SALVADOR-BA

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e
Biologia Molecular**

TIAGO OLIVEIRA RIBEIRO

**POTENCIAL ANGIOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA NO TRANSPLANTE DE
ILHOTAS PANCREÁTICAS**

**Dissertação apresentada ao Programa
Multicêntrico de Pós-graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular para
obtenção do título de mestre.**

Orientador: Prof. Dr. Vitor Antonio Fortuna

Co-orientadora: Prof. Dra. Letícia Labriola

SALVADOR-BA

2016

Ficha catalográfica fornecida pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA

R484 Ribeiro, Tiago Oliveira
 Potencial angiogênico de células tronco mesenquimais
 de medula óssea no transplante de ilhotas pancreáticas /
 Tiago Oliveira Ribeiro. -- Salvador, 2016.
 92 f. : il

 Orientador: Vitor Antonio Fortuna.
 Coorientadora: Leticia Labriola.
 Dissertação (Mestrado - Programa Multicêntrico de Pós-
 graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) --
 Universidade Federal da Bahia, ICS, 2016.

 1. Células tronco mesenquimais. 2. Angiogênese. 3.
 Ilhotas pancreáticas. 4. Terapia celular. I. Fortuna,
 Vitor Antonio. II. Labriola, Leticia. III. Título.

CDU:602.9

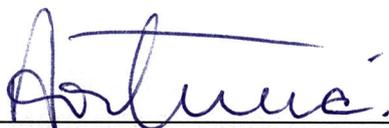
TIAGO OLIVEIRA RIBEIRO

**POTENCIAL ANGIOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
MEDULA ÓSSEA NO TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Salvador, 02 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Vitor Antônio Fortuna (Orientador/UFBA)
(Presidente)



Profa. Dra. Maria Isabel Doria Rossi (UFRJ)



Profa. Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha (UFBA/FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir cada conquista e guiar meu destino.

Aos meus pais, Valdivino e Eliane, pelo amor incondicional, educação e por serem um pilar na minha formação.

À minha irmã Tatiane, pelo incentivo e ajuda.

Aos meus padrinhos, Edvany e Manoel, pelo companheirismo e apoio.

Ao meu orientador, prof. Dr^o Vitor Antonio Fortuna, por ser o mentor de minha carreira científica, ensinamentos e oportunidades depositados a mim, e por ter contribuído de forma exponencial para o meu crescimento profissional. Sua dedicação à pesquisa, criatividade científica e empenho profissional é admirável.

Agradeço a toda equipe do nosso grupo de pesquisa, Railane, Carol, Ângelo, e em especial, Mércia Meira, minha amiga e aluna de iniciação científica, por toda ajuda e ensinamentos que não se restringem ao laboratório e irão perpetuar ao longo de minha vida.

À Brysa Mariana, minha colega de mestrado e também uma amiga para todas as horas.

Ao prof. Dr^o Roberto Meyer e prof^a Dr^a. Songelí Menezes Freire, pelo acolhimento no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, permitindo o desenvolvimento deste trabalho.

A todo o pessoal do LABIMUNO, Dona Chica, Mário, Zé, Manoel, Luciene, Zilda, Tadeu, Yoná, Ceiça, Marquinhos, Geraldo, vocês são maravilhosos.

À minha co-orientadora prof^a Dr^a. Letícia Labriola, pela colaboração e oportunidade de trabalhar em seu laboratório no Instituto de Química da USP.

À toda equipe do NUCEL na USP, especialmente a prof^a Dr^a Mari Sogayar, a Dr^a Ana Claudia Carreira e a Dr^a Marina Trombetta, pela colaboração e ensinamentos a mim depositados.

À equipe de ortopedia do Hospital Universitário da UFBA, em especial a Dr^o Gildásio Daltro, por permitir a coleta de material biológico de seus pacientes.

Aos amigos do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, pelo apoio nas dificuldades, amizade ao longo desses anos e momentos descontraídos.

A FAPESB e CAPES pelo auxílio financeiro e pelo investimento nas atividades científicas desenvolvidas neste projeto.

À coordenadora do programa prof^a Dr^a. Luzimar Gonzaga Fernandez, por lutar incessantemente pela melhoria do nosso programa diante das adversidades que lhe são impostas.

Aos pacientes, que cederam voluntariamente suas amostras biológicas, sem eles nada disso teria início.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

“ É preciso força, pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”

Los Hermanos

RESUMO

O diabetes mellitus têm se configurado como uma grave doença que acomete aproximadamente 415 milhões de pessoas no mundo. O transplante de ilhotas pancreáticas surge como uma alternativa terapêutica para esta doença. No entanto, a viabilidade reduzida das ilhotas após o isolamento, e a perda dos capilares sanguíneos que irrigam as ilhotas acarreta uma diminuição na sobrevivência das células e a rejeição imunológica ao enxerto. As células tronco mesenquimais (CTMs) surgem como uma opção interessante devido a sua capacidade de promover a vascularização por meio da liberação de fatores de crescimento e citocinas pró-angiogênicas. O objetivo deste estudo foi monitorar *in vitro* o potencial angiogênico do meio condicionado (MC) de CTMs provenientes de medula óssea sobre células endoteliais visando aperfeiçoar a revascularização e a viabilidade de ilhotas pancreáticas humanas. As CTMs de medula óssea foram caracterizadas pela expressão de marcadores moleculares, potencial de multi-linhagem e dobramento populacional. O MC de CTMs promoveu a migração, proliferação, viabilidade e angiogênese de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs). O MC ativou a via de sinalização PI3K/Akt em HUVECs. PCR quantitativo em tempo real e array do perfil proteômico do MC demonstraram que as células tronco expressam e secretam diversos fatores tróficos e citocinas sob condições de hipóxia. Ensaio *in vitro* demonstraram que o MC promoveu um aumento na viabilidade das ilhotas, assim como na manutenção da expressão de insulina e de CD31 nas células endoteliais intra-ilhotas. Com estes dados nós concluímos que o MC das CTMs em hipóxia demonstrou potencial angiogênico e contribuíram para a manutenção da viabilidade das ilhotas pancreáticas através da presença de fatores protéicos solúveis. Ainda, estes efeitos foram mediados através da via de Akt nas células endoteliais. Nossos dados corroboram o uso de MC de CTM para otimizar o transplante de ilhotas pancreáticas.

Palavras Chave: Células Tronco Mesenquimais, Angiogênese, Terapia celular.

ABSTRACT

Diabetes mellitus has been characterized as a serious disease that affects approximately 415 million people worldwide. The islet transplantation emerged as an alternative treatment for diabetes. However, the reduced islet cell viability after the isolation and the loss of islet vasculature cause a decrease in the survival of the cells and the immunological graft rejection. Mesenchymal stem cells (MSCs) appear as an interesting option to reduce barriers for this therapy due to its ability to promote vascularization through the release of growth factors and pro-angiogenic cytokines. The goal of this study was investigate *in vitro* the angiogenic potential of conditioned medium derived from bone marrow on endothelial cells aiming to improve revascularization and viability of human pancreatic islets. MSCs from bone marrow was characterized by the expression of molecular markers, multi-lineage potential and population doubling. MSC derived conditioned medium showed ability to promote migration, proliferation, viability and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Conditioned Medium activated the PI3K/Akt signaling pathway in HUVECs. q-PCR and proteome profiler array of conditioned medium fractions showed that the stem cells expressed and secrete several trophic factors and cytokines under hypoxic conditions. Insights *in vitro* proposed that conditioned medium promoted an increase in islet viability as well as increased in insulin secretion and maintenance of intra-islet endothelial cells. With this information we conclude that CM from MSCs in hypoxia showed angiogenic potential and contributed to maintaining the viability of pancreatic islets by the presence of soluble protein factors. Furthermore, these effects were mediated by Akt pathway in endothelial cells. Our data support the use of CM from CTM to optimize islet transplantation.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell Angiogenesis, Cell therapy.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ang-1 – do inglês, *Angiopoietin 1*

Akt – do inglês, *Protein Kinase B*

b-FGF – do inglês, *Basic Fibroblast Growth Factor*

Bigh3 – do inglês, *Transforming Growth Factor- β -Induced Protein ig-h3*

BrdU – do inglês, *5-Bromo-2-Deoxyuridine*

BSA – do inglês, *Bovine Serum Albumin*

CD90 – Cluster de diferenciação 90

CD73 – Cluster de diferenciação 73

CD105 – Cluster de diferenciação 105

CD146 – Cluster de diferenciação 146

CD29 – Cluster de diferenciação 29

CD14 – Cluster de diferenciação 14

CD34 – Cluster de diferenciação 34

CFU-F – do inglês, *Colony-Forming Unit-Fibroblast*

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CITR- Registro Colaborativo de Transplante de Ilhotas

CMF - do inglês, *calcium and magnesium free*

CMMO – Células Mononucleares da Medula Óssea

CTH – Célula Tronco Hematopoiética

CTM - Célula Tronco Mesenquimal

CTM-MO – Célula Tronco Mesenquimal de Medula Óssea

DAPI – do inglês, *4',6-Diamidino-2-Phenylindole*

DMEM Low – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium low Glucose*

DMEM High- do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose*

DNA – do inglês, *Deoxyribonucleic acid*

DT1- Diabetes Tipo 1

EGF- do inglês, *Epidermal Growth Factor*

EGM-2 – do inglês, *Endothelial Cell Growth Medium*

eNOS – do inglês, *Endothelial Nitric Oxide Synthase*

ERK – do inglês, *Extracellular Signal – Regulated Kinases*

FGF- do inglês, *Fibroblast Growth Factor*

FLT1 – do inglês, *Fms Related Tyrosine Kinase 1*

GAD – Glutamato Descarboxilase

GAPDH – do inglês, *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*

GM-CSF – do inglês, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

Hb – Hemoglobina

HBSC - Hemoglobina SC

HBSS – Hemoglobina SS

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HGF- do inglês, *Hepatocyte Growth Factor*

HIF – do inglês, *Hypoxia Inducible Factor*

HLA – do inglês, *Human Leukocyte Antigen*

HLA-DR - do inglês, *Human Leukocyte Antigen - antigen D Related*

HPRT – do inglês, *Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase*

Ht – Hematócrito

HUVEC- do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IBMX- do inglês, *3-isobutyl-1-methyl-xanthine*

IDF- do inglês, *International Diabetes Federation*

IEQ – Equivalente de Ilhotas

IGF- do inglês, *Insuline-like Growth Factor*

IGFBP-2 – do inglês, *Insuline-like Growth Factor Binding Protein 2*

IL-1 – do inglês, *Interleukin-1*

IL-1 β – do inglês, *Interleukin-1 beta*

IL-6- do inglês, *Interleukin-6*

KCl – Cloreto de Potássio

KDR – do inglês, *Kinase Insert Domain Protein*

KH₂PO₄ – Fosfato Monopotássico

MAPK – do inglês, *Mitongen- Activated Protein Kinase*

MC – Meio condicionado

MCAM – do inglês, *Melanoma Cell Adhesion Molecule*

MCP-1 – do inglês, *Monocyte Chemotactic Protein-1*

MMP- do inglês, *Matrix metalloproteinases*

NaCl – Cloreto de Sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

Na₂HPO₄ – Fosfato Dissódico

NFκβ – do inglês, *Factor Nuclear Kappa Beta*

NG2 – do inglês, *NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan*

NIH- do inglês, *National Institutes of Health*

NRG1 – do inglês, *Neuregulin 1*

NUCEL – Núcleo de Terapia Celular e Molecular

pAkt – do inglês, *Phospho Akt*

PBS – do inglês, *Phosphate Buffer Solution*

PCOLCE – do inglês, *Procollagen C-endopeptidase enhancer 1*

PDGF – do inglês, *Platelet Derived Growth Factor*

PF4 – do inglês, *Platelet Factor 4*

PPAR – do inglês, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

PTX3 – do inglês, *Pentraxin 3*

PVDF- do inglês, *Polyvinylidene fluoride*

qRT-PCR- do inglês, *Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction*

RDW – do inglês, *Red Cell Distribution Width*

RNA – do inglês, *Ribonucleic acid*

ROS – do inglês, *Reactive Oxygen Species*

RPM – Rotação por minuto

SDF-1 – do inglês, *Stromal Derived Factor-1*

SDS – do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*

SFB – Soro Fetal Bovino

α SMA – do inglês, *Alpha Smooth Muscle Actin*

SPARC – do inglês, *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein Precursor*

TGF- β – do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*

THBS – do inglês, *Trombospondin*

TIMP – do inglês, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*

TRITON – Polietileno glicol 4-tert-octilfenol éter

TWEEN – Polioxietileno-20-sorbitan monolaureato

TUNEL - do inglês, *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

uPA – do inglês, *Urokinase-Type-Plasminogen-Activator*

VCM – Volume Corpuscular Médio

VEGF- do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*

vWF – do inglês, *von Willebrand Factor*

fL – Fentolitro

g/cm³ – grama por centímetro cúbico

g/dL – Grama por decilitro

mm³ – milímetro cúbico

M – Molar

mM – Milimolar

mg – Miligrama

pg – picograma

μ L – Microlitro

μ m – Micrometro

μ M – Micromolar

μ g - Micrograma

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Panorama Mundial do Diabetes	16
Figura 2: Dados sobre o transplante de ilhotas registrado pelo CITR	20
Figura 3: Regulação da transcrição por HIF-1 em condições ambiente e de hipóxia	23
Figura 4: Ação de fatores tróficos sobre as células endoteliais	24
Figura 5: Ensaio de angiogênese in vitro	39
Figura 6: Fotomicrografia representativa da cultura de CTMs em pré-confluência ..	46
Figura 7: Fotomicrografia representativa da cultura de CTMs em confluência	46
Figura 8: Curva de expansão de CTM-MO	47
Figura 9: Análise imunofenotípica de marcadores de superfície por citometria de fluxo	48
Figura 10: Porcentagem da expressão de antígenos de superfície de CTMs	48
Figura 11: Caracterização do potencial multilinhagem de CTMs	49
Figura 12: Imunofluorescência das proteínas Col IV, α -SMA, PDGFR β e NG2	50
Figura 13: Viabilidade celular de CTMs	51
Figura 14: Gráfico representativo da viabilidade celular	52
Figura 15: HUVECs observadas em microscopia óptica de contraste de fase e após ensaio de imunofluorescência	53
Figura 16: Ensaio de migração celular	54
Figura 17: Ensaio de viabilidade das HUVECs em meio condicionado	55
Figura 18: Ensaio de proliferação das HUVECs por incorporação de BrdU	56
Figura 19: Quantificação da incorporação de BrdU após 24 horas	57
Figura 20: Ensaio de angiogênese in vitro com microesferas	58
Figura 21: Western blot de p-Akt e Akt	59
Figura 22: Perfil de expressão de CTMs quando condicionadas em normóxia e hipóxia	60
Figura 23: Perfil proteômico do meio condicionado	61
Figura 24: Ilhotas pancreáticas em microscopia óptica	62
Figura 25: Ensaio de viabilidade de ilhotas em meio condicionado	64

Figura 26: Imunofluorescência de insulina e CD31 em ilhotas pancreáticas de ratos	66
Figura 27: Quantificação da marcação para insulina e CD31	67
Tabela 1: Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados na imunofluorescência	35
Tabela 2: Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados no western blot ..	41
Tabela 3: Lista das sequências forward e reverse dos primers utilizados	42
Tabela 4: Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados na imunofluorescência para detecção de insulina e CD31 em ilhotas	44
Tabela 5: Dados hematológicos dos pacientes incluídos no estudo	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Diabetes Tipo I: Estado da arte e opções terapêuticas	15
1.2 Fisiologia do pâncreas.....	17
1.3 Transplante de Ilhotas pancreáticas no tratamento do diabetes tipo I	19
1.4 Células Tronco Mesenquimais: Aspectos moleculares, características funcionais in vitro e emprego na terapia celular	21
1.5 Influência da Hipóxia sobre o comportamento angiogênico das CTMs	23
1.6 Potencial angiogênico de CTMs e sua utilização no transplante de ilhotas	25
1.7 Meio condicionado de Células Tronco Mesenquimais.....	29
2 OBJETIVOS	30
2.1 Geral	30
2.2. Específicos	30
3 METODOLOGIA	31
3.1.1 Amostra biológica e fracionamento para obtenção das células mononucleares	31
3.1.2 Isolamento, cultivo e expansão de células tronco mesenquimais	31
3.1.3 Obtenção, isolamento, cultivo e expansão de HUVECs	32
3.1.4 Curva de crescimento populacional, cálculo do tempo de dobramento e número de dobramento populacional cumulativo das CTMs	32
3.1.5 Caracterização Imunofenotípica em citômetro de fluxo	33
3.1.6 Ensaio de multilinhagem celular <i>in vitro</i>	33
3.1.7 Imunofluorescência para detecção de proteínas membranares e de citoesqueleto	34
3.1.8 Preparo de meio condicionado das CTM	35
3.1.9 Dosagem de proteínas totais	36
3.2.1 Dosagem de Fostatase Alcalina	36
3.2.2 Coloração de CTMs com Calceína-AM	36
3.2.3 Ensaio <i>in vitro</i> de migração celular das HUVECs (modelo Scratch Assay)	36
3.2.4 Ensaio <i>in vitro</i> de detecção de TUNEL em HUVECs	37
3.2.5 Ensaio <i>in vitro</i> de detecção de BrdU em HUVECs	38

3.2.6 Ensaio <i>in vitro</i> de tubulogênese das HUVECs	38
3.2.7 Detecção de p-Akt e Akt por Western Blot	39
3.2.8 qRT-PCR	41
3.2.9 Perfil proteômico do meio condicionado: Identificação de fatores secretados pelas CTMs	42
3.3.1 Isolamento de ilhotas pancreáticas de rato	42
3.3.2 Cultura das ilhotas pancreáticas	43
3.3.3 Ensaio <i>in vitro</i> de coloração live/dead de ilhotas pancreáticas	43
3.3.4 Imunofluorescência confocal para ensaio de insulina e células endoteliais em ilhotas pancreáticas	44
3.3.5 Análise Estatística	44
4 RESULTADOS	45
4.1.1 Dados epidemiológicos dos pacientes e obtenção de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea:	45
4.1.2 Aspectos morfológicos após isolamento, cultivo e expansão de células tronco mesenquimais (CTMs):	45
4.1.3 Avaliação da cinética de expansão celular	47
4.1.4 Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo:	47
4.1.5 Caracterização por diferenciação osteogênica e adipogênica	49
4.1.6 Identificação de marcadores membranares e de citoesqueleto em CTMs	50
4.1.7 Pré-condicionamento das CTMs e avaliação da viabilidade celular	50
4.1.8 Aspectos morfológicos e caracterização de células endoteliais derivadas do cordão umbilical humano (HUVECs)	52
4.1.9 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade migratória das HUVECs (<i>Scratch wound assay</i>)	53
4.2.1 Avaliação <i>in vitro</i> da Viabilidade das HUVECs (<i>TUNEL assay</i>)	55
4.2.2 Avaliação <i>in vitro</i> da proliferação de HUVECs (<i>BrdU assay</i>)	56
4.2.3 Avaliação tubulogênica das HUVECs nos meios condicionados	57
4.2.4 Western Blot de p-Akt e Akt	58
4.2.5 Análise da expressão gênica das CTMs	60
4.2.6 Perfil proteômico do meio condicionado	61
4.2.7 Isolamento de Ilhotas Pancreáticas de ratos	62

4.2.8 Ensaio <i>in vitro</i> de viabilidade de ilhotas pancreáticas	63
4.2.9 Avaliação da expressão de insulina e morfologia em ilhotas na presença de meio condicionado	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES.....	73
7 REFERÊNCIAS	74
8 ANEXO.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes tipo I: Estado da arte e opções terapêuticas

Diabetes Tipo I é caracterizada como uma patologia multifatorial onde a predisposição genética combinada com fatores ambientais induzem a destruição autoimune específica de células β pancreáticas produtoras de insulina (FIGLIUZZI, et al., 2014). A Federação Internacional de Diabetes estima que 415 milhões de pessoas ao redor do mundo têm diabetes tipo I e II, um número que está previsto aumentar para 642 milhões até 2040 (figura.1) (acesso disponível em: <http://www.diabetesatlas.org>). As ilhotas pancreáticas são os alvos da destruição autoimune, devido a invasão de células mononucleares que causam uma reação inflamatória denominada “insulite”, levando a uma perda massiva de células β após um período prolongado da doença. A morte das células β no curso da insulite é provavelmente causado pelo contato direto de macrófagos ativados e linfócitos T, e/ou exposição a mediadores solúveis secretados por estas células, incluindo citocinas, óxido nítrico (NO) e radicais livres de oxigênio (CNOP, et al. 2005).

Diferentes fatores de risco genético conhecidos podem predizer para diabetes tipo 1, no entanto, auto anticorpos são os marcadores pré-clínicos mais importantes. Auto anticorpos incluem: Auto anticorpos a células de ilhotas, auto anticorpos para insulina, auto anticorpos para GAD (GAD65) e auto anticorpos para tirosinas fosfatases IA-2 e IA-2 β . Um ou mais desses auto anticorpos estão presentes em 85-90% dos indivíduos quando hiperglicemia em jejum é inicialmente detectada (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

Vários loci gênicos têm sido associados com o diabetes tipo 1, mas a região HLA (antígeno leucocitário humano), localizado no cromossomo 6p com seus múltiplos genes continua sendo o maior contribuinte para a susceptibilidade genética ao diabetes tipo I. A região HLA contém mais de 200 genes identificados, dos quais metade deles estão previstos serem expressos (NOBLE & ERLICH, 2012). Fatores ambientais também desempenham um papel substancial no desenvolvimento de diabetes tipo I. Estes incluem agentes infecciosos específicos, fatores dietéticos, fatores perinatais, fatores socioeconômicos e fatores psicossociais (PENG & HAGOPIAN, 2006).

O tratamento de diabetes tipo 1 inclui diversas abordagens terapêuticas, das quais, administração de insulina exógena é a principal forma de tratamento da hiperglicemia em todos os pacientes com DT1.

A insulinoterapia foi a primeira terapia para o tratamento de diabetes tipo 1 e ainda representa o tratamento primário para os pacientes portadores dessa patologia, no entanto, frequentes episódios de hipo e hiperglicemia afetam a qualidade de vida desses pacientes. Recentes inovações tecnológicas como a formulação de análogos de insulina, dispositivos para administração de insulina e sistemas de monitoramento de glicose permitiram aos pacientes diabéticos melhorar seus controles glicêmicos (FIGLIUZZI, et al., 2014).

Entretanto, a regulação fisiológica dos níveis de glicose no sangue sistêmico permanece um desafio. A única cura definitiva possível para esta doença, consiste na substituição da massa de células β destruídas por outras células β novas capazes de detectar níveis de açúcar no sangue e secretar quantidades adequadas de insulina de maneira glicose-dependente (PELLEGRINI, et al., 2016). Até o momento, as únicas abordagens clínicas disponíveis capazes de restaurar a massa de células β em pacientes com DT1 são os transplantes de pâncreas ou de ilhotas pancreáticas, consistindo este último na infusão de células endócrinas na veia porta hepática do receptor necessitando apenas de um procedimento cirúrgico minimamente invasivo comparado ao complexo transplante de pâncreas total (VENTURINI et al., 2005).

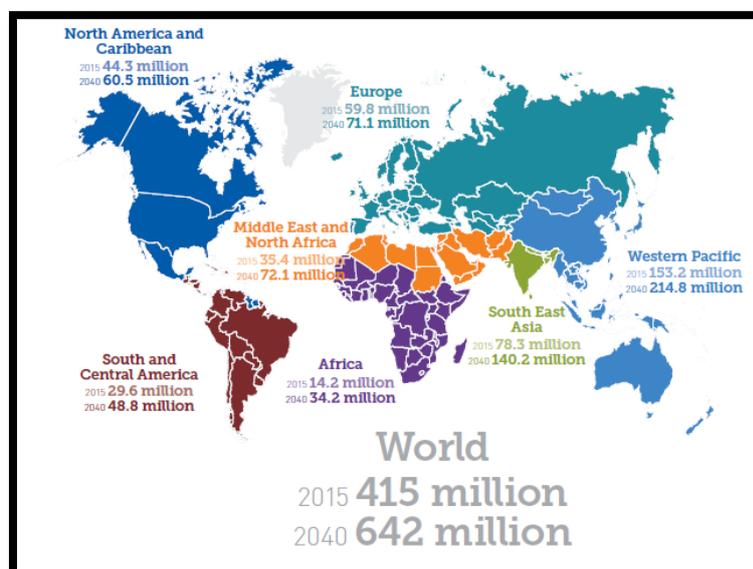


Fig 1. Panorama mundial do diabetes. Número estimado de pessoas entre 20-79 anos com diabetes ao redor do mundo e por região em 2015 e 2040. Fonte: IDF Diabetes Atlas, Seventh Edition, 2015.

1.2 Fisiologia do pâncreas

O pâncreas é o único órgão responsável por orquestrar dois processos vitais independentes dentro do corpo, sendo um deles a absorção de nutrientes através da liberação de enzimas digestivas exócrinas e a segunda função envolve o controle da homeostase de glicose através da liberação de hormônios endócrinos.

As células acinares (exócrinas) compõem aproximadamente 98% da massa pancreática e são responsáveis pela secreção de enzimas digestivas no ducto pancreático, enquanto as ilhotas de Langerhans correspondem a 2% da massa pancreática e são responsáveis pela manutenção da homeostase da glicose através da síntese e liberação de hormônios, tais como insulina e glucagon (BALLIAN & BRUNICARDI, 2007).

As ilhotas de Langerhans podem ser consideradas “micro-órgãos” no interior do pâncreas abrangendo cerca de 1% do órgão. Apesar de seu pequeno volume, é estimado que elas recebem até 15% do fornecimento sanguíneo pancreático e são responsáveis pela função endócrina da glândula (BALLIAN & BRUNICARDI, 2007).

O pâncreas humano contém aproximadamente 1×10^6 ilhotas, cada uma delas com cerca de $2,5 \times 10^3$ células, embora os tamanhos individuais variem consideravelmente. A organização celular dentro da histoarquitetura das ilhotas revela o claro benefício homeostático. Cada cluster de ilhota, independentemente da forma e tamanho, contém células alfa (α), beta (β), delta (δ), PP e células épsilon, que sintetizam e liberam glucagon, insulina, somatostatina, polipeptídeos pancreáticos e grelina (SCHARFMANN et al., 2008).

As células alfa humanas representam cerca de 30% da composição celular das ilhotas e são responsáveis pela secreção de glucagon, influenciando a regulação de glicose e também de cetonas (CABRERA et al., 2006). As células delta pancreáticas correspondem a menos de 10% da composição celular das ilhotas e são responsáveis por secretar somatostatina, um hormônio originalmente isolado a partir do hipotálamo e potente inibidor do glucagon, insulina e polipeptídeo pancreático. As células PP, secretam o menos estudado dos hormônios da ilhota, o polipeptídeo pancreático (PP), e correspondem a menos de 5% da composição celular da ilhota. PP têm sido demonstrado ter um efeito inibitório sobre as secreções exócrinas no pâncreas, destacando a comunicação entre as células endócrinas e exócrinas dentro da glândula (BALLIAN & BRUNICARDI, 2007). Células Epsilon recentemente

descobertas, abrem menos de 1% de uma ilhota humana e são responsáveis pela secreção de grelina. Acredita-se que este peptídeo tenha relação com a liberação do hormônio de crescimento, regulação metabólica e balanço energético, mas o seu papel nas ilhotas ainda não foi definido conclusivamente (MEYER, 2010).

Células beta pancreáticas formam a maior parte do conteúdo celular endócrino (aproximadamente 60%) dentro do pâncreas e secreta o hormônio insulina, um peptídeo anabólico de 51 aminoácidos na forma ativa que é essencial para a regulação homeostática da glicose. Quando substratos de alta energia estão em excesso, a liberação de insulina desencadeia o metabolismo de glicose, lipídeos e proteínas nas células em adição a síntese de RNA e DNA. O mecanismo de ação da insulina ainda não está totalmente elucidada, no entanto, entende-se que após a ativação do receptor do hormônio, ocorre uma cascata de modificações enzimáticas. A ação hipoglicêmica da insulina é o resultado da captação de glicose via translocação dos transportadores de glicose (GLUT-4) e aminoácidos, e ativação da síntese de proteínas, além da síntese de glicogênio e triglicerídeos a partir da glicose (PEPPER et al., 2013).

A organização dos constituintes celulares dentro da ilhota têm papel importante sobre a homeostase da glicose. Embora predominantemente composta por células endócrinas, outros tipos celulares compartilham uma porção dessa estrutura. Células endoteliais vasculares compõem a maioria das células não endócrinas dentro das ilhotas, sendo os componentes restantes, fibras nervosas, perícitos, macrófagos e células dentrídicas (PEPPER et al., 2013).

Células endoteliais intra ilhotas são responsáveis pela liberação de fatores pró angiogênicos, tais como, VEGF, HGF, FGF, EGF e MMP que auxiliam na criação de novos vasos e capilares dentro da ilhota formando uma rede de vascularização essencial para função e sobrevivência do tecido (BRISSOVA et al., 2004). O arranjo específico das células endócrinas nas ilhotas pancreáticas e a microcirculação, sugere uma ligação entre morfologia e função dentro da ilhota. É sabido que as ilhotas funcionam como micro-órgãos integrados, e as células endócrinas das ilhotas podem influenciar a função das células endoteliais dos vasos sanguíneos, e vice-versa. A angiogênese nas ilhotas é fundamental para a formação de ilhotas normais durante o desenvolvimento embrionário. No desenvolvimento pós-natal em roedores, o crescimento rápido das ilhotas coincide com a proliferação de células endoteliais

vasculares e aumento da densidade vascular (ZANONE et al., 2008). Dessa forma, é fundamental para manutenção da viabilidade da ilhota pós transplante, a preservação dessa rede vascular intrínseca ou a formação de uma nova estrutura capilar a partir das células endotélias remanescentes.

1.3 Transplante de ilhotas pancreáticas no tratamento do Diabetes tipo I

O campo de transplante de ilhotas pancreáticas tem evoluído significativamente ao longo das últimas 3 décadas graças aos incríveis esforços da comunidade científica em todo mundo, com melhorias contínuas das técnicas de processo e manutenção das ilhotas, juntamente com o desenvolvimento de protocolos de indução e mais eficazes e administração de imunossupressores. O transplante de ilhotas pancreáticas surgiu como um avanço clínico no controle glicêmico (GLEASON et al., 2000; KIDO et al., 2000), no entanto, existem vários desafios que limitam sua aplicação generalizada.

O transplante de ilhotas pancreáticas é vantajoso comparado com o transplante total do pâncreas porque é relativamente não invasivo. O transplante de pâncreas pode produzir a longo prazo a independência da insulina exógena, no entanto, é necessária uma grande cirurgia, associada com considerável morbidade e mortalidade precoce com imunossupressão obrigatória ao longo da vida. A morbidade associada ao transplante de ilhotas é 20 vezes menor do que a do transplante de pâncreas, e ilhotas saudáveis podem ser isoladas a partir de pâncreas que não podem ser utilizados para o transplante total do pâncreas, o que é extremamente vantajoso dado a escassez de doadores (MUIR et al., 2014).

O trabalho publicado por Barton et al. (2012) fez um levantamento do total de 677 transplantes de ilhotas realizados em alguns países entre 1999-2010, e foi constatada uma melhora percentual de 44% quanto a insulino-independência dos pacientes conquistada após 3 anos da realização dos últimos transplantes realizados entre 2007 a 2010, ratificando o papel promissor desta terapia. Na última década, por exemplo, mais de 750 transplantes de ilhotas foram realizados em mais de 30 centros de transplantes internacionais (figura.2) (BRUNI et al., 2014).

O trabalho de Balamurugan et al. (2014) traz uma retrospectiva de 1017 isolamentos de ilhotas para 537 pacientes, realizados entre 1999-2010, e mostra um relativo sucesso constatado a partir do índice equivalente de ilhotas (IEQ) com o decorrer do tempo referente a viabilidade das ilhotas pós-transplante e a taxa

equivalente de insulina produzida com os avanços da técnica com o suceder dos anos. Esses dados publicados trazem uma avaliação positiva do transplante de ilhotas pancreáticas, demonstrando melhoria na quantidade, como também nos critérios clínicos de qualidade dos isolamentos realizados entre 1999-2010.

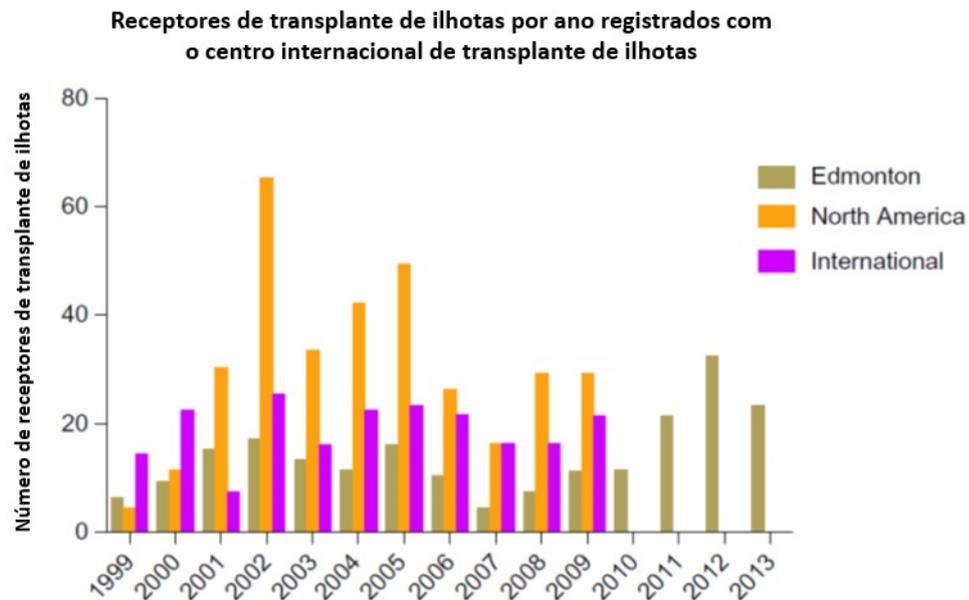


Fig 2. Dados sobre o transplante de ilhotas registrado pelo CITR. Número de receptores de transplante de ilhotas entre 1999-2013 realizados nos centros de transplante em Edmonton, América do Norte e Internacional. (Fonte: Adaptado de BRUNI et al., 2014).

Apesar dos pontos fortes destes estudos, incluindo a maior coleção de transplante de ilhotas já relatado, ainda existem limitações para esta técnica. Estima-se que até 70% da massa de células β -transplantadas podem ser destruídas no início do período pós-transplante (RYAN et al., 2005). Outra limitação decorre da remoção enzimática das ilhotas da matriz pancreática durante o isolamento. Este processo rompe as conexões entre a vascularização das ilhotas e a circulação sistêmica, causando a morte de um número significativo de ilhotas nos dias seguintes ao transplante. Esse dano é resultante da ocorrência de vários fatores, mas a isquemia e o fornecimento inadequado de sangue provavelmente contribuem para a morte de ilhotas no período imediato pós-transplante e pode prejudicar a sobrevivência e função das ilhotas a longo prazo (BALLIAN & BRUNICARDI, 2007).

1.4 Células Tronco Mesenquimais: Aspectos moleculares, características funcionais *in vitro* e emprego na terapia celular

A medula óssea adulta contém uma população heterogênea de células, incluindo células hematopoiéticas, macrófagos, eritrócitos, fibroblastos, adipócitos e células endoteliais. Além destas, a medula óssea contém um subtipo de células precursoras não-hematopoiéticas que apresentam como característica principal a multipotencialidade. Estas células são comumente denominadas células-tronco do estroma medular ou Células-Tronco Mesenquimais (CTMs), no inglês [*Mesenchymal Stem Cells (MSCs)*] (SALEM & THIEMERMANN, 2010).

As células-tronco mesenquimais são um grupo de células clonogênicas, presentes no estroma da medula óssea, originadas a partir do folheto germinativo mesodermal, capazes de diferenciação em várias linhagens de células do tipo mesodérmico e possivelmente, mas ainda parte de assunto controverso, em outros tipos celulares não mesodérmicos, como células neurais ou hepatócitos (BYDLOWSKY et al, 2009).

Muitos autores têm questionado se é apropriado designar essa população de células como células “tronco” adultas, uma vez que a capacidade de auto-renovação não pôde ser provada *in vivo* (LINDNER et al., 2010). Sacchetti et al. (2007) adotaram o termo “células estromais” definindo-as como células do tecido conectivo que formam o suporte estrutural no qual as células funcionais do tecido residem.

Inicialmente as CTMs foram nomeadas como precursoras de fibroblastos da medula óssea por Friedenstein et al (1976). Neste trabalho as células aderentes foram descritas como células de aparência heterogênea, mas após algumas passagens enzimáticas, mostravam-se morfologicamente mais homogêneas, delgadas, afiladas, semelhantes a fibroblastos. Eles também demonstraram que essas células se diferenciavam em pequenas colônias, que definiu como Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (CFU-F) que apresentavam depósitos de cálcio e cartilagem (FRIEDENSTEIN et al., 1976).

Na medula óssea, as CTMs são componentes importantes do nicho hematopoiético, contribuindo com o suporte estromal através da sustentação direta do microambiente e com a secreção de fatores parácrinos envolvidos na proliferação, função e diferenciação das Células-Tronco Hematopoiéticas (CTHs) (MEIRELLES et

al., 2008). Constituem uma população rara na medula óssea, cuja frequência varia entre 0,01% a 0,0001% do total de células nucleadas. Apesar da rara presença, estas células podem proliferar efetivamente, mantendo seu caráter de células-tronco *in vitro*. A perda progressiva do potencial de diferenciação devido à senescência ocorre após cerca de 40 duplicações (KRAMPERA et al., 2007).

Segundo a International Society for Cellular Therapy, são três os requisitos mínimos para classificação como CTM. Primeiro com base na sua aderência seletiva à superfície do plástico. Segundo, expressões de marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e ausência de expressão de CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79, CD19 e HLA-DR em mais de 95% das células em cultura. Terceiro é o potencial de diferenciação multilinhagem.

As pesquisas atuais têm explorado extensivamente o potencial de utilização de CTMs em modelos de terapias regenerativas, sendo mais de 200 ensaios clínicos baseados em terapias utilizando CTMs realizados ou em andamento como listado pelo Instituto Nacional de saúde (NIH, do inglês National Institute of health dos EUA) (IKEBE & SUZUKI, 2014). Diferentes fontes de obtenção de CTMs vêm sendo utilizadas na terapia celular. Daltro et al. (2015) publicou que CTMs derivadas da medula óssea de pacientes falciformes apresentavam inalterados a expressão do conjunto de marcadores de superfície celular fenotípicos de população mesenquimal, o potencial osteogênico e a capacidade de secretar citocinas e fatores de crescimento envolvidos no reparo tecidual. Entretanto, nem todas as CTMs apresentam papel pró-angiogênico. Clarkin et al. (2013) demonstraram que uma população de CTMs expandidas de ilhotas de humanos interrompe as propriedades pró angiogênicas e inibe a sobrevivência de células endoteliais microvasculares das ilhotas humanas e de camundongos através do aumento da fosforilação de Smad-2, uma proteína pró apoptótica.

A multipotencialidade e a facilidade de isolamento e expansão em cultura das CTMs, suas propriedades imunomodulatórias, capacidade de migração e secreção de fatores tróficos, torna-as importante alvo para o tratamento de diversas doenças autoimunes e um instrumento na medicina regenerativa. Numerosos estudos pré-clínicos têm estabelecido o potencial terapêutico de CTMs no engenheiramento de tecidos e na liberação de fatores proteicos e citocinas que vão atuar na recuperação de uma lesão.

1.5 Influência da hipóxia sobre o comportamento angiogênico das CTMs

A concentração de O_2 na medula óssea onde residem as CTMs é de 2-7% em condições fisiológicas normais. Acredita-se que as CTMs estejam localizadas em nichos perivasculars próximo a estrutura vascular de quase todos os tecidos (CRISAN et al., 2008). CTMs são cultivadas *in vitro* em ambientes onde a concentração de O_2 gira em torno de 21%, o que torna sua atividade secretória inadequada (J. LIU et al., 2015). A hipóxia têm um forte efeito sobre vários aspectos da biologia celular, tais como, metabolismo, angiogênese e imunidade inata, estes efeitos são geralmente mediados por fatores indutores de hipóxia (HIFs) (MAJMUNDAR et al., 2010).

O HIF1 é uma molécula heterodimérica, composta por duas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β , sendo a primeira altamente responsiva e estabilizada pela hipóxia. Sob baixas tensões de oxigênio, o HIF-1 α se acumula no citoplasma e posteriormente é translocado para o núcleo celular, onde sofre dimerização com a subunidade HIF-1 β . Esse dímero é responsável pela ativação dos diversos genes responsivos à hipóxia, tais como produtores das proteínas envolvidas na maturação celular (eritropoietina e transferrina), metabolismo energético (transportador de glicose 1 e 3), proliferação, viabilidade celular (IGF e p21) e angiogênese (VEGF e endotelina-1) (figura.3) (WAN et al., 2010).

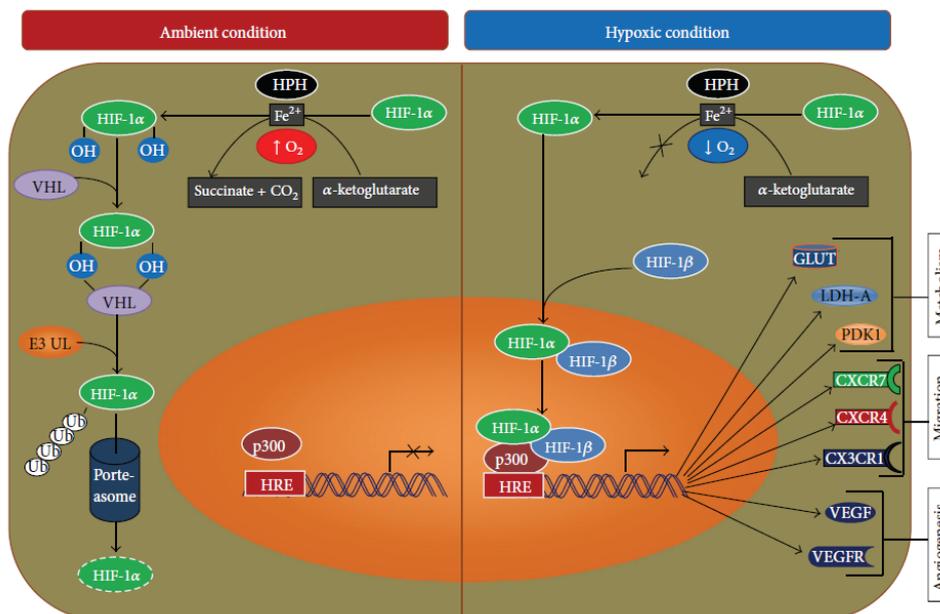


Fig 3. Regulação da transcrição por HIF-1 em condições ambiente e de hipóxia. Fonte : (HAQUE et al., 2013).

Estudos comprovam que o pré condicionamento da CTMs a um ambiente de hipóxia é fundamental para uma resposta angiogênica mais robusta. Griffith & George (2009) demonstraram em seu trabalho um aumento de expressão de VEGF e b-FGF pelas CTMs em resposta a um ambiente de hipóxia e também que a maior secreção destes fatores contribuiu para a formação de tubos em células endoteliais expostas a estes fatores (figura.4).

Os processos de neovascularização e angiogênese são regulados por um grande número de fatores de crescimento endoteliais, incluindo VEGF e b-FGF. Além disso, condições patológicas, tais como isquemia, induzem a liberação destes fatores a partir de CTMs, conduzindo a formação de novos vasos. VEGF é um importante fator angiogênico que promove a proliferação e migração de células endoteliais e a manutenção da vasculatura dos vasos, atuando sinergicamente com uma proteína denominada angiopoietina. VEGF afeta a formação inicial do vaso sanguíneo e promove a geração de uma rede vascular primitiva, enquanto a angiopoietina atua sobre as alterações subsequentes da remodelação vascular e promove a formação de vasos maduros e a estrutura espacial da rede vascular (J. LIU et al., 2015).

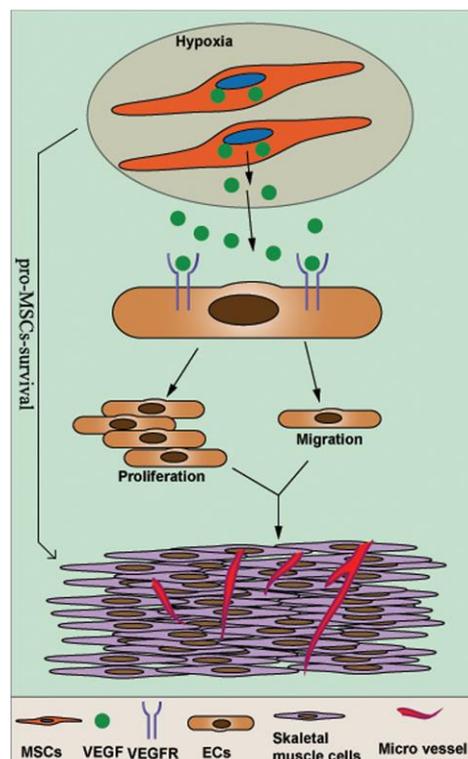


Fig 4. Ação de fatores tróficos sobre as células endoteliais. Pré-condicionamento de CTMs a hipóxia acarretando aumento da proliferação e migração de células endoteliais e conseqüentemente a angiogênese no tecido. Fonte: (LIU et al, 2015).

1.6 Potencial angiogênico de CTMs e sua utilização no transplante de ilhotas

As ilhotas pancreáticas são bem vascularizadas ao longo da vida, essa característica é de extrema importância para a secreção de insulina rapidamente em resposta a mudanças nos níveis de glicose sanguínea. Embora as ilhotas compreendam apenas 1-2% da massa pancreática, elas recebem 5-10% do fluxo sanguíneo pancreático. Durante o isolamento de ilhotas ocorrem o rompimento de conexões entre a vasculatura da ilhota e circulação sistêmica onde o reestabelecimento do fluxo sanguíneo a ilhota transplantada requer vários dias. A revascularização rápida e adequada das ilhotas transplantadas é fundamental para sobrevivência e função das ilhotas (SORDI & PIEMONTE, 2010).

Recentemente, foi descrito em modelos animais que as CTMs derivadas da medula óssea são capazes de aumentar a sobrevivência e função dos enxertos de ilhotas através do aumento da revascularização (ITO et al., 2010). O grupo de Figliuzzi et al. (2014), mostrou que CTMs de medula óssea expressam níveis elevados de VEGF e o transplante dessas CTMs induziu uma resposta angiogênica robusta no hospedeiro, levando a neovascularização de enxertos de ilhotas singênicas em ratos diabéticos. Outra pesquisa complementar relatou que o co-cultivo de CTMs e ilhotas pancreáticas de camundongos sem contato direto célula-célula acarreta um aumento na viabilidade da ilhota e função secretora de insulina devido a fatores tróficos encontrados no sobrenadante de cultivo de CTMs (HGF, IL-6, TGF- β e VEGF-A), além de aumentar a migração e revascularização de células endoteliais intra ilhotas (FUGGLE et al., 2010).

Bell et al. (2012), realizaram um trabalho no qual o transplante de ilhotas em camundongos diabéticos foi realizado conjuntamente com células progenitoras do cordão umbilical e medula óssea previamente co-cultivadas, observando um aumento na massa de células β e revascularização do tecido decorrente do aumento de expressão de receptor EGF, metaloproteínases e TGF- β . O estudo experimental em camundongos diabéticos revelou que a co-cultura de contato direto entre CTMs e ilhotas pode aumentar a secreção de VEGF pelas ilhotas comparadas com ilhotas cultivadas sozinhas ou cultivadas sem contato direto com CTMs, potencialmente aumentando a massa e função das células β durante o período pré-transplante, pós transplante ou até em ambos os períodos (RACKHAM et al., 2013). O transplante de ilhotas por via intramuscular em camundongos desenvolvido por Fransson et al.

(2015) apontou que a presença de CTMs resultou na redução da fibrose e na migração de células endoteliais para regiões periféricas das ilhotas aumentando a revascularização. No modelo de interação entre CTM-ilhotas complexadas em esferoides, Shin et al. (2015) observaram uma redução na apoptose das ilhotas pós transplante, juntamente com o aumento na secreção de insulina e vascularização das ilhotas. O estudo mais recente elucidando esta interação revelou que o transplante de CTM-MO-ilhotas de camundongos promoveu a angiogênese através da diferenciação das CTMs em células endoteliais vasculares e células vasculares de músculo liso (CAO et al., 2016).

Outra evidência da superexpressão de fatores pró angiogênicos por CTMs contribuindo para a eficácia do transplante de ilhotas foi consolidado em um estudo experimental no qual CTMs derivadas de medula óssea humana foram modificadas geneticamente para superexpressão de VEGF e antagonista do receptor de IL-1 e co-cultivadas com ilhotas humanas para posterior co-transplante na capsula renal de camundongos, o resultado obtido foi então uma melhoria no controle glicêmico, através do aumento da viabilidade e revascularização das ilhotas (MUNDRA et al., 2013).

Apesar destes resultados concisos indicando o potencial angiogênico das CTMs, já se sabe que nem todas as CTMs apresentam um efeito benéfico sobre as células endoteliais ou sobre a secreção de insulina em ilhotas. Se for verdade então que as CTMs aumentam a viabilidade/funcionalidade das ilhotas pancreáticas através do aumento da vascularização, quais os mecanismos envolvidos?

Duas alternativas não mutuamente exclusivas justificam o papel das CTMs visando aumentar a re-vascularização de ilhotas pancreáticas. A primeira alternativa considera que o co-cultivo de CTMs com ilhotas pancreáticas aumentaria a viabilidade de células endoteliais presente no tecido enxertado e assim aumentariam a angiogênese intra-ilhota e as chances de recirculação nos microcapilares já presentes na ilhota transplantada. A segunda alternativa sustenta que as CTMs seriam capazes de secretar fatores que induziriam a atração e invasão de vasos sanguíneos do hospedeiro, garantindo a revascularização do tecido transplantado (NYQVIST et al., 2011; LASCHKE & MENGER, 2012).

Em favor da primeira alternativa, a literatura descreve que ilhotas pancreáticas recém isoladas contêm células endoteliais e capilares sanguíneos capazes de formar

vasos sanguíneos funcionais (NYQVIST et al., 2011), mas que o número destas células endoteliais reduz 95% após 4 dias de cultivo (NYQVIST et al., 2005). Embora o mecanismo de desaparecimento das células endoteliais não tenha sido investigado nestes artigos, a presença de fatores pró-mitóticos (VEGF, FGF, entre outros) reduziu o desaparecimento das células endoteliais e melhorou a viabilidade/funcionalidade das ilhotas transplantadas. Portanto, a manutenção da viabilidade destas células é um alvo potencial para promover a revascularização da ilhota e sua função após transplante. O uso de CTMs diretamente ou através de meio condicionado de CTM seria importante para manter a viabilidade e manutenção do fenótipo das células endoteliais na ilhota após o período de cultivo.

Os relatos atuais indicam que as células endoteliais intra ilhotas contribuem para o processo de revascularização dos enxertos de ilhota quando transplantados, sendo a preservação destas células endoteliais pós-transplante fundamental para manutenção da sobrevivência e viabilidade das ilhotas (KING et al., 2015). Esses resultados podem ser interpretados com base na comunicação dos pericitos (células encontradas na membrana vascular basal, possivelmente de origem mesenquimal) com as células endoteliais e o papel que a interação molecular entre estes dois tipos celulares acarreta no processo de formação de uma microvasculatura (ARMULIK et al., 2011; NEWMAN et al., 2013).

A interação coordenada de pericitos e células endoteliais atuando sobre o remodelamento vascular é mediada por várias moléculas. Angiopietina -1 é expressa por células mesenquimais perivasculares e atua sobre o receptor Tie-2 expresso em células endoteliais promovendo a estabilização dos vasos recém-formados pelo recrutamento de pericitos. PDGF-B é expresso por células endoteliais em brotos angiogênicos e estimula a migração e proliferação do receptor de PDGF-B expresso em pericitos. Pericitos também estão envolvidos na expressão de VEGF um mitógeno endotelial que desempenha papel ativo na angiogênese e potencializa a sobrevivência e estabilidade de células endoteliais em microvassos (GEEVARGHESE & HERMAN, 2014).

Dados recentes também têm demonstrado que a expressão de HGF em níveis elevados por pericitos e fibroblastos estimula o brotamento de células endoteliais em modelos esferóides *in vitro* (CHANG et al., 2013). Portanto, inúmeros fatores potencialmente produzidos pelas CTMs estariam envolvidos com a manutenção da

viabilidade das células endoteliais na ilhota transplantada. No entanto, quais destes fatores são produzidos pelas CTMs de medula óssea e estão envolvidos com as células endoteliais em ilhotas pancreáticas humanas é totalmente desconhecido.

A segunda alternativa baseia-se na inosculação de redes vasculares pré-formadas dentro do tecido implantado no hospedeiro com a microvasculatura (LASCHKE & MENGER, 2012). As ilhotas pancreáticas transplantadas são revascularizadas pelos vasos sanguíneos do hospedeiro que crescem na direção das ilhotas do doador através do mecanismo de angiogênese, independente de sinalização via receptor de VEGF (VAJKOCZY et al., 1995). Fatores secretados/elementos de matriz produzidos pelas CTMs associadas diretamente com as ilhotas transplantadas seriam importantes para estimular o brotamento de vasos no hospedeiro e inosculação com os vasos da ilhota transplantada (WITTIG et al., 2013).

O artigo publicado por Li et al. (2015), mostrou que a co-cultura in vitro de CTMs e células endoteliais durante 24 horas, resulta na expressão diferencial pelas CTMs de IL-1 β e IL-6, citocinas responsáveis por ativar a família das proteínas NF- κ B, as quais sinalizam a transcrição de uma série de genes, quimiocinas, receptores de superfície e moléculas que podem promover a angiogênese in vivo e in vitro. O ensaio in vitro no qual CTMs humanas isoladas de medula óssea e tecido adiposo foram expandidas em um arcabouço de colágeno e implantadas em membranas corialantóides de frangos, demonstraram a expressão de vários fatores pró angiogênicos, destacando-se a expressão de PDGF-AA que atua como um importante fator migratório e estimula a expressão de fatores pró-angiogênicos secundários (EDWARDS et al., 2014).

Nesse contexto as CTMs surgem como uma abordagem pertinente devido a capacidade de secretar fatores anti apoptóticos (IGF-1, TGF- β , IL-6) e reguladores da angiogênese (pró/anti-angiogênicos (VEGF-A, PDGF, HGF, Ang-1, THBS1, entre outros) (MAUMUS et al., 2013). Portanto, um grande repertório de fatores secretados pelas CTMs pode ter papel na inosculação dos vasos do hospedeiro com a ilhota transplantada, no entanto, quais destes fatores são produzidos pelas CTMs de medula óssea e como eles induzem o brotamento nos vasos do hospedeiro ainda é pouco estudado.

1.7 Meio condicionado de Células Tronco Mesenquimais

Os estudos reportando o efeito benéfico da terapia regenerativa utilizando células tronco têm revelado que os fatores secretados por estas células podem promover reparo em várias condições que envolvam dano ao órgão ou tecido. Estes fatores solúveis compostos por fatores protéicos, microvesículas e exossomas podem ser encontrados no meio onde as células são cultivadas, sendo assim denominado meio condicionado (H. O. KIM et al., 2013). A aplicação do meio condicionado apresenta várias vantagens comparado ao uso de células tronco. O meio condicionado pode ser congelado, liofilizado e transportado mais facilmente. Além disso, uma vez que é desprovido de células não se faz necessários avaliações prévias entre doadores e receptores afim de se evitar a rejeição imune, sendo portanto, uma alternativa promissora para ser utilizado como fármaco na medicina regenerativa (PAWITAN, 2014).

O meio condicionado pode ser produzido a partir do cultivo celular em normóxia (20-21% de pO₂) ou hipóxia (0,5% - 5% pO₂). Vários estudos utilizando células tronco revelam que a maioria dos fatores de crescimento são supra-regulados em condições de hipóxia, tais como VEGF (C.-P. CHANG et al., 2013; CHEN et al., 2014) PDGF (DI SANTO et al., 2009) e HGF (OSKOWITZ et al., 2011; KANG et al., 2014). O meio condicionado também é composto por diversas citocinas pró inflamatórias (IL-8, IL-9, IL-1b) e anti inflamatórias (TGFβ1, IL-6, IL-10). Outros fatores secretados são leptina, angiogenina, MCP-1, uPA, trombospondina 1, TIMP-1 e IGFBP, que possuem atividades pró angiogênica, inflamatória e de migração (EDWARDS et al., 2014).

O transplante de ilhotas pancreáticas cultivadas em meio condicionado de CTMs obtidas a partir de sangue de cordão umbilical, revelou regulação dos níveis de glicose sanguínea, ganho de peso corporal e capacidade de tolerância a glicose em camundongos (PARK et al., 2010). Bhang et al.(2013) demonstrou que ilhotas cultivadas em MC hipóxia derivado de CTMs de tecido adiposo apresentaram diminuição na atividade apoptótica e aumento na secreção de insulina.

Para aplicação do meio condicionado em várias doenças humanas é necessário padronizar o método de produção considerando o tipo celular utilizado, número de células, meio de cultura e processamento do meio condicionado. Além disso, faz-se importante analisar o conjunto e concentração dos fatores e citocinas produzidos por diversos tipos de células (PAWITAN, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o potencial angiogênico do meio condicionado de células tronco mesenquimais de medula óssea na manutenção da viabilidade de ilhotas pancreáticas.

2.2 Específicos

- Obter, expandir e caracterizar células tronco mesenquimais (CTMs) isoladas de medula óssea.
- Avaliar o efeito dos meios condicionados sobre a proliferação, viabilidade, migração e angiogênese de células endoteliais humanas (HUVECs).
- Analisar o perfil proteômico do meio condicionado.
- Avaliar a ação do MC na produção de insulina, angiogênese e viabilidade das ilhotas pancreáticas.

3 METODOLOGIA

3.1.1 Amostra biológica e fracionamento para obtenção das células mononucleares

O Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira, (UFBA) aprovou este projeto (número do parecer: 625.059). Amostras de medula óssea foram obtidas a partir de procedimentos cirúrgicos de punção nos pacientes falciformes conduzidos no Complexo-Hospital Universitário Professor Reitor Edgar Santos, na cidade de Salvador-BA. A amostra coletada em tubo cônico contendo heparina sódica (5000 U.I./ml) foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C, para separação do plasma. Em seguida, a amostra foi reconstituída em volume igual, no meio de cultura DMEM Low glicose + 10 % SFB. A suspensão celular foi adicionada lentamente ao polímero de separação Ficoll- Paque™ 1,077g/L (GE Healthcare Bio-sciences AB) e centrifugada a 1000 rpm durante 10 minutos. O Ficoll- Paque™ permite a separação celular por gradiente de densidade. O anel de células mononucleares da medula óssea (CMMO), existente na interface após centrifugação foi separado e lavado uma vez com CMF (88mM de NaCl; 1mM de KCl; 2,4mM de NaHCO₃; 7,5mM de Tris-Cl (pH 7,6)). A suspensão celular total foi novamente centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos e o *pellet* obtido foi ressuspensionado em 6 mL de DMEM Low glicose + 10 % SFB.

3.1.2 Isolamento, cultivo e expansão de células tronco mesenquimais

As CMMO foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, ocorrendo a cada 3-4 dias, a troca do meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose (DMEM Low) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (lote 14/10 CULTILAB), penicilina (100 U/ml) estreptomicina (100 µg/ml) (Gibco®, Invitrogen) e anfotericina (250 µg/ml) (Sigma-Aldrich®). Quando as células adquiriram 80% de confluência, foi realizado o sub-cultivo após 2x lavagens com solução salina CMF e descolamento da monocamada utilizando solução de Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco®, Invitrogen). As culturas foram rotineiramente observadas em microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas) para verificação morfológica das células.

3.1.3 Obtenção, isolamento, cultivo e expansão de HUVECs

As células endoteliais foram isoladas a partir de amostras de cordão umbilical obtidas na Maternidade Climério de Oliveira (UFBA). Todo material coletado foi obtido após autorização das gestantes, através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes e após o parto. O cordão umbilical coletado foi armazenado em recipiente fechado e refrigerado, e então transportado até o laboratório de Imunologia no Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA), ocorrendo a digestão do tecido no prazo máximo de 2 horas após obtenção do material. O protocolo de isolamento foi adaptado de DAVIS, et al., (2007). O cordão umbilical foi lavado com solução de PBS (140 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 10 mM de Na₂HPO₄ e 1,8 mM de KH₂PO₄) para retirar o excesso de sangue. O cordão umbilical foi preenchido com 20 ml de colagenase tipo I 1mg/ml (Sigma-Aldrich®) e incubado a 37°C por 30 minutos. Transcorrido o tempo, o cordão foi ordenhado, a suspensão celular coletada e adicionado 10 mL de Dmem Low + 10% SFB para inativar a enzima. A suspensão foi centrifugada a 1000 RPM por 5 minutos, e o *pellet* formado foi ressuspendido em 5 ml de meio (EGM™ - 2 + fatores) (Lonza, USA), e semeada em garrafas de 25cm² previamente recobertas com 2% de gelatina (G9391, Sigma-Aldrich®). As HUVECs foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura completo (EGM™ -2 + fatores) (Lonza, USA), com 2% SFB e penicilina (100 U/ml) estreptomicina (100 µg/ml) (Gibco®, Invitrogen) foi substituído a cada 2 dias. Estas células foram expandidas após a monocamada apresentar 70% de confluência, e os experimentos foram realizados entre as passagens 2 e 5.

3.1.4 Curva de crescimento populacional, cálculo do tempo de dobramento e número de dobramento populacional total das CTMs

Células tronco mesenquimais de medula óssea entre as passagens 3 a 6, foram submetidas à avaliação de medidas de crescimento populacional por um período de 70 dias. CTM-MO foram cultivadas em placas de 6 poços e tripsinizadas ao atingirem 70% de confluência. A cada etapa de descolamento enzimático utilizando solução de Tripsina-EDTA 0,25%, contou-se o número total de células obtidas na câmara de Neubauer. A cada tripsinização, 1x10⁵ células foram replaqueadas. Este processo foi repetido sucessivamente até o septuagésimo dia. O tempo de dobramento populacional das CTMs foi obtido através da fórmula: **tempo de dobramento =**

duração em dias * log (2) / log (população final) – log (população inicial) (ROTH V, 2006; Acesso disponível em: <http://www.doubling-time.com/compute.php>). O número de dobramento populacional total (NDPT) foi calculado através da fórmula: **NDPT = log (número de células com 100 % confluência/ número de células plaqueadas)/ log(2)** (CHEVALLIER et al., 2010).

3.1.5 Caracterização Imunofenotípica em citômetro de fluxo

A identificação e expressão dos marcadores de superfície das culturas de CTMs foram avaliadas através de ensaios de citometria de fluxo. Para caracterização das CTMs, cerca de 1×10^5 células foram incubadas com diferentes anticorpos conjugados aos fluorocromos PE e FITC. Os anticorpos analisados foram anti-CD105-PE (eBioscience, CA,USA, clone SN6), anti-CD90-FITC (eBioscience, CA, USA, clone 5E10), anti-CD146-PE (BD Pharmigen®, lot 91811) , anti-CD73 PE (EXBIO Praha, a.s., clone AD2), anti-CD29-FITC (eBioscience ,CA, USA, clone TS2/16), anti-CD14 PE (eBioscience, CA,USA, clone 61D3), anti-CD34-FITC (BD, Cat No. 348053), anti-HLA-DR- PE (EXBIO Praha, a.s., clone MEM 10). As células foram tripsinizadas, posteriormente centrifugadas, e o sobrenadante celular obtido foi desprezado. Os tubos com os *pellets* foram incubados com 10ul de cada anticorpo diluído 1:300 em solução salina CMF. As células foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos e foi adicionado 1ml de solução salina CMF suplementado com 3% SFB para redução de ligações inespecífica. Os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em solução salina CMF + 3% SFB submetido à leitura imediata no citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences, CA, EUA) e analisadas no software BD Cell Quest pro software.

3.1.6 Ensaio de multilinhagem celular *in vitro*

A multipotencialidade característica das CTMs foi avaliada em ensaios de conversão osteogênica e adipogênica, *in vitro*, seguindo o protocolo específico já estabelecido na literatura (ZUK et al., 2001).

Para avaliar a diferenciação osteogênica, inicialmente foram plaqueadas 5×10^4 células em triplicatas em placas de 24 poços. Após as células atingirem a confluência parcial, trocou-se o meio de proliferação para o meio indutor osteogênico constituído por DMEM high suplementado com 10%SFB, 0.1µM de Dexametasona (Sigma Aldrich

®, USA), 10 mM de β -Glicerofosfato e 50 μ g/ml de ácido ascórbico-2-fosfato (Sigma Aldrich ®, USA) conforme protocolo adaptado (ZUK et al., 2001). O meio indutor foi substituído a cada 4 dias e a cultura mantida até 21 dias.

No final do período da diferenciação osteogênica, a cultura foi lavada e fixada com paraformaldeído 4%, em seguida coradas com 1% Alizarina Red S (Sigma Aldrich ®, USA) (pH 4,1) que evidencia a deposição da matriz calcificada. O procedimento rotineiramente foi realizado em triplicata e os resultados registrados em imagens fotográficas.

Para avaliar o potencial de diferenciação adipogênica, cerca de 5×10^4 células foram plaqueadas em triplicadas em placa de 24 poços. Após atingirem a semi-confluência, as células foram submetidas ao meio indutor adipogênico (DMEM high glucose 1x, 10% SFB, 1mM dexametasona (Sigma Aldrich ®, USA), 100 μ M indometacina (Sigma Aldrich ®, USA) e 500 μ M IBMX (Sigma Aldrich ®, USA)) preparado conforme protocolo adaptado (ZUK et al., 2001). O meio indutor foi trocado a cada 3 dias, até a conversão satisfatória das CTMs em adipócitos. Após o período de conversão ideal, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% e coradas com uma solução saturada de Oil Red O (Sigma Aldrich ®, USA), para evidenciação das gotículas de gordura presentes na cultura.

3.1.7 Imunofluorescência para detecção de proteínas membranares e de citoesqueleto

Proteínas da matriz extracelular, membrana plasmática e citoesqueleto foram identificadas através de imunofluorescência em culturas de CTMs e HUVECs. Neste ensaio, CTMs entre a terceira e sexta passagens ou HUVECs na terceira passagem cultivadas sob lamínulas, foram fixadas com paraformaldeído 4%, durante 1 hora à 4°C. Após a fixação as células foram lavadas com solução PBS e incubadas por 30 minutos com solução de permeabilização (PBS + 0,3% Triton X-100) à temperatura ambiente. Posteriormente as células foram incubadas com solução de bloqueio (PBS + 3% BSA) por 30 minutos e ao fim deste intervalo, os anticorpos primários foram diluídos na mesma solução de bloqueio e incubados *overnight* à 4°C com ausência de luz. Após incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas com solução PBS três vezes, 10 minutos cada, e incubadas por 2 horas à 37 °C ao abrigo da luz, com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo e com DAPI para

visualização dos núcleos, diluídos na solução de bloqueio. Posteriormente, para montagem das lâminas adicionou-se 10 μ l do meio de montagem (*Dako Faramount Aqueous Mounting Medium*, S3025) e as lamínulas foram colocadas invertidas sob a gota.

Anticorpo	Classe	Fornecedor	Diluição
Primário policlonal anti-colágeno IV	IgG de Coelho	abcam, ab6586	1:200
Primário monoclonal anti- α actina de músculo liso	IgG de Camundongo	VECTOR, VP-S281	1:200
Primário monoclonal anti- proteoglicano de sulfato de condroitina NG2	IgG de Camundongo	Chemicon, MAB5384	1:200
Primário monoclonal anti – receptor β de PDGF	IgG de Cabra	R&D Systems, AF385	1:200
Primário monoclonal anti- PECAM-1/CD31 humano	IgG de Camundongo	R & D Systems, Clone #9G11	1:300
Secundário conjugado com Alexa Fluor 488	IgG de Coelho	Thermo Fisher Scientific	1:2000
Secundário conjugado com Alexa Fluor 488	IgG de Cabra	Thermo Fisher Scientific	1:2000
Secundário conjugado com Alexa Fluor 594	IgG de Camundongo	Thermo Fisher Scientific	1:2000

Tabela 1. Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados na imunofluorescência.

3.1.8 Preparo de meio condicionado das CTM

Para o preparo do meio condicionado (MC) as CTMs foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂, até a confluência. O meio de cultivo foi descartado, e um novo meio constituído por EGM™-2 + 3% BSA (Sigma-Aldrich®) e penicilina (100 U/ml) estreptomomicina (100 μ g/ml) (Gibco®, Invitrogen) foi adicionado. Este meio foi denominado meio incompleto por ser um meio isento de SFB (EDWARDS et al., 2014). As CTMs foram cultivadas em garrafas T25 durante 48 horas nas condições hipóxia (aproximadamente 5% de pO₂) a 37 °C no interior de um dissecador hermeticamente vedado utilizando um gerador de anaerobiose e fita indicadora de baixa pressão de O₂ (Probac do Brasil). As CTMs cultivadas em normóxia foram acondicionadas a pressão atmosférica ambiente (aproximadamente 21% pO₂) a 37°C. Após 48h, o meio condicionado foi recolhido e centrifugado a 1200 rpm/8min, sendo congelado a - 20°C para uso posterior (SILVEIRA, R. et al., 2010).

3.1.9 Dosagem de proteínas totais

Esta técnica foi utilizada para padronização do meio condicionado. O método utilizado foi o de Lowry modificado, utilizando o reagente de Folin Ciocalteau (F9252, Sigma-Aldrich®) (HARTREE, 1972). O complexo de cor azul formado foi medido por um espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific) utilizando o comprimento de onda de 660nm. Albumina sérica bovina a 1% (A9418, Sigma-Aldrich®) foi utilizada para a elaboração da curva padrão.

3.2.1 Dosagem de Fosfatase Alcalina

Esta técnica foi utilizada para quantificar a enzima fosfatase alcalina no meio condicionado. 50ul do meio condicionado foi adicionado a 100ul de p-Nitrofenilfosfato (N7653-100MI, Sigma-Aldrich®) e incubado em banho-maria 37C°/30min. A solução foi analisada através do espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific), e o comprimento de onda no valor de 405 nm foi utilizado para detecção (SIGMA, 2002).

3.2.2 Coloração de CTMs com Calceína-AM

Esta técnica foi utilizada para avaliação da viabilidade celular de CTM após preparo do meio condicionado com o kit para detecção de calceína-AM (Life Technologies, Cat# C3100MP). A conversão do acetóxi-metil-éster de calceína - um diéster fluorogênico que ultrapassa, de forma passiva, a membrana celular – em calceína, análogo impermeável e de fluorescência verde, por enzimas esterases foi utilizado como indicativo da integridade celular (NERI et al., 2001; FLANAGAN PRODUKTE, 2003). As células foram lavadas 3x com CMF e incubadas com calceína-AM (diluição 1:500) em CMF. Após 30 minutos de reação, em ambiente isento de luz, analisou-se a detecção da calceína nas CTMs por microscopia de fluorescência Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas). Os dados foram apresentados na forma de gráfico através do cálculo **fluorescência celular total corrigida = densidade integrada – (área selecionada x média de fluorescência de leitura dos backgrounds)** (MCCLOY et al., 2014).

3.2.3 Ensaio *in vitro* de migração celular das HUVECs (modelo Scratch Assay)

A capacidade migratória das HUVECs foi avaliada através do ensaio *in vitro* de cicatrização de lesão na monocamada. HUVECs foram semeadas em placas de 24

poços (5×10^4 céls/poço) e cultivadas em meio (EGM™ -2 + fatores) (Lonza, USA) com 2% SFB e penicilina (100 U/ml) estreptomomicina (100 µg/ml) até a monocamada atingir 80% de confluência. A lesão na monocamada foi feita com o auxílio da ponta de uma ponteira de 200 µL. O meio de cultura foi então substituído por uma das seguintes condições: A) 500 µL do MC normóxia; B) 500 µl do MC hipóxia; C) 500 µL do meio completo EGM™ -2 + fatores, com 2% SFB e penicilina (100 U/ml) estreptomomicina (100 µg/ml); D) 500 µL do meio incompleto EGM™-2 + 3% BSA . Imagens foram registradas no microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas) no momento inicial e após 18 hrs no local da lesão. A quantificação da migração das células endoteliais, foi realizado através do cálculo percentual da área regenerada após o período de 18 horas, utilizando a equação: **% área recuperada = (Área inicial - Área final) / Área inicial**, utilizando o software ImageJ do NIH (do inglês *National Institutes of Health*) (LIANG et al., 2007).

3.2.4 Ensaio *in vitro* de detecção de TUNEL em HUVECs

O ensaio de TUNEL (do inglês, Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) foi utilizado como indicador de apoptose em HUVECs (KYRYLKOVA et al., 2012). Neste ensaio os núcleos apoptóticos, os quais apresentam fragmentação de DNA são revelados em verde pela ligação da enzima deoxinucleotídeo terminal transferase (TdT) acoplada com um fluoróforo e o marcador nuclear utilizado foi o iodeto de propídeo, evidenciando os núcleos em vermelho. A apoptose em HUVECs foi avaliada por 24hs em meio de cultivo EGM™- 2 + 3% BSA penicilina (100 U/ml) estreptomomicina (100 µg/ml) (ausência de fatores de crescimento), conforme descrito por (LEE et al., 2005). Alternativamente, as HUVECs foram tratadas com meio completo EGM™ -2 + fatores, com 2% SFB e penicilina (100 U/ml) estreptomomicina (100 µg/ml); meio condicionado normóxia; meio condicionado hipóxia. Após cultivo, as HUVECs foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos. Em seguida foram permeabilizadas em solução (0,1% Triton-X-100; 0,1% citrato de sódio) por 5 minutos e incubadas com (50 µl da enzima TdT (deoxinucleotídeo terminal transferase) + 450 µl do mix de nucleotídeos marcados com fluoresceína) utilizando o Kit (*In situ* Cell Death detection kit, Fluorescein; Roche) por 1 hora a 37°C em ambiente escuro. Os núcleos totais foram marcados com o corante iodeto de propídeo. Imagens foram registradas no microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc.,

Americas). Análise quantitativa foi realizada, mensurando a porcentagem de células apoptóticas.

3.2.5 Ensaio *in vitro* de detecção de BrdU em HUVECs

A capacidade proliferativa das HUVECs foi avaliada pelo ensaio de incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). Células foram sincronizadas em meio com 0,5% SFB. Depois incubadas em 4 diferentes condições: Na presença do meio completo, EGM™ -2 + fatores com 2% SFB e penicilina (100 U/ml) estreptomicina (100 µg/ml); meio incompleto (EGM™-2 + 3% BSA) penicilina (100 U/ml) estreptomicina (100 µg/ml); MC normóxia e MC hipóxia. O BrdU é um nucleosídeo sintético análogo da timidina, que é incorporado durante a síntese de DNA. O BrdU foi adicionado à cultura durante um período de 24hrs, e identificado por imunofluorescência com anticorpo monoclonal de camundongo anti-Bromodeoxiuridina humana (VECTOR, VP-B209) diluído 1:200, anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado (Alexa Fluor 488, diluição: 1:2000) e com DAPI para visualização dos núcleos. Imagens foram capturadas utilizando o microscópio de fluorescência Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas). Análise quantitativa foi realizada mensurando a porcentagem de células que incorporaram o BrdU.

3.2.6 Ensaio *in vitro* de tubulogênese das HUVECs

Os ensaios *in vitro* de tubulogênese seguiram o protocolo descrito por Nakatsu & Hughes, (2008). Neste ensaio, a monocamada de HUVECs foi tripsinizada e misturada com 2500 microesferas com colágeno na superfície, em um tubo cônico contendo meio EGM-2 + fatores e 10 % SFB. Após 24 horas de contato, as HUVECs revestiram toda a superfície da microesfera. O preparo do gel foi realizado dissolvendo 3 mg/ml de fibrinogênio (F3879, Sigma-Aldrich®) em meio EGM-2 sem SFB. As microesferas revestidas foram contadas a fim de se obter uma concentração de 500 microesferas/ml, antes de serem adicionadas a solução de fibrinogênio no tubo cônico. Foi adicionado 0,15 U/ml de aprotinina (A3428, Sigma-Aldrich®) a solução de fibrinogênio contendo as microesferas revestidas com HUVECs. Posteriormente, adicionou-se em cada poço de uma placa de 24 poços, 0,625 U/ml de trombina (T4648, Sigma-Aldrich®). Ao final a solução de fibrinogênio/aprotina contendo as

microesferas foi adicionada aos poços e misturada com a solução de trombina, resultando na polimerização do gel.

Após a polimerização, foi adicionado sobre a superfície do gel as seguintes soluções: A) 500 μ L do MC normóxia; B) 500 μ L do MC hipóxia; C) 500 μ L do meio completo EGM™ -2 + fatores, com 2% SFB e penicilina (100 U/ml) estreptomicina (100 μ g/ml); D) 500 μ L do meio incompleto EGM™-2 + 3% BSA. Imagens do comprimento e e número de tubos foram registradas utilizando o microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas) após 4 dias de cultivo. Este ensaio permitiu avaliar o efeito de fatores estimuladores ou inibitórios da tubulogênese secretados pelas CTMs.

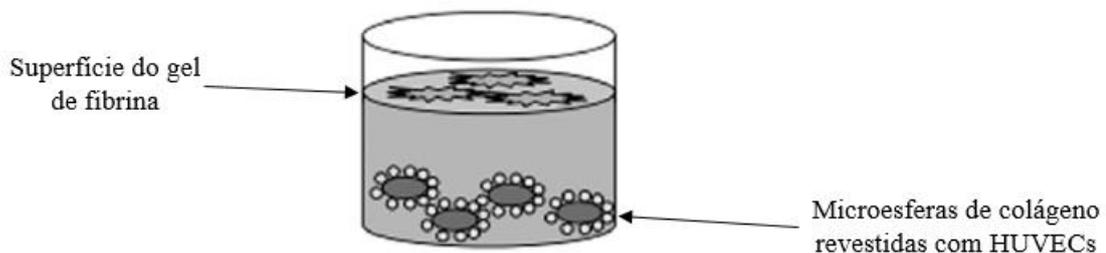


Fig 5. Ensaio de angiogênese *in vitro*. Ilustração esquemática de microesferas de colágeno cobertas com HUVECs embebidas em um gel de fibrina. Fonte: (Adaptado de Nakatsu & Hughes, 2008).

3.2.7 Detecção de p-AkT e AkT por Western Blot

A técnica de Western Blot foi realizada para detectar a expressão de p-AkT e AkT seguindo o protocolo descrito em Derakhshan et al., (2008). Monocamada de HUVECs em placas de 6 poços (90% de confluência) foram incubadas com meio 0.5% SFB overnight (12-16 h). Após, as HUVECs (3 poços) foram incubadas nas seguintes condições por 0, 5 ou 30 min: A) Meio controle (EGM™-2 + 3% BSA); B) MC normóxia; C) MC hipóxia. O meio foi aspirado, e as células lisadas com tampão RIPA (Tris-HCl 10 mM, pH=7,4; EDTA 5 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 1%; deoxicolato de sódio 1%; SDS 0,1%; aprotinina 1% e Na₃VO₄ 0,1mM) contendo coquetel de inibidores de protease (P8340, Sigma-Aldrich®). Os lisados foram centrifugados a 13.000 rpm para eliminar o material insolúvel e congelados. As amostras foram liofilizadas antes de serem aplicadas no gel de poliácridamida 10%. As concentrações de proteína totais foram quantificadas para o Western blot.

O preparo das amostras para aplicação no gel foi feito por meio da adição de 100 µg de proteína / poço reconstituído em 8 µL do tampão de amostra (solução 1M Tris.HCl pH 6,8, SDS 4%, Glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,2%) seguido de aquecimento a 100°C por 5 minutos. Os 40 µL das amostras e 4 µL do marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BIO-RAD) foram aplicados ao gel de poliacrilamida e submetidos a eletroforese em tampão Tris-Glicina (pH 8,3).

Após o término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF, utilizando o dispositivo de transferência a seco de segunda geração (iBlot® 2 Dry Blotting System, Thermo Scientific™). Após a transferência a membrana foi bloqueada por 3 horas em solução PBS 0,1% Tween (PBS-T) com 5% de leite desnatado. Na sequência, a membrana foi incubada *overnight* (12 horas) com o anticorpo primário monoclonal de coelho anti-pAkt. Posteriormente a membrana foi lavada com PBS-T por 3 vezes e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário. Posteriormente, após algumas etapas de lavagem foi realizado o *stripping* a frio da membrana de PVDF com a solução de *stripping* (25 mM de glicina, 1% SDS, Tris HCl pH 6,8) por 30 minutos, e posteriormente 4 lavagens com PBS-T. A membrana foi bloqueada novamente por 3 horas em solução PBS 0,1% Tween (PBS-T) com 5% de leite desnatado e depois foi incubada *overnight* (12 horas) com o anticorpo primário monoclonal de coelho anti-AkT. Posteriormente a membrana foi lavada com PBS-T por 3 vezes e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário. Após algumas etapas de lavagens subsequentes, a membrana foi imersa em solução quimioluminescente de revelação (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat, Merckmillipore) e as bandas foram detectadas utilizando o fotodocumentador (Alliance 4.7, Uvitec Cambridge). As bandas detectadas por quimioluminescência foram quantificadas pela densitometria da p-AkT e AkT, através do cálculo, **fluorescência celular total corrigida = densidade integrada – (área selecionada x média de fluorescência de leitura dos *backgrounds*)** (MCCLOY et al., 2014), utilizando o software Image J (NIH, EUA).

Anticorpo	Classe	Fornecedor	Diluição
Primário monoclonal de coelho anti-pAkt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb #4060	IgG	Cell Signaling Technology®	1:500

Primário monoclonal de coelho anti-AkT (Akt Antibody #9272)	IgG	Cell Signaling Technology®	1:500
Secundário monoclonal de cabra anti IgG de coelho acoplado com peroxidase PI1000	IgG	Vector Laboratories	1:1000

Tabela 2. Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados no western blot.

3.2.8 qRT-PCR

Foram avaliados também os níveis de expressão de transcrito dos seguintes genes: IL8, HGF, NRG1, Bigh3, Pcolce, THBS, vWF, PDGFr, VEGF, SDF1, Ang1, FGF1, Col4, Eng, MCAM, CD90, KDR, FLT1, PPAR, Col1a, SPARC e MMP2. O RNA total das culturas primárias de CTMs em normóxia e hipóxia utilizadas neste trabalho foi isolado utilizando-se colunas de sílica e metodologia disponibilizados pelo RNAspin Mini-kit (GE, Healthcare/ Lot: SPI001443). A concentração do RNA preparado foi determinada através da quantificação em espectrofotômetro (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies). Para tanto, determinou-se a absorbância das preparações a 260nm, considerando-se a correspondência entre uma unidade de absorbância neste comprimento de onda e a concentração de 60 ng/uL de RNA. O grau de pureza do RNA foi estimado pela relação Abs260nm/Abs280nm, tendo-se como pureza satisfatória uma relação próxima de 2,0. A síntese de cDNA foi feita em reações de transcrição reversa pela enzima Super script III (Fermentas) com as amostras de RNA purificadas. A identificação e quantificação dos produtos de c-DNA formados foi pela reação de qRT-PCR quantitativo utilizando-se o corante SYBR® Green Master Mix (A&B, Lot: 1503124) e como molde 3uL do cDNA sintetizado. Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em triplicata, no termociclador Vii7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o gene GAPDH como controle endógeno. Considerando que todos os primers apresentaram eficiência maior que 80%, os resultados foram alcançados utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (PFAFF, 2004). As sequências dos primers foram obtidas a partir de consulta no banco de dados da Primer Bank Havard (acesso disponível em: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) e da Primer Blast (acesso disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Gene	Forward 5'->3'	Reverse 5'->3'
ANG1	GTCAATGGGGGAGGTTGGACTGTA	AGCCAATATTCACCGGAGGGATTT
BIGH3	CATCAGCTACGAGTGCTGTC	GTGTACAGCTGAGTGGTGGT
FGF1	GATGGGACAAGGGACAGGAG	CGTATAAAAGCCCGTCGGTG

HGF	GCCTCTGGTTCCCCTTCAAT	GCTGCGTCCTTTACCAATGA
II-8	CAGGAAGAAACCACCGGAAG	TCTTTAGCACTCCTTGGCAAAA
NRG-1	GGGAGTGCTTCATGGTGAAA	TTACGTAGTTTTGGCAGCGA
PCOLCE	GGAGTGCATCTGGACCATAAC	GAAGACTCGGAATGAGAGGGA
FLT1	CGGGGATTTCACTGTACATCT	AAGCAAACCACACTGGCTTC
SDF-1	ATGAACGCCAAGGTCGTG	GGCTTTCGAAGAATCGGCAT
SPARC	GCTGGATGAGAACAACACCC	GCAGGAAGAGTCGAAGGTCT
MCAM	ACTTCCACCTCCACCAGCTC	GTCTGCGCCTTCTTGCTC
ENG	CTGAGGACCAGAAGCACCTC	TCCATGTCCTCTTCTGGAG
KDR	CGGCTCTTTGCTTACTGTT	CCTGTATGGAGGAGGAGGAA
THBS	TTGCCACAGCTCGTAGAACA	CAATGCCACAGTTCCTGATG
vWF	TTTCCCAGAGGAGATGTTG	TCGGACCCTTATGACTTTGC
COL1A	CACACGTCTCGGTCATGGTA	AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG
PDGFr	AGCACCTTCGTTCTGACCTG	TATTCTCCCGTGTCTAGCCCA
VEGF	GAGGAGCAGTTACGGTCTGTG	TCCTTTCTTAGCTGACACTTGT
COL4	AGATAAGGGTCCAACCTGGTGT	ACCTTTAACGGCACCTAAAATGA
CD90	CATCTGCGAGTGTGGTGTCT	CCCACCATCCCCTACTACC
PPAR	GATGCCAGCGACTTTGACTC	ACCCACGTCATCTTCAGGGA
MMP2	AGCTCCCGGAAAAGATTGATG	CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGA	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

Tabela 3. Lista das sequências forward e reverse dos primers utilizados .

3.2.9 Perfil proteômico do meio condicionado: Identificação de fatores secretados pelas CTMs

Foi investigado no meio condicionado de CTMs a presença de fatores proteicos angiogênicos. Uma membrana (kit array) para detecção de fatores de angiogênese humana (Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit, R & D Systems, Inc) foi utilizada de acordo com as instruções do fabricante. Foi avaliado cerca de 1 mL de meio condicionado ou 200 µg de proteínas totais. Os fatores foram detectados por quimioluminescência aumentada e quantificados por densitometria através do cálculo, **fluorescência celular total corrigida = densidade integrada – (área selecionada x média de fluorescência de leitura dos *backgrounds*)** (MCCLOY et al., 2014), utilizando o software Image J (NIH, EUA).

3.3.1 Isolamento de ilhotas pancreáticas de rato

Ilhotas pancreáticas foram isoladas de ratos machos Wistar, com massa corpórea entre 270 a 350g e aproximadamente 8 semanas de vida. O procedimento de isolamento foi realizado no laboratório do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) - depto. de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São

Paulo. Os pâncreas foram perfundidos através do ducto de Wirson e digeridos com Colagenase tipo V 0,7 mg/ml (Sigma-Aldrich®) de acordo com o método de RICORDI et al (1988) com algumas modificações (RYAN, et al. 2001). A purificação das ilhotas foi feita após centrifugação em tubo cônico usando um gradiente de densidade contínuo de Ficoll (1,037; 1,069; 1,096; 1,110) g/cm³, com posterior coleta destas ilhotas entre os anéis formados pelo gradiente. A pureza das preparações das ilhotas pancreáticas após o isolamento foi determinada por coloração com ditizona (Sigma-Aldrich®) que intercala íons Zn⁺ presente nos grânulos de insulina.

3.3.2 Cultura das ilhotas pancreáticas

Após o isolamento e a purificação das ilhotas provenientes do pâncreas de ratos Wistar, estas foram cultivadas em meio CMRL 1066 (5.6mM glicose) (Mediatech - Cellgro, Miami, FL, USA) contendo 10% de SFB em garrafas T25 sem superfície aderente, em estufa a 37° C e 5,0% de CO₂. A realização destes procedimentos ocorreu no laboratório do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) - depto. de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.3.3 Ensaio *in vitro* de coloração live/dead de ilhotas pancreáticas

O ensaio de viabilidade celular de ilhotas foi realizado utilizando o kit de fluorescência (live/dead), no qual a presença de células vivas foi determinada utilizando o corante FDA (F7378, Sigma-Aldrich®), e iodeto de propídeo foi utilizado como marcador de células não-viáveis. Ilhotas foram expostas a quatro diferentes condições: meio CMRL 1066 + 10% SFB , meio incompleto, MC normóxia e MC hipóxia, durante 24 horas. Após registro das imagens utilizando o microscópio de fluorescência (Eclipse TE 300, Nikon Instruments Inc., Americas) os dados resultantes foram quantificados no software Image J (NIH, EUA), aplicando a fórmula **fluorescência celular total corrigida (CTCF) = densidade integrada – (área selecionada x média de fluorescência de leitura dos *backgrounds*)** (MCCLOY et al., 2014). O valor médio de CTCF/área de cada ilhota analisada na imagem foi aplicado ao final na seguinte fórmula para obtenção do percentual de morte: **% morte = (MÉDIA CTCF/área PI) / SOMA (MÉDIA CTCF/área PI + MÉDIA CTCF/área FDA).**

3.3.4 Imunofluorescência confocal para ensaio de insulina e células endoteliais em ilhotas pancreáticas

O ensaio de detecção de insulina e molécula de superfície endotelial CD31 em ilhotas pancreáticas, foi realizado com o objetivo de avaliar a presença dessas proteínas em ilhotas cultivadas em diferentes condições: A) Ilhotas recém isoladas; B) cultivadas em meio CMRL 1066 + 10 % SFB; C) MC hipóxia. A metodologia da imunofluorescência está anteriormente descrita no item 3.1.7. A captação das imagens foi obtida através da visualização no microscópio confocal Zeiss - modelo LSM 510-Meta, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Anticorpos	Classe	Fornecedor	Diluição
Primário policlonal anti - insulina	IgG de preá da Índia	abcam, ab7842	1:100
Primário policlonal anti- CD31	IgG de Coelho	abcam, ab28364	1:50
Secundário conjugado com Alexa Fluor 594	IgG de porco	abcam, ab150188	1:1000
Secundário conjugado com Alexa Fluor 488	IgG de coelho	Molecular Probes, A-11008	1:1000

Tabela 4. Lista dos anticorpos primários e secundários utilizados na imunofluorescência para detecção de insulina e CD31 em ilhotas.

3.3.5 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada com ferramentas de estatística aplicando-se a análise não-paramétrica Mann-Whitney test, para reconhecer a significância entre duas médias amostrais independentes. Os resultados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão e foram consideradas amostras significantes, aquelas na qual as comparações entre as médias amostrais tiveram valor de $p < 0,05$. Nos ensaios de migração celular foram realizadas análises pareadas no qual foram consideradas amostras significantes, aquelas, na qual as comparações entre as médias amostrais tiveram valor de $p < 0,05$. Todos os gráficos foram elaborados utilizando o software Graph Pad Prisma (©2016 GraphPad Software, Inc).

4 RESULTADOS

4.1.1 Dados epidemiológicos dos pacientes e obtenção de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea:

Ao longo deste trabalho, obteve-se 9 amostras de aspirado medular da crista ilíaca de pacientes entre 15-51 anos, todos doentes falciformes apresentando osteonecrose femoral. Desse total foram escolhidas 3 amostras de pacientes para propagação celular e continuidade dos experimentos subsequentes, estabelecendo como critério amostras nas quais as células apresentaram maior cinética de crescimento populacional. Os dados hematológicos estão apresentados na tabela 5. A população de células mononucleares total foi cultivada e após cinco dias, as células não-aderentes (hematopoiéticas) foram removidas, enquanto as células aderentes (mesenquimais) foram mantidas em meio fresco, renovado a cada 4 dias.

Paciente	Gênero	Idade	Genótipo	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHC M (g/dl)	RDW (%)	Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	Plaquetas (/mm ³)
1	M	41	HBSS	13,3	37,3	73,9	26,3	35,7	17,4	5,220	180.000
2	M	51	HBSC	15,0	43,60	93,60	32,20	34,40	18,1	5,060	183.000
3	M	21	HBSC	13,4	41,0	88,0	28,8	32,7	17,7	16,500	349.000
4	F	31	HBSS	12,8	38,0	91,0	31,0	34,0	13,0	6,080	181.000
5	F	26	HBSS	7,3	21,4	89,1	30,4	34,1	15,5	9,7	310.000
6	F	40	HBSS	15,3	43,4	86,8	30,6	35,3	16,4	4,100	197.000
7	M	16	HBSS	7,3	21,9	84,9	28,3	33,3	22,5	16,3	182.000
8	M	31	HBSS	9,6	29	72,6	24,0	33,0	21,0	13,170	684.000
9	M	15	HBSC	9,1	25,7	91,8	32,5	35,4	22,9	14,7	467.000

Tabela 5. Dados hematológicos dos pacientes incluídos no estudo.

4.1.2 Aspectos morfológicos após isolamento, cultivo e expansão de células tronco mesenquimais (CTMs):

As culturas de CTMs foram observadas rotineiramente em microscópio invertido de contraste de fase. Após 21 dias de cultivo, células com morfologia fibroblastóide e aderentes a superfície da placa de cultivo foram notadas na cultura, diferenciando-se de populações de células hematopoiéticas não aderentes (figura 6).

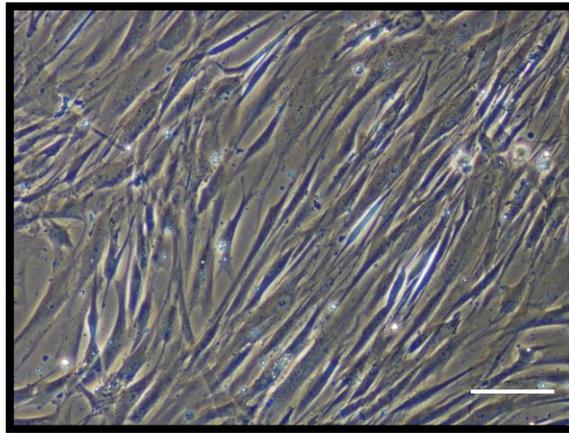


Fig 6. Fotomicrografia representativa da cultura de CTMs em pré-confluência. Cultura de células-tronco mesenquimais na passagem 1, em pré- confluência. Barra de escala =100 μ m.

A população de células aderentes isoladas apresentou-se altamente heterogênea: células de aspecto fusiforme ou estrelado, grandes e pequenas (figura 7). Quando em confluência, a monocamada celular apresentou padrão com regiões de alta e baixa densidade celular, formando estrutura semelhante a vales e montanhas, normalmente observado em cultura de estroma medular.

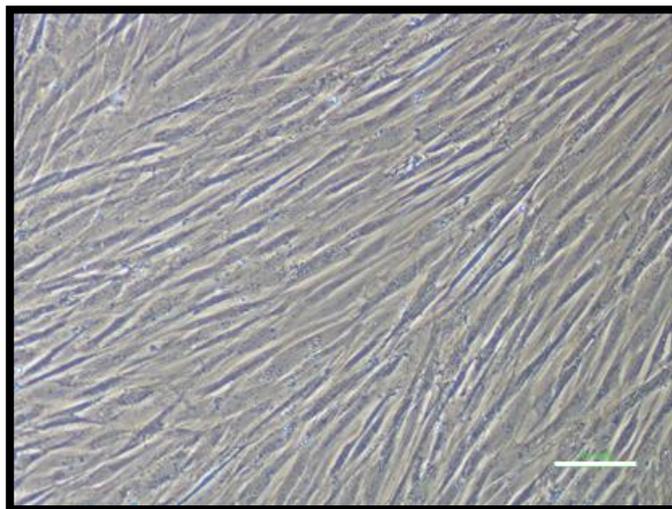


Fig 7. Fotomicrografia representativa da cultura de CTMs em confluência. Cultura de células-tronco mesenquimais na passagem 3, em confluência. Barra de escala =100 μ m.

4.1.3 Avaliação da cinética de expansão celular

Avaliou-se a capacidade de expansão das CTMs através da contagem cumulativa do número de células em cultivo durante 70 dias. Foi plaqueado inicialmente, 1×10^5 células em uma placa de cultivo de 6 poços, e após sucessivas etapas de tripsinização ao longo dos 70 dias do ensaio, foi possível avaliar o tempo de dobramento populacional em função do tempo. A curva obtida no gráfico (figura 8), revelou que as CTMs apresentaram elevada capacidade de expansão ao longo dos 70 dias. Seguindo a fórmula descrita na metodologia, o número de dobramento populacional total das CTMs foi $21,07 \pm 4,25$ duplicações e o tempo de dobramento foi $2,20 \pm 0,46$ dias.

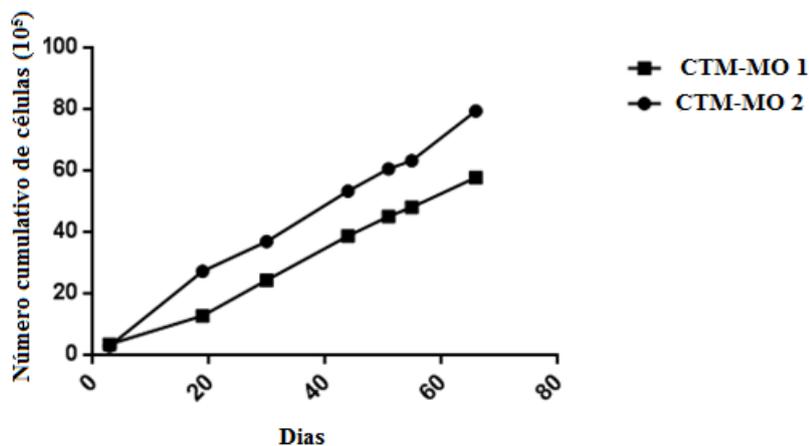


Fig 8. Curva de expansão de CTM-MO. CTM-MO foram cultivadas durante 70 dias, sendo feita contagem da população celular a cada etapa de tripsinização.

4.1.4 Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo:

Após a terceira passagem as CTMs foram caracterizadas quanto a expressão de antígenos de superfície celular, seguindo os critérios estabelecidos pela sociedade internacional de terapia celular (DOMINICI et al., 2006). As CTMs derivadas de medula óssea apresentaram uma alta expressão para os marcadores de superfície celular CD29 (integrina $\beta 1$), CD105 (endoglina), CD73 (ecto-5' nucleotidase) e parcial para CD90, sendo estas, moléculas características de populações de CTMs (figura 9 e 10).

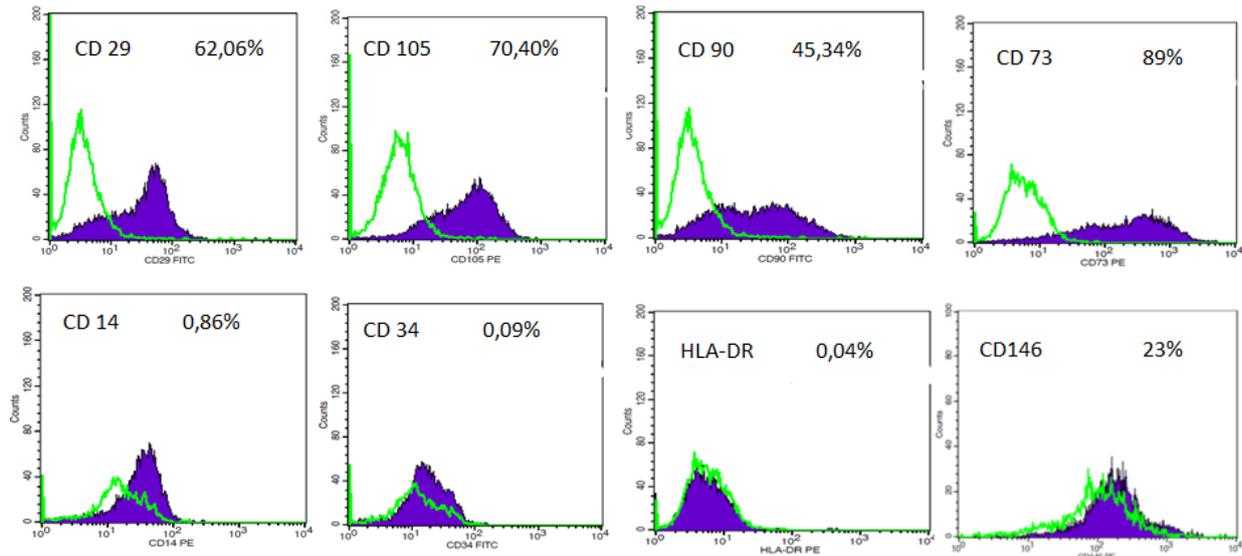


Fig 9. Análise imunofenotípica de marcadores de superfície por citometria de fluxo. Os histogramas mostram a expressão das moléculas CD29, CD105, CD90 e CD73, CD14, CD34, HLA-DR e CD146 (em roxo), comparado com as células não marcadas (auto-fluorescência) (em verde). Resultado representativo, N =3.

Avaliou-se também a expressão da molécula CD146 (MCAM), conhecido marcador de células subendoteliais dos sinusóides da medula óssea (pericitos), o qual apresentou uma baixa expressão. Além destes marcadores, estas células foram caracterizadas pela baixa expressão de moléculas hematopoiéticas, CD34 (principalmente em precursores de células hematopoiéticas e células endoteliais), CD14 (receptor LPS) e HLA-DR (antígeno leucocitário humano) (figura 10).

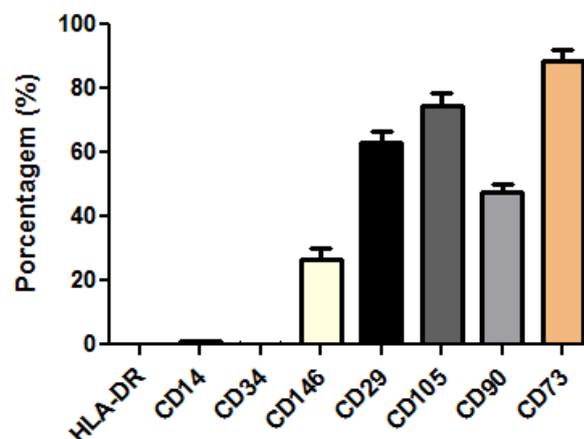


Fig 10. Porcentagem da expressão de antígenos de superfície de CTMs. Valores expressos pela média \pm desvio padrão. Resultado representativo, N =3.

4.1.5 Caracterização por diferenciação osteogênica e adipogênica

A capacidade de diferenciação das CTMs em linhagens osteoblásticas e adipócitos foi avaliada seguindo o protocolo desenvolvido por Zuk et al. (2001). Ao atingirem a pré-confluência, CTM-MO na terceira passagem foram tratadas com meios indutores de conversão em linhagens osteogênica e adipogênica, durante um período de 21 dias. Transcorrido o período de indução, foi observado uma grande quantidade de gotículas lipídicas intracelulares, como evidenciado após coloração com *oil red* (figura 11. A). As células induzidas a conversão osteogênica apresentaram ao fim dos 21 dias alterações na morfologia celular, com as células se organizando em cristas (amontoado de células). A mineralização celular resultante do acúmulo de depósito de cálcio, pôde ser observado após a coloração com *alizarina red* (figura 11.B).

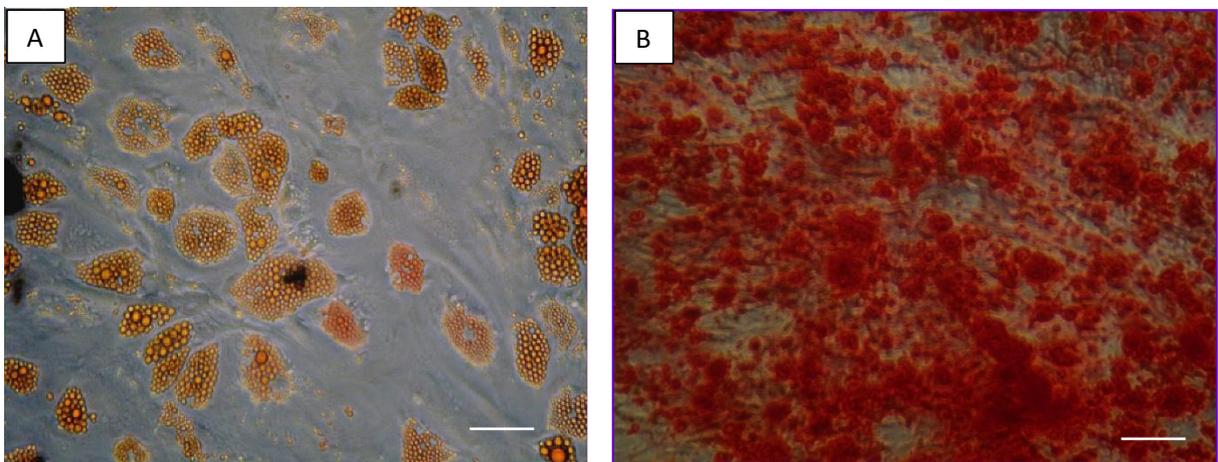


Fig 11. Caracterização do potencial multilinhagem de CTMs. **A)** Presença de gotículas lipídicas intracelulares após indução adipogênica de CTMs coradas em vermelho com *Oil Red* **B)** Depósito de matriz calcificada corada em vermelho após indução osteogênica com *Alizarina Red*. Barra de escala = 100 μ m. Resultado representativo, N=3.

4.1.6 Identificação de marcadores membranares e de citoesqueleto em CTMs

A identificação de proteínas integrais de matriz extracelular, marcadores miogênicos, receptores tirosina quinase e proteoglicanos integrais de membrana, foram avaliados em CTMs através da marcação respectiva com anticorpos anti-Col IV, anti- α -SMA, anti-PDGFR β e anti-NG2 (figura 12).

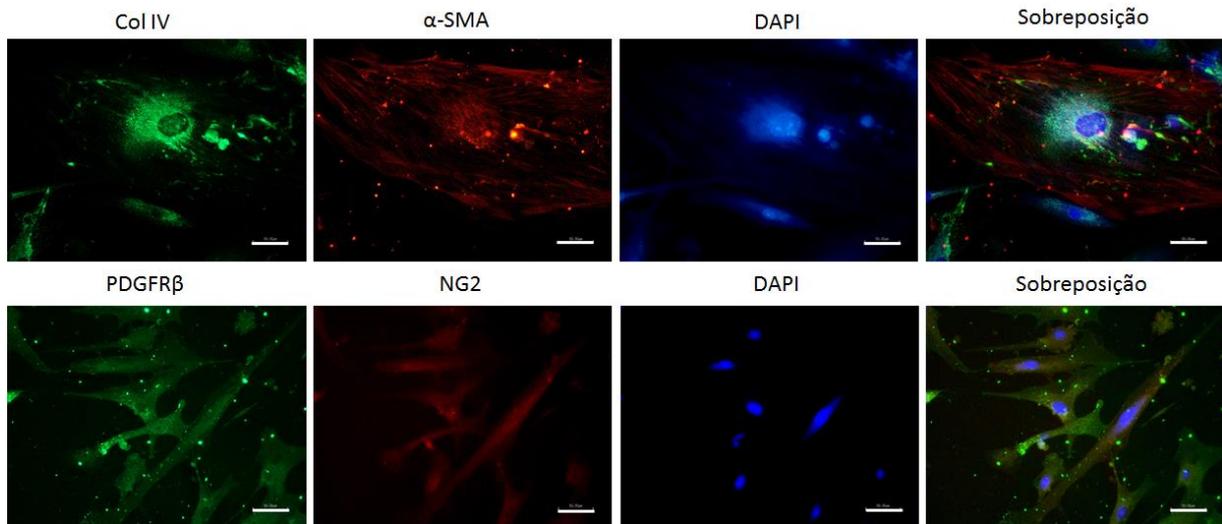


Fig 12. Imunofluorescência das proteínas Col IV, α -SMA, PDGFR β e NG2. Núcleos corados em azul com DAPI. Barra de escala = 50 μ m. Resultado representativo, N=1.

Estes resultados demonstram a marcação positiva para todas as proteínas analisadas, com a presença mais evidente da marcação de Col IV, α -SMA e PDGFR β . Esse padrão de marcadores é característico de culturas de CTMs e culturas de células perivasculares (CRISAN et al., 2008).

4.1.7 Pré-condicionamento das CTMs e avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das CTMs foi analisada pelo método de coloração com calceína-AM. Após 48 horas de condicionamento, o meio foi coletado e a viabilidade celular foi analisada (figura 13. A, B, C, D).

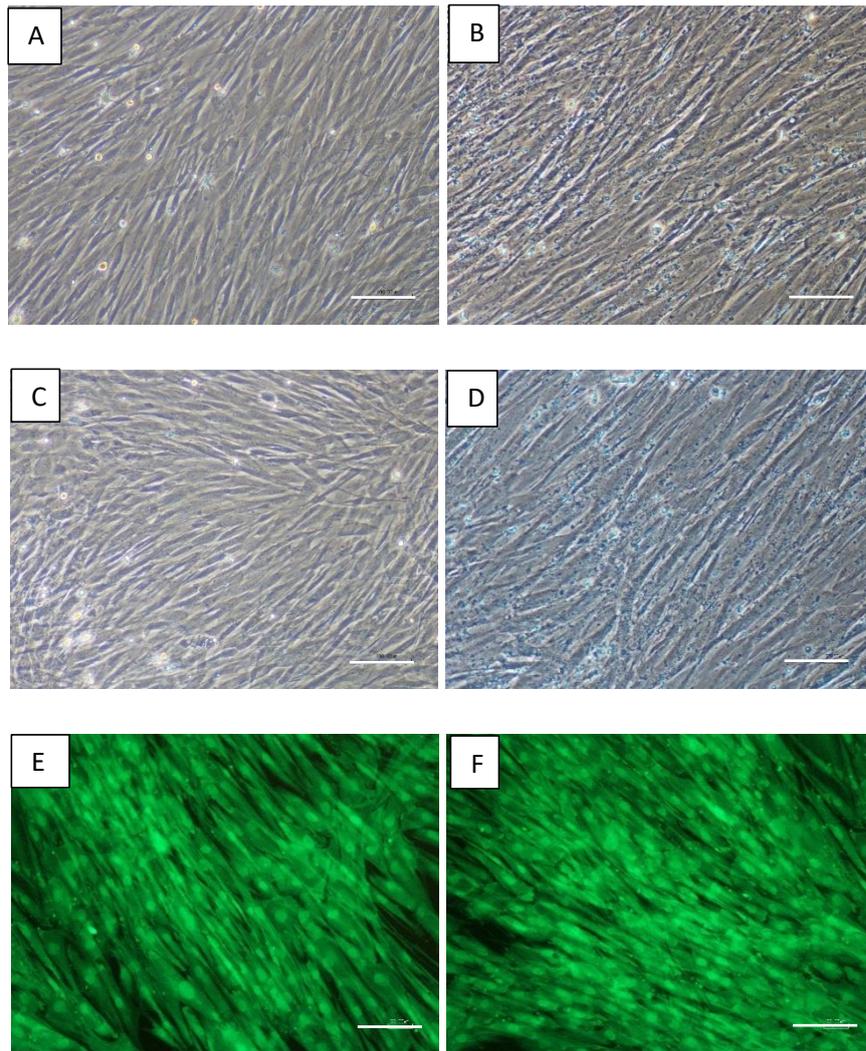


Fig 13. Viabilidade celular de CTMs. A,B,C,D) Imagem de CTMs observadas em microscópio invertido de contraste de fase. E, F) Imagem de CTMs detectadas por ensaio de calceína em microscópio de fluorescência. A- célula pré normóxia . B-células pós-normoxia. C- célula pré hipóxia . D-célula pós hipóxia. E- célula pós normóxia . F- célula pós hipóxia. Barra de escala = 100μm. Resultado representativo, N=3.

Foi observado que não houve alteração morfológica das células incubadas em normóxia após o condicionamento por 48 horas. Entretanto, observou-se a presença de grânulos em suspensão nestas culturas após o condicionamento (figura 13.B). Após o condicionamento em hipóxia as células apresentaram uma morfologia mais alongada com diminuição da área citoplasmática e uma grande quantidade de grânulos em suspensão (figura 13.D). Como foi demonstrado pelo método de coloração por calceína, após os condicionamentos em ambas as condições, as células permaneceram viáveis (figura 13 E,F). As imagens de coloração com calceína foram

quantificadas e o gráfico resultante indicou que não houve diferença estatística na viabilidade das CTMs expostas a diferentes pressões parciais de oxigênio (figura 14).

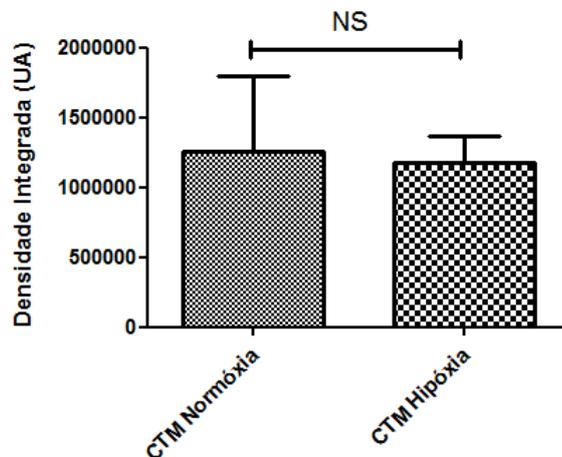


Fig 14. Gráfico representativo da viabilidade celular. Representação gráfica da viabilidade das CTMs pré-condicionadas em normóxia e hipóxia por intensidade de pixel. Valores expressos pela média \pm desvio padrão. Resultado representativo, N=3.

4.1.8 Aspectos morfológicos e caracterização de células endoteliais derivadas do cordão umbilical humano (HUVECs)

Logo após o isolamento (passagem zero), as células descoladas da veia umbilical apresentam-se como grumos refringentes ao fundo da placa de cultivo (figura 15.A). O fenótipo poligonal característico das HUVECs pôde ser observado após 3 dias de cultivo em meio completo, com as células aderidas formando monocamada (figura 15.B). A caracterização das células endoteliais foi realizada pela expressão da molécula de superfície endotelial CD31 após marcação por imunofluorescência (figura 15.C).

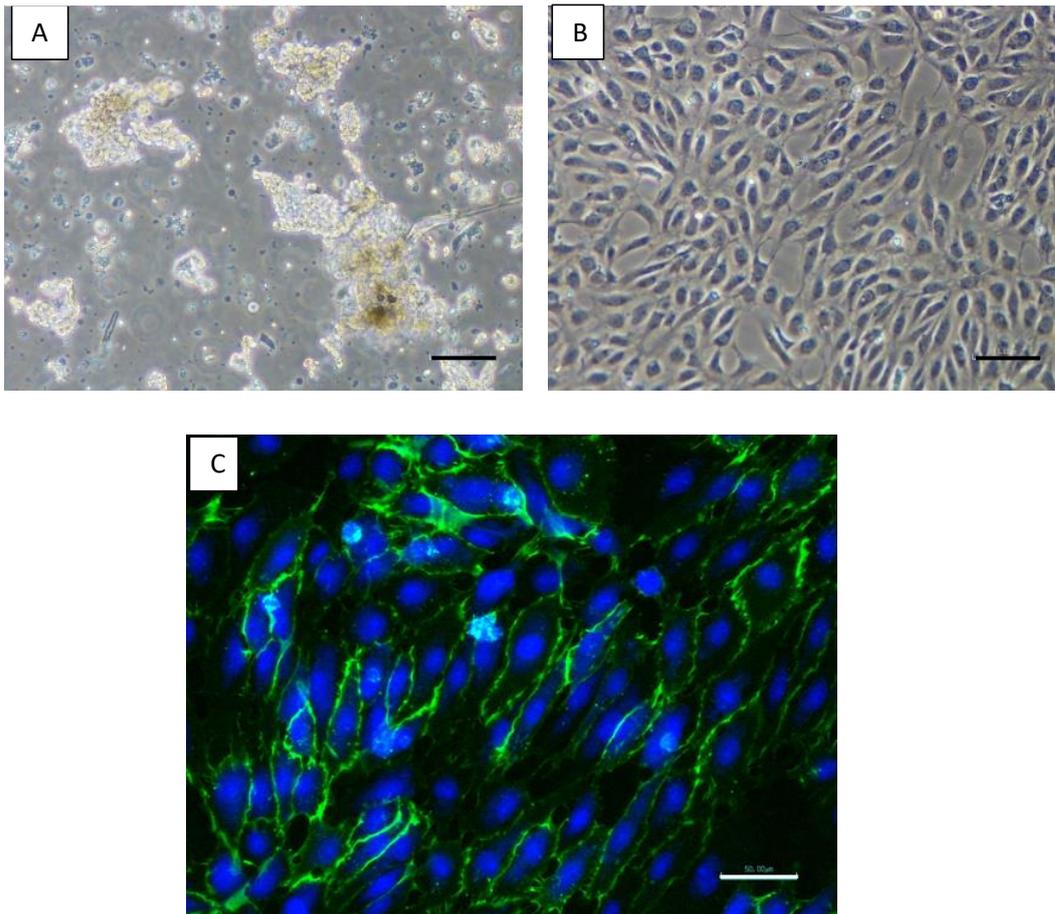


Fig 15. HUVECs observadas em microscopia óptica de contraste de fase e após ensaio de imunofluorescência. A) Fotomicrografia de HUVECs após o isolamento na passagem zero. **B)** Fotomicrografia de cultura de HUVECs na segunda passagem **C)** Núcleos marcados em azul com DAPI e marcação da molécula de adesão celular endotelial CD31 (em verde). Barra de escala: A e B = 100 μ m; C = 50 μ m. Resultado representativo, N=3.

4.1.9 Avaliação *in vitro* da capacidade migratória das HUVECs (*Scratch wound assay*)

A capacidade de migração das células endoteliais (HUVECs) na presença do meio condicionado das CTMs foi avaliada por meio do ensaio de cicatrização da lesão na monocamada. Após 18 horas, observou-se a redução significativa da área lesionada, ocasionada pela migração das células endoteliais (figura 16. A).

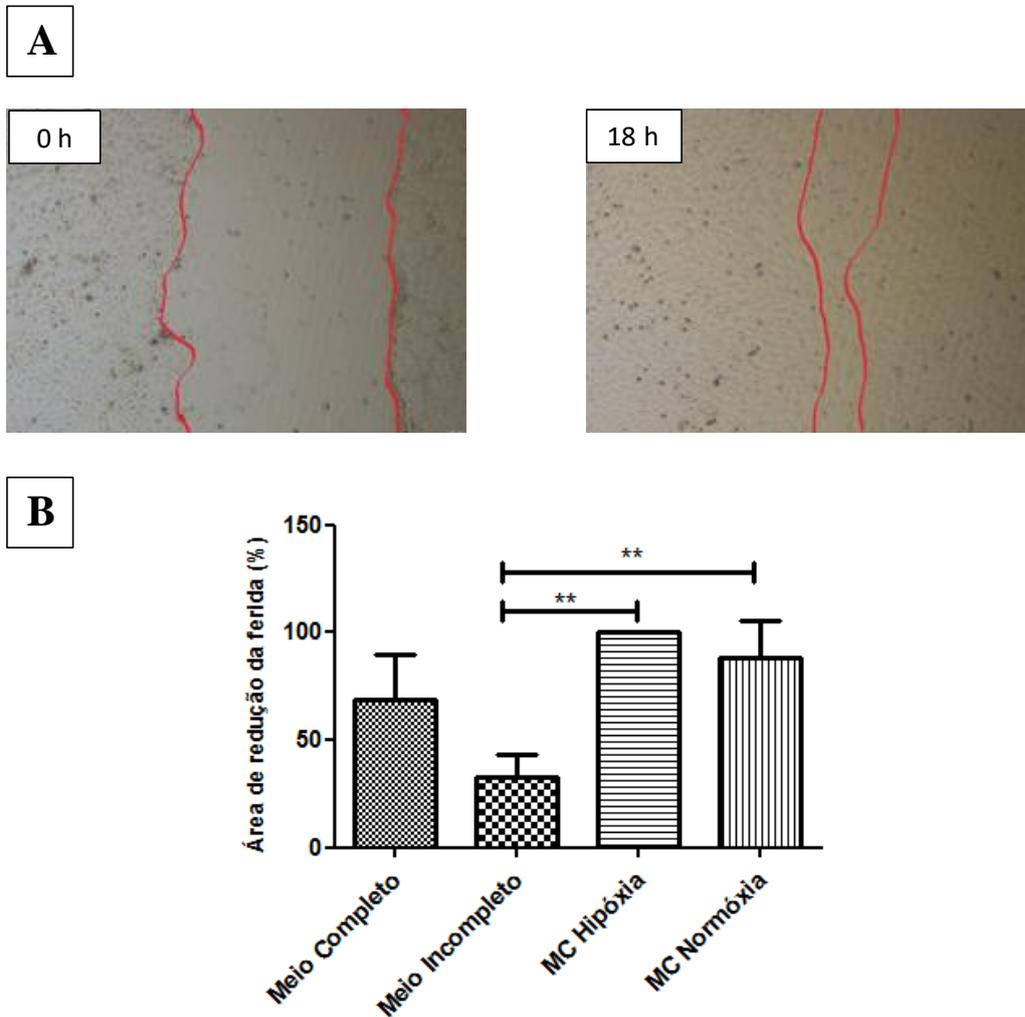


Fig 16. Ensaio de migração celular. A) Imagem ilustrativa do ensaio de migração de HUVECs no momento inicial e após 18 horas (Aumento de 4x). **B)** Gráfico representativo da área cicatrizada pelas HUVECs. Valores expressos pela média \pm desvio padrão. ****** $P < 0,01$. Resultado representativo, $N=3$.

A área de redução da lesão na monocamada das HUVECs em contato com os meios condicionados hipóxia e normóxia foi estatisticamente significativa ($p=0,0010$ e $p=0,0017$; respectivamente) comparado a área de redução da lesão em monocamadas incubadas com o meio incompleto que foi de $33,09 \pm 10,41\%$. O resultado do ensaio demonstrou que a redução da área lesionada foi de $88,13 \pm 17,56\%$ na presença do MC normóxia e de 100% na presença do MC hipóxia, demonstrando que os meios condicionados foram capazes de promover a redução na área lesionada após 18 horas, indicando a possível migração das células endoteliais (figura 16. B)

4.2.1 Avaliação *in vitro* da Viabilidade das HUVECs (TUNEL assay)

Com o objetivo de avaliar o efeito dos meios condicionados na viabilidade das células endoteliais privadas de soro, foi realizado o ensaio de TUNEL (figura 17. A e B).

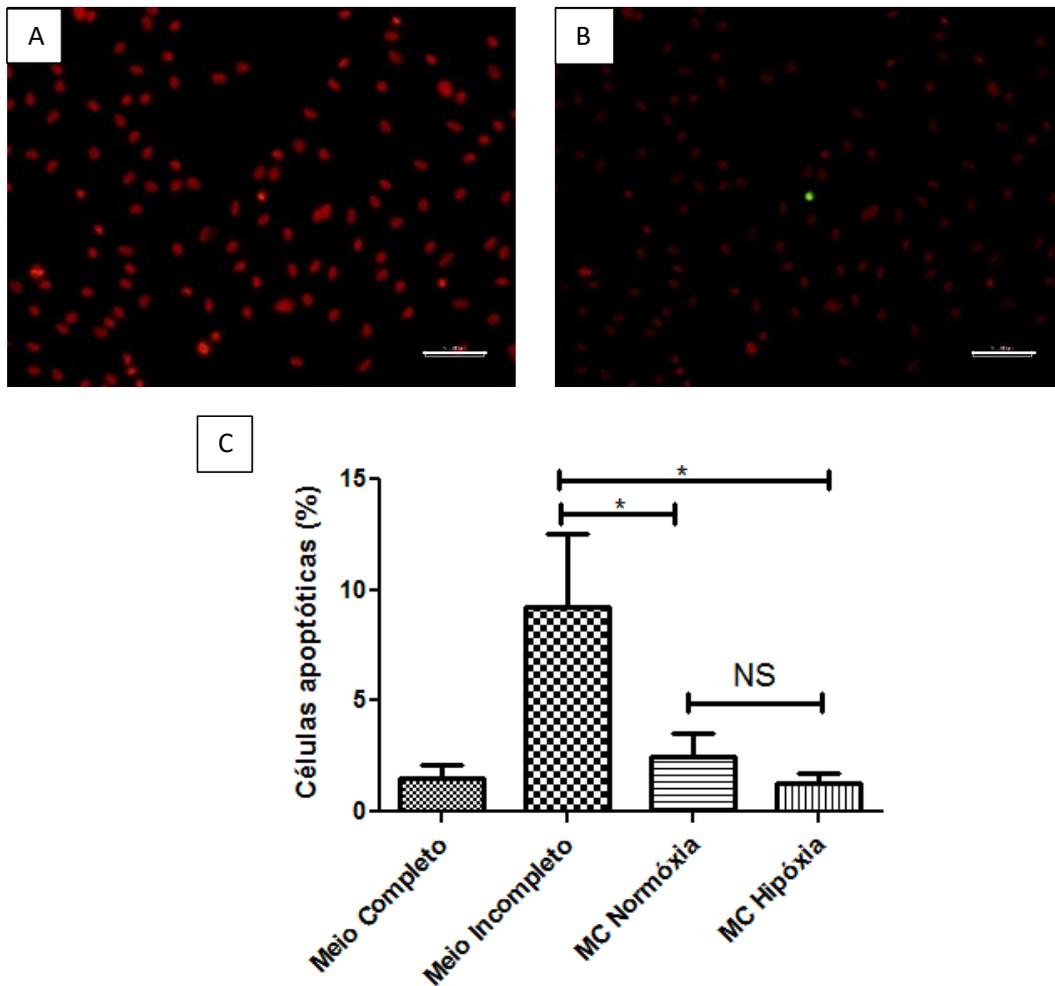


Fig 17. Ensaio de viabilidade das HUVECs em meio condicionado. A e B) Marcação por imunofluorescência do núcleo total em vermelho pelo iodeto de propídeo e núcleos apoptóticos em verde pelo TdT. **C)** Representação gráfica da porcentagem de células apoptóticas nos MC. Valores expressos pela média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$. Resultado representativo, $N=3$.

A partir do gráfico observa-se que o percentual de HUVECs em apoptose no MC normóxia foi $2,5 \pm 1,0$ % e no meio hipóxia foi $1,25 \pm 0,5$ %, sem significância estatística entre eles. Estes resultados foram significativamente menores ($p=0,0294$, em ambas condições) quando comparado ao percentual de apoptose das HUVECs em contato com o meio incompleto ($9,25 \pm 3,30$ %) (figura 17.C).

4.2.2 Avaliação *in vitro* da proliferação de HUVECs (BrdU assay)

A avaliação da capacidade proliferativa das HUVECs em contato com os meios condicionados, meio completo e meio incompleto foi realizada pela incorporação de BrdU. Os núcleos que incorporaram BrdU foram visualizados em verde, e os núcleos totais foram revelados em azul pelo DAPI (figura 18).

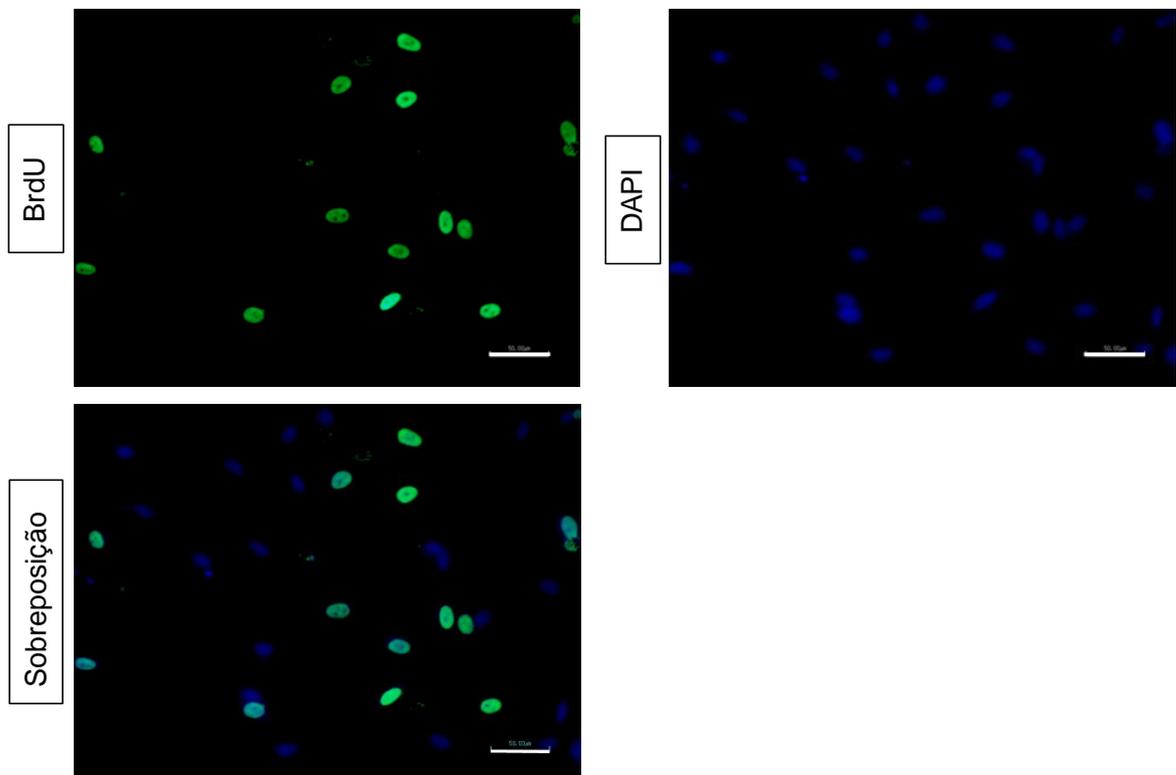


Fig 18. Ensaio de proliferação das HUVECs por incorporação de BrdU. Marcação dos núcleos totais pelo DAPI (azul) e marcação dos núcleos de células em divisão na fase S do ciclo celular (verde). Barra de escala = 50 µm.

A quantificação dos dados foi realizada a partir da contagem de 300 núcleos totais obtidos em 4 campos de imagens distintos. A taxa de proliferação foi medida pelo percentual de núcleos que incorporaram BrdU (figura 19). Ambos os meios condicionados (normoxia e hipóxia) estimularam a proliferação das HUVECs quando comparados ao meio incompleto. A taxa de proliferação das HUVECs na presença de MC hipóxia foi $31,46 \pm 5,55$ %, significativamente maior comparado a taxa de proliferação no MC normóxia que foi $19,32 \pm 4,89$ % (figura 19).

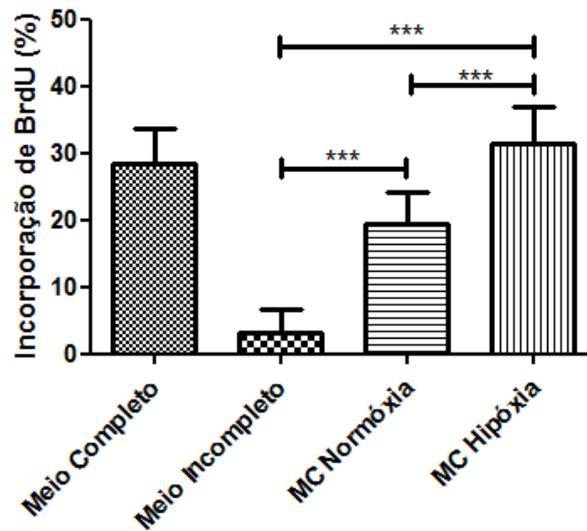
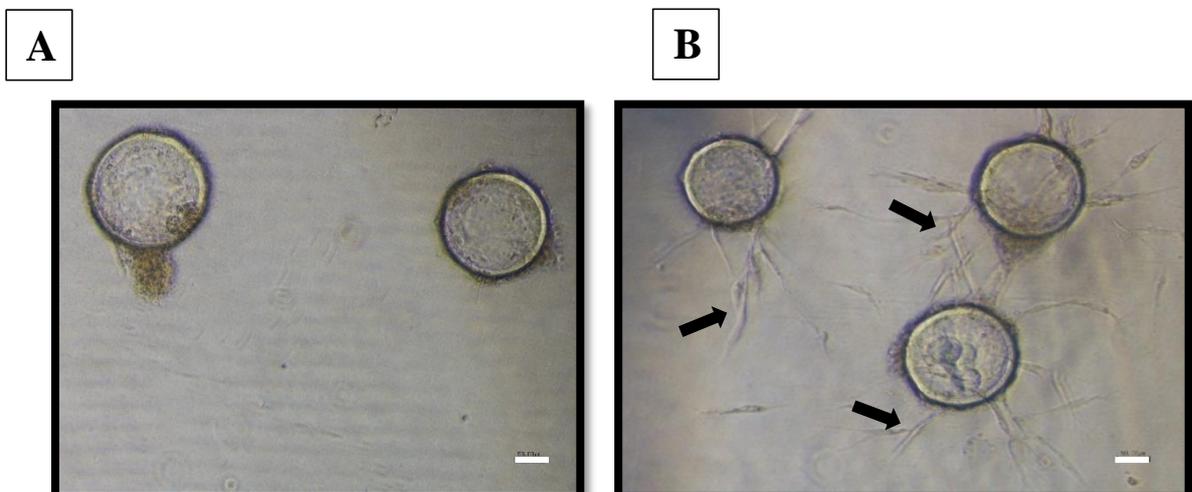


Fig 19. Quantificação da incorporação de BrdU após 24 horas. Análise obtida a partir da contagem de 300 núcleos totais. Valores expressos pela média \pm desvio padrão. ***P < 0,001. Resultado representativo, N=3.

4.2.3 Avaliação tubulogênica das HUVECs nos meios condicionados

A avaliação do potencial angiogênico das HUVECs foi realizada por meio do ensaio de tubulogênese em gel de fibrina. Os resultados obtidos ao longo do experimento, revelaram que as HUVECs quando em contato com os MCs adquirem a capacidade de formar tubos que se estendem e ramificam, culminando na formação do lúmen endotelial (figura 20.A, setas em preto).



C

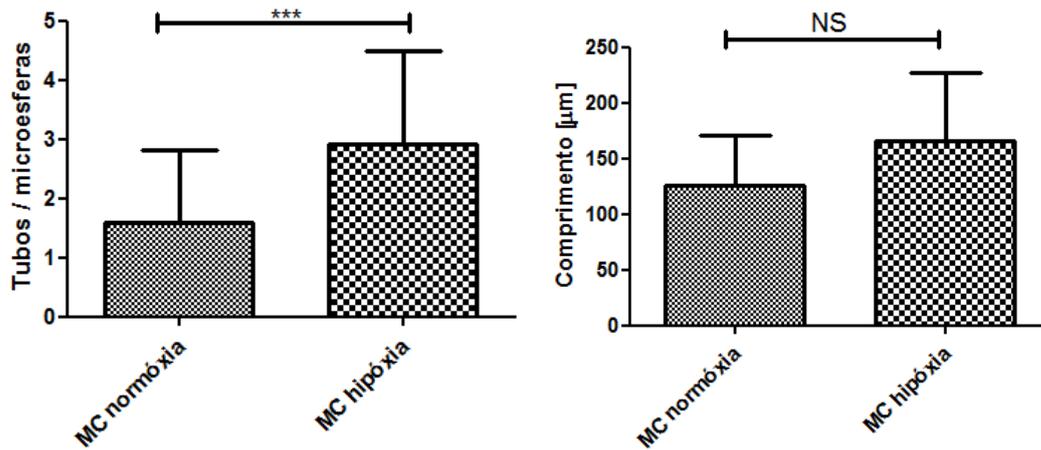


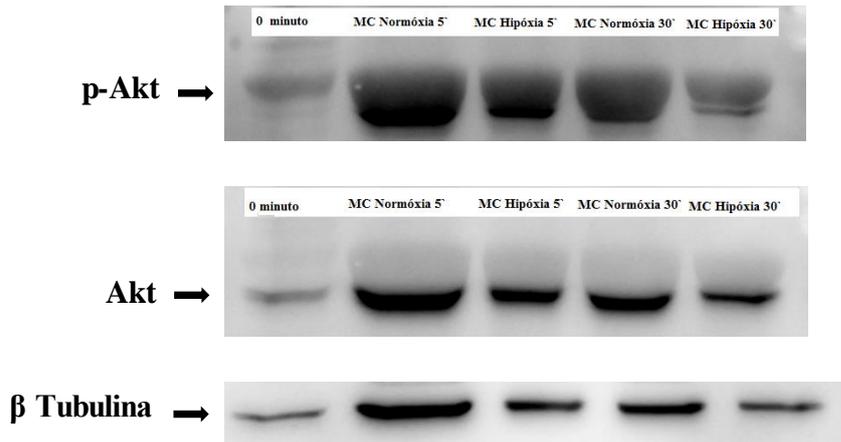
Fig 20. Ensaio de angiogênese in vitro com microesferas . A) Imagem ilustrativa da ausência de formação de tubos em HUVECs na presença de meio completo e incompleto. **B)** Imagem ilustrativa da formação de tubos em HUVECs na presença dos meios condicionados hipóxia e normóxia. Barra de escala = 100 µm. **C)** Gráficos representativos dos números/comprimento dos tubos formados por células endoteliais. Valores expressos pela média ± desvio padrão. ***P < 0,001. Resultado representativo, N=3.

A análise quantitativa dos tubos foi realizada após a seleção de 50 *beads* fotografadas em 4 campos distintos da imagem. Os resultados obtidos demonstraram que diferentemente dos meios completos e incompletos, os MCs normóxia e hipóxia estimularam o brotamento e a formação de tubos nas células endoteliais . A formação de tubos pelas HUVECs na presença do MC hipóxia foi estatisticamente significativa comparada a formação de tubos nas HUVECs tratadas com MC normóxia. Outro dado quantificado foi o comprimento destes tubos, revelando que houve uma tendência de aumento no comprimento dos tubos no MC hipóxia (166,30 ± 60,40 µm) comparado ao MC normóxia (126,40 ± 44,53 µm) (figura 20.B).

4.2.4 Western Blot de p-Akt e Akt

O ensaio de western blot foi realizado para detectar a presença de p-Akt e Akt nos extratos de HUVECs previamente incubadas com os MC normóxia e hipóxia. Estas proteínas quinases estão envolvidas em cascatas de sinalização intracelular responsáveis pela proliferação e inibição da apoptose celular.

A



B

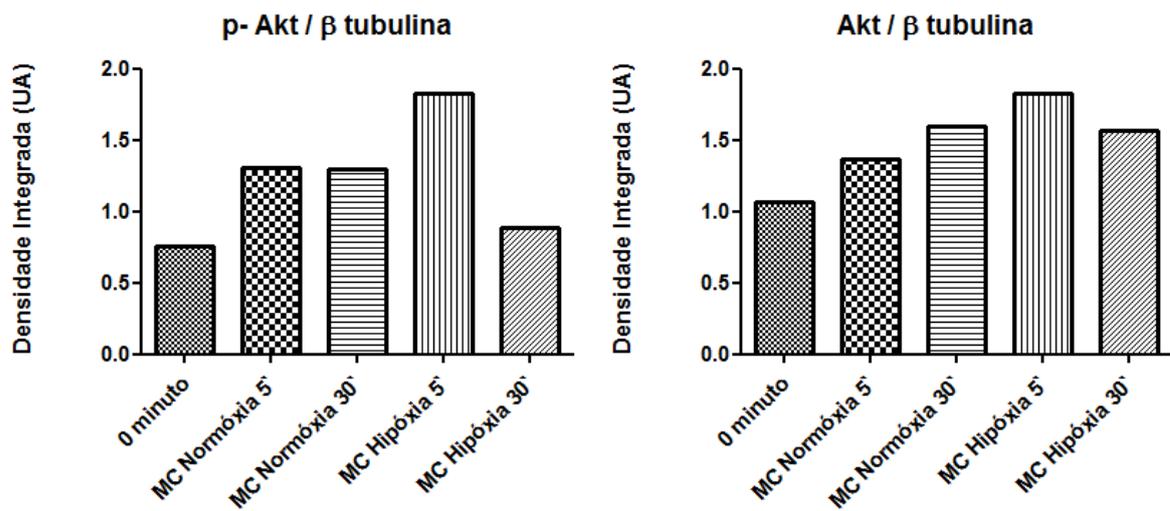


Fig 21. Western blot de p-Akt e Akt. A) Fotografia da membrana de Western blot marcada com as proteínas p-Akt e Akt (60 Kda). **B)** Gráfico representativo da expressão de p-Akt e Akt em extratos de HUVECs submetidas a diferentes condições. Resultado Representativo, N=1.

A partir da análise dos blots, foi evidenciado a expressão de p-Akt (estado fosforilado e ativo da proteína Akt) e Akt em todas as condições na qual as HUVECs foram tratadas (figura 21.A). Os maiores níveis de expressão da p-Akt e AKT foram alcançados após 5 minutos de incubação das HUVECs com o MC hipóxia (figura 21.B). Os gráficos também revelaram que os níveis de expressão de p-Akt nos primeiros 5 minutos com os MCs, equivalem aproximadamente aos níveis de expressão de Akt total em ambos os MCs no mesmo intervalo de tempo.

4.2.5 Análise da expressão gênica das CTMs

Com o objetivo de avaliar a expressão diferenciada dos transcritos gênicos nas CTMs condicionadas em normóxia e hipóxia, a análise quantitativa dos genes NRG1, col4, col1a, PCOLCE, MMP-2, SPARC, Bigh3, THBS, HGF, IL-8, FGF-1, PPAR, PDGFR, VEGF, SDF-1a, ENG1, MCAM e CD90 foi conduzida através da técnica de qRT-PCR.

A presença dos transcritos gênicos foi demonstrada através de gráficos de expressão relativa. Os resultados foram normalizados em função dos genes GAPDH e HPRT, entretanto, escolhemos o GAPDH por ser um endógeno com maior expressão comparado ao HPRT.

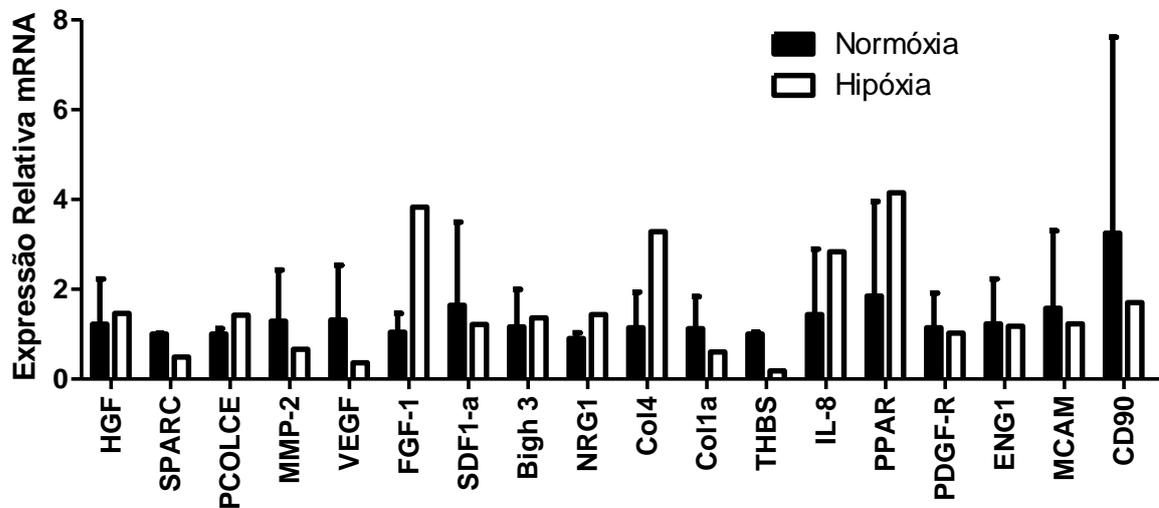


Fig 22. Perfil de expressão de CTMs quando condicionadas em normóxia e hipóxia. Os genes investigados foram: NRG1, col4, col1a, PCOLCE, MMP-2, SPARC, Bigh3, THBS, HGF, IL-8, FGF-1, PPAR, PDGFR, VEGF, SDF-1a, ENG1, MCAM e CD90.

Os resultados obtidos evidenciaram a expressão de vários genes pró-angiogênicos como PDGFR, VEGF, HGF, IL-8 e MMP-2 tanto nas CTMs em normóxia como em hipóxia. Além disso, genes envolvidos na formação do lúmen de células endoteliais como PCOLCE, SPARC e Bigh3, também foram expressos em ambas as condições que as CTMs foram expostas. CD90 e CD105, marcadores típicos de CTMs foram expressos em todas as condições (figura 22).

4.2.6 Perfil proteômico do meio condicionado

Afim de analisar o perfil de expressão de proteínas angiogênicas presentes no meio condicionado derivado das CTMs, foi realizado o ensaio de array para detecção de até 55 proteínas simultaneamente. A partir dos resultados de migração, proliferação e angiogênese, foi avaliada a presença de fatores no MC hipóxia (figura 23 A e B).

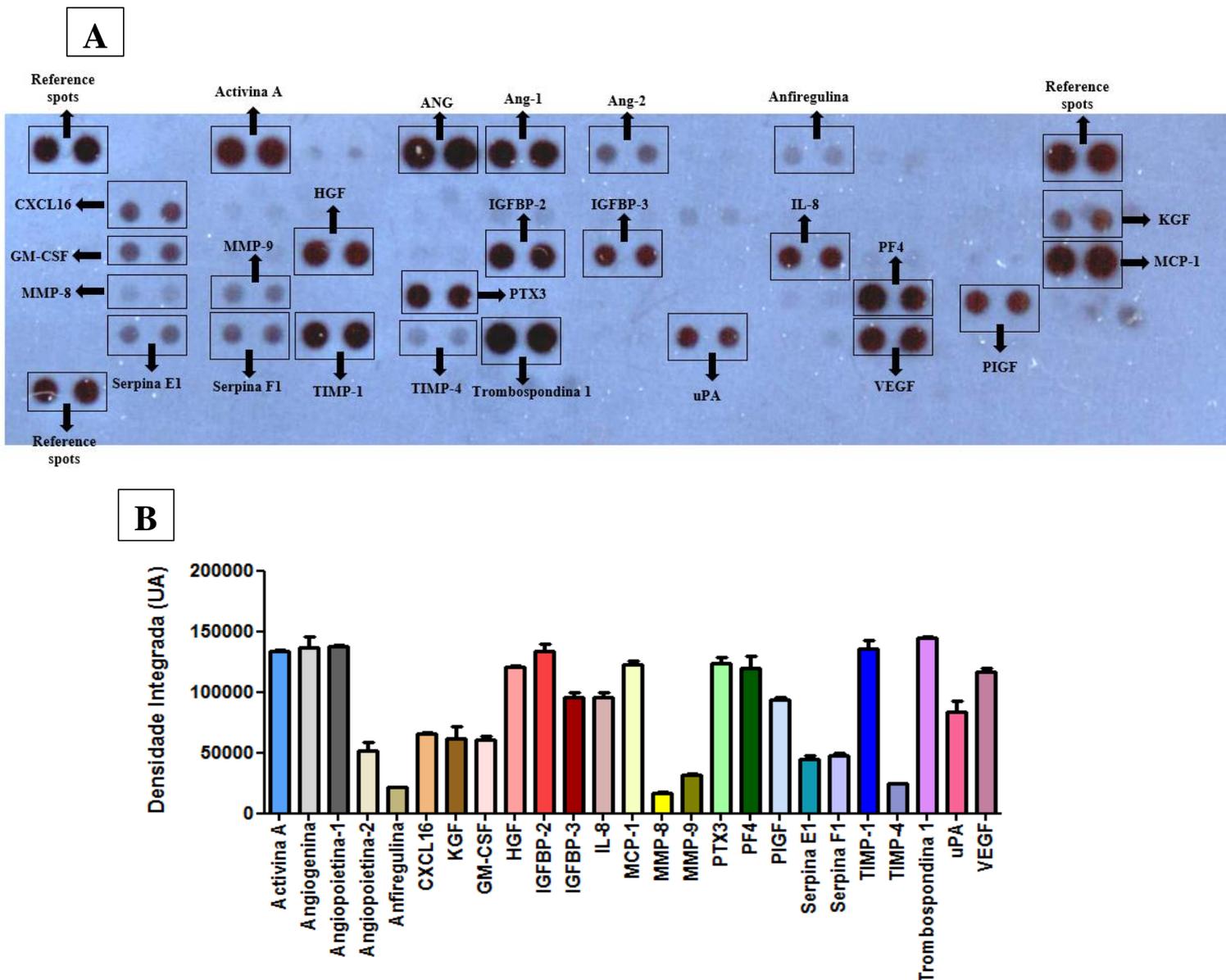


Fig 23. Perfil proteômico do meio condicionado. **A)** Perfil de expressão proteica de MC hipóxia na membrana de Array após exposição ao filme de raio-X por 10 min. **B)** Gráfico de quantificação da expressão proteica pela medição da intensidade de pixel dos *spots*. Valores expressos pela média \pm desvio padrão. Resultado representativo, N=1.

Os resultados obtidos evidenciaram a expressão de 25 proteínas relacionadas a eventos angiogênicos presentes no MC hipóxia. Os maiores níveis de expressão foram detectados nas proteínas, activina A, angiogenina, angiopoietina-1, HGF, IGFBP-2, MCP-1, PTX3, PF4, TIMP-1, trombospondina -1 e VEGF (figura 23 B).

4.2.7 Isolamento de Ilhotas Pancreáticas de ratos

As ilhotas pancreáticas foram obtidas de 15 ratos *Wistar* com 8 semanas de idade, com peso variando entre 270-350g. A cada isolamento realizado foram contabilizadas em média 2000 ilhotas. Estes grupos celulares apresentaram morfologia difusa, variando em forma e tamanho (figura 24.A). Após a purificação as ilhotas foram coradas com ditizona e observadas no microscópio invertido de contraste de fase com uma coloração vermelha (figura 24.B).

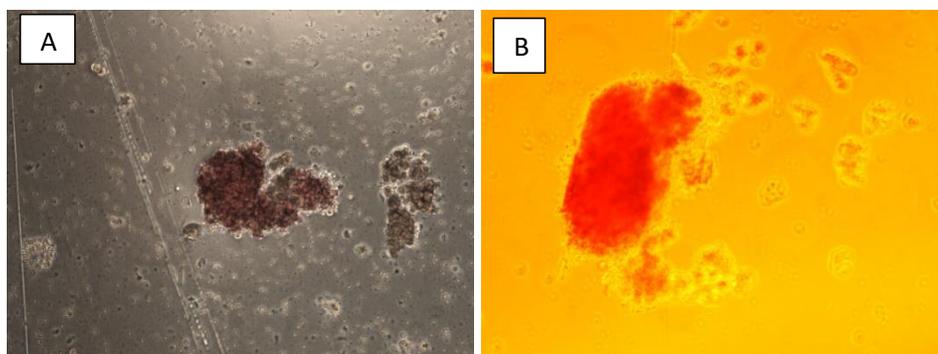
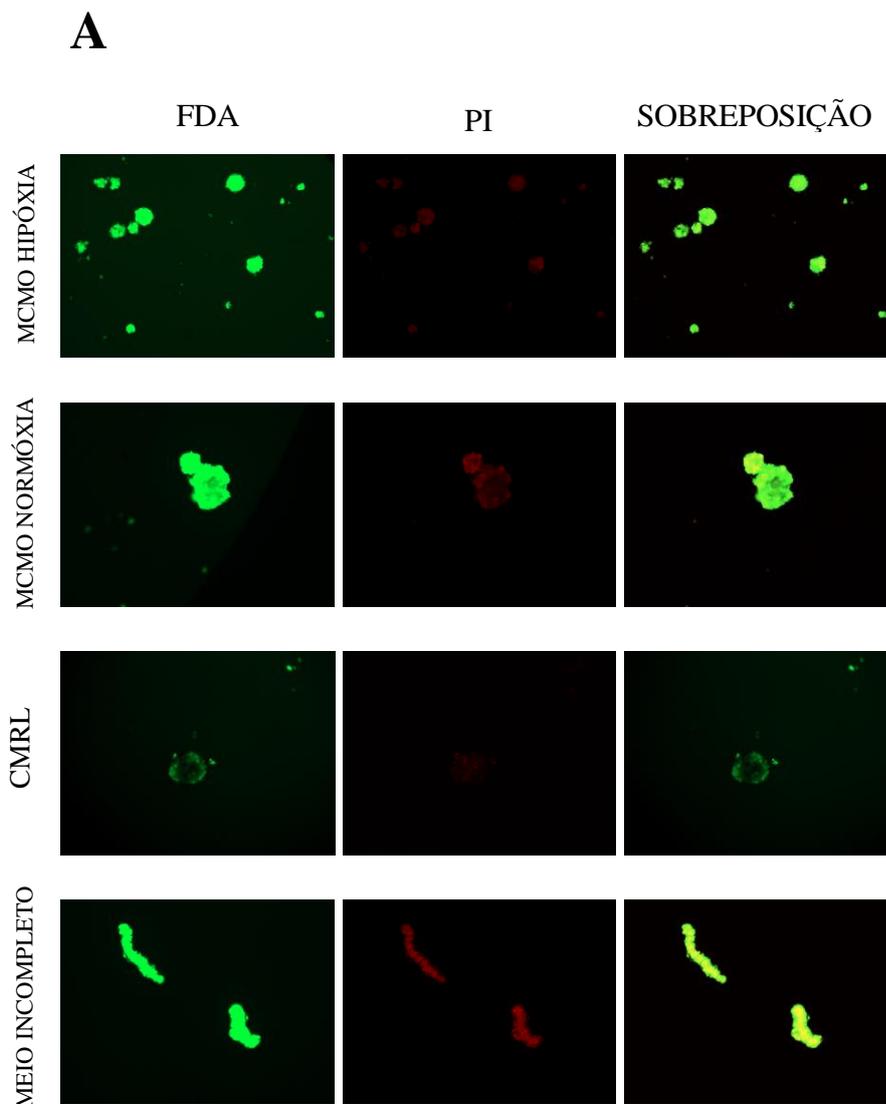


Fig 24. Ilhotas pancreáticas em microscopia óptica. A) Fotomicrografia de ilhotas pancreáticas de ratos recém isoladas **B)** Ilhotas pancreáticas purificadas e coradas com ditizona. Magnificação 100X. Resultado representativo, N=3.

Os resultados obtidos a partir da coloração com ditizona indicaram a presença de ilhotas viáveis ao final dos isolamentos apresentando a manutenção da secreção de insulina (figura 24.B). Estes grupos celulares foram então cultivados em meio CMRL 1066 + 10% SFB por 24 horas e posteriormente utilizados nos experimentos subsequentes.

4.2.8 Ensaio *in vitro* de viabilidade de ilhotas pancreáticas

O ensaio *live/dead* foi realizado afim de avaliar a viabilidade das ilhotas cultivadas por 24 horas na presença dos MCs. As fotografias obtidas pela coloração com FDA (verde) indicaram a presença de ilhotas viáveis na presença dos MCs. Em contraste, observou-se também regiões de morte celular nas ilhotas (vermelho) pela coloração com iodeto de propídeo (figura 25 A).



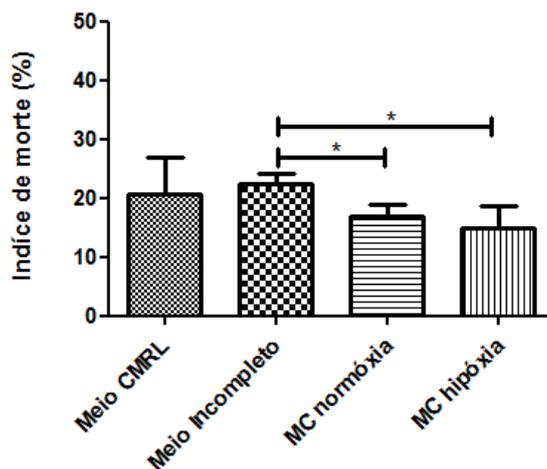
B

Fig 25. Ensaio de viabilidade de ilhotas em meio condicionado. **A)** Fotomicrografia do ensaio de viabilidade por quimioluminescência de ilhotas pancreáticas de ratos em microscópio de fluorescência, objetiva de 10X. **B)** Quantificação gráfica da viabilidade de ilhotas pancreáticas em diferentes condições. Valores expressos pela média \pm desvio padrão. *P < 0,05. Resultado representativo, N=3.

Os resultados obtidos após a quantificação dos dados, indicaram que o índice de morte nas ilhotas cultivadas com o MC normóxia foi de $17 \pm 1,82$ % e hipóxia foi de $15,50 \pm 3,742$ %, significativamente menor comparado ao meio incompleto ($22,50 \pm 1,73$ %). Surpreendentemente, o índice de morte das ilhotas cultivadas em MC foi menor que aquele observado no meio CMRL 1066 ($18 \pm 6,18$ %) (figura 25). Foi observado que a redução na morte das ilhotas em ambos os meios condicionados foi estatisticamente significativa ($p=0,0284$), comparada com o resultado obtido nas ilhotas submetidas ao meio incompleto.

4.2.9 Avaliação da expressão de insulina e morfologia em ilhotas na presença de meio condicionado

A partir dos resultados obtidos em ilhotas cultivadas com o MC hipóxia no ensaio de viabilidade, foi realizada a marcação para detecção de insulina e da molécula de superfície endotelial CD31. A partir das imagens obtidas revelou-se que a produção de insulina (vermelho) foi mantida nas ilhotas cultivadas com o MC hipóxia. Resultado semelhante foi observado nas ilhotas em contato com o meio CMRL 1066 (figura 26. B e C).

A análise da marcação de CD31, revelou que o MC hipóxia preservou a histoarquitetura vascular das ilhotas. Entretanto, ilhotas cultivadas com o meio CMRL 1066, mostraram uma perda considerável de sua estrutura vascular, revelado nas imagens pela diminuição da marcação em verde. A análise comparativa das imagens foi realizada avaliando o resultado da marcação de insulina e CD31 em ilhotas recém isoladas (figura 26.A).

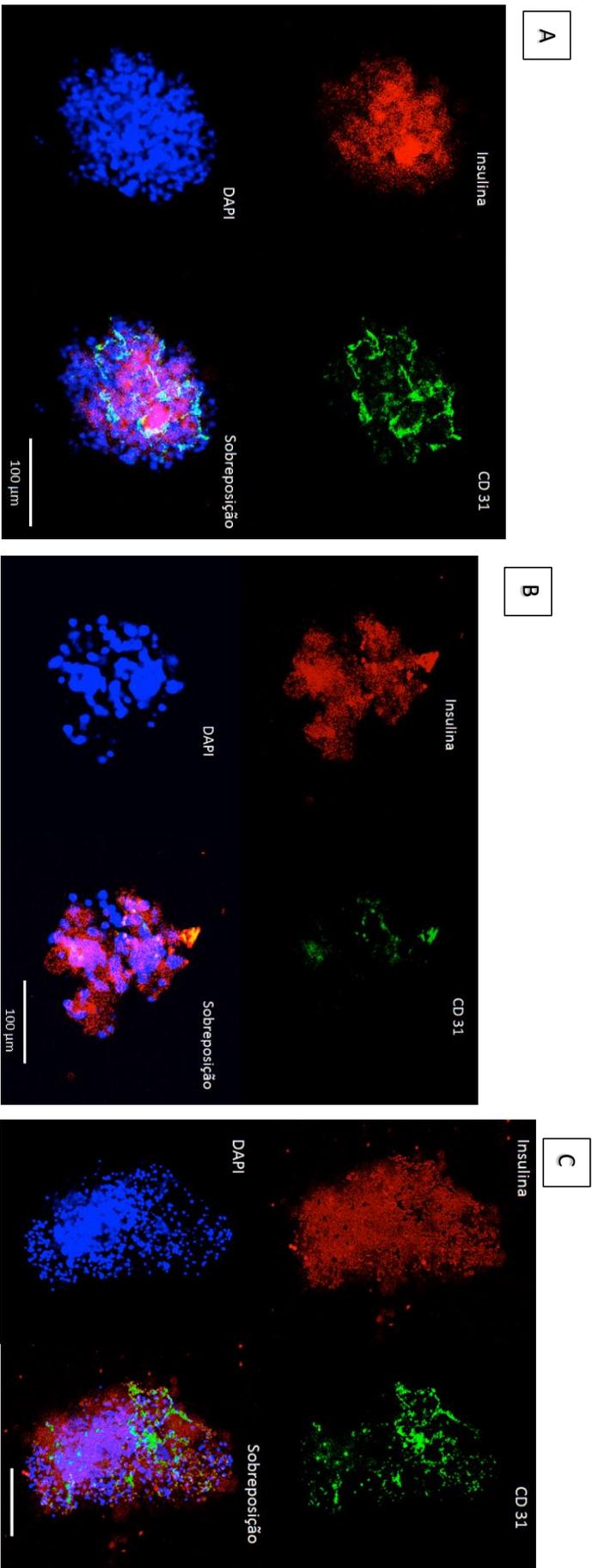


Fig 26. Imunofluorescência de insulina (vermelho) e CD31 (verde) em ilhotas pancreáticas de ratos. Núcleos corados em azul com DAPI. A: Ilhotas recém isoladas; **B:** Meio CMRL 1066; **C:** MC hipóxia. Resultado representativo, N=1. Barra de escala = 100 µm.

Após a quantificação dos dados obtidos (figura 27), ficou evidenciado uma maior expressão de insulina em ilhotas cultivadas no MC hipóxia (95,14%), em comparação ao meio CMRL 1066 (72%) e ilhotas recém isoladas (48,95%). Os dados também revelaram que a maior expressão de CD31 em células endoteliais nas ilhotas ocorreu quando cultivadas no MC hipóxia (23,45%), em comparação ao meio CMRL 1066 (5,0%) e ilhotas recém isoladas (19,00%).

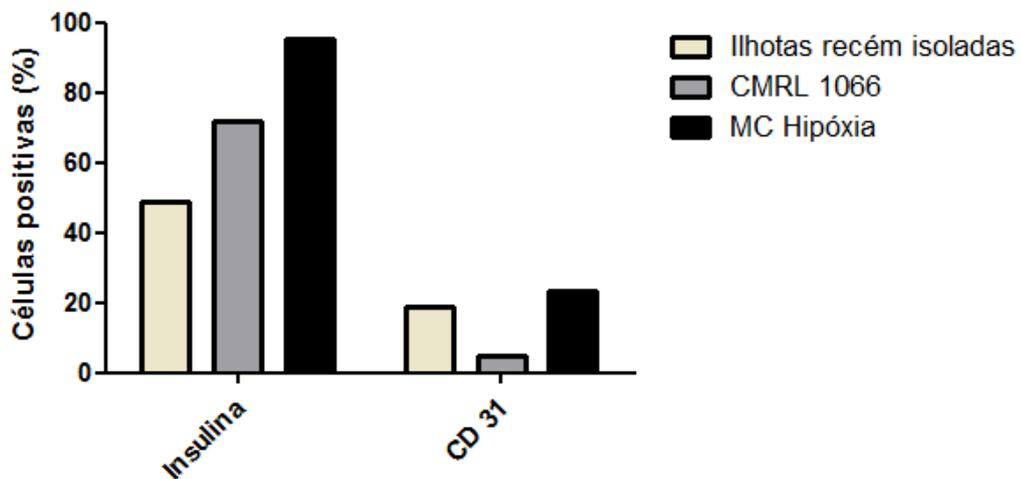


Fig 27. Quantificação da marcação para insulina e CD31. Ilhotas recém isoladas, ilhotas cultivadas com meio CMRL 1066 e ilhotas cultivadas com meio condicionado hipóxia. Resultado representativo, N=1.

5 DISCUSSÃO

Desde o primeiro relato clínico em 1977 por Najarian et al. o transplante de ilhotas pancreáticas para o tratamento de DT1 têm sido foco de inúmeras pesquisas. As CTMs surgem como uma alternativa para melhorar a eficiência do transplante devido a sua capacidade de reparo e regeneração de tecidos. Inúmeros trabalhos testando o co-cultivo de CTMs humanas e/ou murinas em ilhotas têm sido realizados (FUGGLE et al., 2010; BELL et al., 2012; RACKHAM et al., 2013; FRANSSON et al., 2015; UNSAL et al., 2015; REKITTKE et al., 2016). Todavia, a perda da rede vascular intra ilhotas pós transplante associada com a redução da viabilidade, indicam a necessidade de novos esforços para aplicação desta terapia a nível clínico.

Os resultados obtidos neste trabalho descrevem a presença de CTMs na fração de CMMO de pacientes falciformes. As CTMs isoladas e caracterizadas cresceram em monocamadas aderidas ao plástico, apresentaram morfologia fibroblastóide, exibiram marcadores fenotípicos de população mesenquimal e capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica. Estes resultados são concordantes com trabalhos recentes que também isolaram e caracterizaram CTMs estromais derivadas da medula óssea de pacientes falciformes (LEBOUVIER et al., 2015; DALTRO et al., 2015). Lebouvier et al. (2015) demonstraram que CTM-MO oriundas de pacientes falciformes exibiam marcadores fenotípicos de população mesenquimal similar a CTM-MO de pacientes controle saudáveis.

Corroborando com os nossos resultados, Daltro et al. (2015) demonstraram que CTM-MO derivadas de pacientes falciformes apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica quando induzidas em meio adequado, bem como estas células secretaram fatores de crescimento envolvidos no processo de reparo tecidual, sugerindo que estas células são candidatas promissoras para aplicação na medicina regenerativa. Em nosso trabalho, nós obtivemos sucesso no isolamento e expansão de CTM em 33% das amostras de medula óssea. Acredita-se que isso foi devido à falta de condições ideais de cultivo, como lotes de SFB vencidos, oscilações da pressão parcial de CO₂ na estufa e contaminações envolvendo bactérias e leveduras. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que CTM-MO derivadas de pacientes falciformes atenderam aos critérios de classificação descritos por Dominici et al. (2006).

As CTMs de MO apresentaram capacidade de expansão ao longo de 70 dias. O tempo de dobramento cumulativo das CTMs foi igual a $2,20 \pm 0,46$ dias, e o número de dobramento populacional total das CTMs foi ($21,07 \pm 4,25$). Nossos resultados foram similares aos encontrados por Bartmann et al. (2007) onde o tempo de dobramento resultante das CTM-MO foi $2,7 \pm 0,5$ dias. Este estudo também demonstrou que a densidade celular no instante do plaqueamento não afeta as propriedades das CTMs, incluindo a expressão de marcadores de superfície celular. O trabalho realizado por Tsai et al. (2011) mostrou que CTM-MO condicionadas em hipóxia apresentam uma maior eficiência na expansão comparada as CTMs condicionadas em normóxia. O artigo de revisão publicado por Ikebe & Suzuki (2014) relata que a densidade de plaqueamento deve ser 3000 células/cm² para aplicação na área clínica. Concluímos que as CTMs utilizadas neste trabalho apresentaram alta capacidade de expansão e atendem os pré-requisitos para serem utilizadas em protocolos de terapia regenerativa.

As CTMs apresentaram-se viáveis após 48h ao condicionamento em hipóxia pela coloração com calceína AM. O meio condicionado das CTMs incubadas em hipóxia apresentou elevados níveis protéicos e alta atividade de fosfatase alcalina, indicando alta atividade secretória e corroborando estudos que indicam a utilização desta estratégia em CTMs visando o aumento dos efeitos parácrinos (C.-P. CHANG et al., 2013; YU et al., 2013; CHEN et al., 2014; EDWARDS et al., 2014; BADER et al., 2015). Maiores concentrações proteicas no meio condicionado após 48 horas é possivelmente explicado por uma adaptação celular ao ambiente de hipóxia. A literatura descreve que o pré-condicionamento de CTMs a hipóxia induz a produção de ROS na mitocôndria que passa a desempenhar um papel efetivo na citoproteção (YU et al., 2013), além de não alterar a viabilidade celular das CTMs como demonstrado em outros estudos (HUNG et al., 2012; BADER et al., 2015).

O potencial angiogênico *in vitro* do MC foi avaliado por meio da capacidade de migração, proliferação e formação de tubos pelas HUVECs. Nossos resultados demonstraram que o MC hipóxia promoveu maior capacidade migratória e proliferativa das HUVECs comparado ao MC normóxia. Estes resultados corroboram com os resultados de outros trabalhos utilizando MC de medula óssea e cordão umbilical respectivamente (CHEN et al., 2014; BADER et al., 2015). Os resultados obtidos neste trabalho revelam que na presença do MC hipóxia, as células endoteliais apresentaram

maior capacidade de formação de tubos comparado ao MC normóxia. Vários estudos *in vitro* examinaram o papel das células de origem mesenquimal, principalmente fibroblastos, na tubulogênese e brotamento de células endoteliais. A formação de tubos em géis tridimensionais (3D) de fibrina foram estritamente dependentes da distância entre os fibroblastos e as células endoteliais, indicando que fatores difusíveis derivados dos fibroblastos são necessários para tubulogênese (GRIFFITH et al., 2005; NEWMAN et al., 2011). Sabe-se que o processo angiogênico é decorrente de um equilíbrio entre a secreção de fatores pró e anti angiogênicos, e recentes publicações demonstram esse efeito (BURAVKOVA et al., 2014; KWON et al., 2014). Recentemente, a análise proteômica do perfil secretório de fibroblastos e células musculares lisas identificou fatores essenciais para o brotamento e tubulogênese de HUVECS *in vitro*: PCOLCE, HGF, fibronectina, SPARC, IGFBP7 e betaIG-H3 (NEWMAN et al., 2013). Nossos resultados são originais ao descreverem o brotamento e tubulogênese de HUVECs apenas na presença de MC de CTMs. Nossos resultados também identificaram alguns destes fatores expressos nas CTMs ou presentes no MC (ver a seguir). A formação do lúmen endotelial corroborou dados da literatura quando CTMs pré-tratadas em ambiente de hipóxia são submetidas ao contato com células endoteliais (J. LIU et al., 2015).

Os dados da análise de expressão de p-Akt e Akt por western blot, revelaram que em apenas 5 minutos o MC hipóxia induziu a fosforilação de Akt em (p-Akt, estado ativo fosforilado). Inicialmente, S.-C. Hung et al. (2007) descreveu que o MC hipóxia de CTMs ativa as vias PI3K-Akt e ERK em células endoteliais aórticas humanas pelo efeito combinado de vários fatores produzidos pelas CTMs, resultando em inibição da apoptose, aumento da sobrevivência e estimulação da angiogênese. O trabalho apresentado por Kim et al. (2011), revelou que a hipóxia induz a produção de ROS que desencadeia a expressão de Akt e ERK1/2 aumentando a proliferação e migração celular. Kwon et al. (2014) mostrou que o MC hipóxia de CTMs foi responsável pelo aumento na fosforilação de ERK, FAK e Akt-dependente da ativação de eNOS em HUVECs, os quais são importantes mediadores da proliferação e migração em células endoteliais.

A análise por qPCR das CTMs e análise proteômica do MC hipóxia, revelaram a expressão de diversas moléculas relacionadas a reparo tecidual, migração e angiogênese. O resultado obtido através do qPCR das CTMs além de confirmar a

expressão de marcadores de superfície nas CTMs, indicou que estas células expressaram genes envolvidos na formação do lúmen em células endoteliais, tais como, PCOLCE, SPARC, Bigh3 e FGF, similar ao estudo realizado com fibroblastos por, Newman et al. (2011). A avaliação do perfil proteômico dos MCs hipóxia das CTMs, revelou a elevada concentração de Activina A, angiogenina, angiopoietina-1, HGF, IGFBP-2, MCP-1, PTX3, PF4, TIMP-1, trombospondina 1 e VEGF. Newman et al. (2011) demonstrou que a combinação das proteínas angiopoietina-1, angiogenina, HGF entre outras são necessárias coletivamente para formação de tubos em células endoteliais. A secreção e produção de angiogenina em CTMs é estimulada pela hipóxia (HARTMANN et al., 1999). Esta proteína é absorvida por endocitose mediada por receptor pelas células endoteliais e translocada para o núcleo onde promove uma ampla variedade de respostas incluindo proliferação, migração, invasão celular e formação de tubo. Têm sido proposto que angiogenina estimula a expressão de MMP2 (proteínas com papel crucial na invasão celular) através da via de sinalização MAPK/ERK (MIYAKE et al., 2015).

O trabalho desenvolvido por, H. Liu et al., (2008), demonstrou que TIMP-1 derivado de fibroblastos, aumenta a formação de vasos em HUVECs, além do seu papel atribuído no processo de migração celular (EDWARDS et al., 2014). Os resultados publicado por Kwon et al. (2014) foram consistentes com os nossos resultados quanto a avaliação de fatores secretados por CTMs que possuem papel chave no processo angiogênico. Foi demonstrado assim como em nosso trabalho, a elevada expressão de VEGF, HGF, MCP-1, como fatores importantes para a revascularização de membros isquêmicos em camundongos, atuando através da ativação das vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK. Proteínas encontradas no meio condicionado das CTMs em hipóxia, tal como IGFBP-2, podem atuar como *enhancers* do promotor do gene de VEGF, contribuindo para a promoção da angiogênese em modelos de neuroblastoma (AZAR et al., 2011). Já PTX3 atua como um importante fator no reparo de lesões promovido pelas CTMs (CAPPUZELLO et al., 2015). A presença destas proteínas no meio condicionado aliado com o que vêm sendo descrito na literatura, ratificam o potencial parácrino das CTMs visando sua utilização em modelos de reparo e regeneração tecidual.

Nossos resultados demonstraram que o MC hipóxia aumentou a viabilidade das ilhotas e manteve expressão de insulina em células beta e de CD31 em células endoteliais durante o período de cultivo, comparado com as condições controle. As ilhotas pancreáticas isoladas e cultivadas com o MC apresentaram redução nos indicadores de morte celular, provavelmente devido à presença de fatores proteicos pró-sobrevivência secretados pelas CTMs. O meio condicionado hipóxia também foi responsável pela manutenção da expressão de insulina pelas células β e foi observado também a presença de células endoteliais na histoarquitetura das ilhotas após o isolamento e cultivo com MC hipóxia.

Estudos anteriores demonstraram que após isolamento e 24h de cultivo em condições controle, as ilhotas pancreáticas isoladas reduziram a expressão de CD31 e de insulina, através de um mecanismo de sinalização mediado por ALK5 (CLARKIN et al., 2013; KING et al., 2015). Outros trabalhos sugerem que em modelos *in vivo*, a interação CTM-ilhota contribui para a melhora vascular e viabilidade das ilhotas (FRANSSON et al., 2015; FUGGLE et al., 2010; SHIN et al., 2015). Nosso trabalho demonstrou que o cultivo *in vitro* de ilhotas pancreáticas com meio condicionado de CTM-MO em hipóxia promove a viabilidade e manutenção da histoarquitetura de células endoteliais nas ilhotas. A presença de fatores proteicos no MC provavelmente está envolvido nestes efeitos. Concluimos, que o MC das CTMs de medula óssea induzidas a hipóxia, demonstraram potencial angiogênico e contribuíram para a manutenção da viabilidade das ilhotas pancreáticas através da presença de fatores protéicos solúveis.

6 CONCLUSÕES

- As células isoladas da medula óssea preencheram os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para uma CTM-MO.
- Os meios condicionados obtidos em condições de normóxia e hipóxia foram capazes de aumentar a viabilidade, proliferação e induzir a migração e brotamento angiogênico em HUVECs.
- O meio condicionado de hipóxia induziu maior capacidade angiogênica em HUVECs comparado ao meio condicionado de normóxia.
- A presença de fatores solúveis no meio condicionado de CTM-MO em hipóxia corroborou com a maior viabilidade e preservação da histoarquitetura de ilhotas pancreáticas recém isoladas.
- A utilização de MC na terapia celular poderia minimizar a variabilidade biológica da terapia baseada em células, além de permitir uma dosagem precisa de fatores parácrinos purificados, levando ao desenvolvimento de uma terapia com resultados controláveis e previsíveis.

7 REFERÊNCIAS

- American Diabetes Association. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 36(SUPPL.1), 67–74.
- Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell*, 21, 193–215.
- Azar, W. J., Azar, S. H. X., Higgins, S., Hu, J. F., Hoffman, A. R., Newgreen, D. F., ... Russo, V. C. (2011). IGFBP-2 enhances VEGF gene promoter activity and consequent promotion of angiogenesis by neuroblastoma cells. *Endocrinology*, 152(9), 3332–3342.
- Bader, A. M., Klose, K., Bieback, K., Korinth, D., Schneider, M., Seifert, M., ... Stamm, C. (2015). Hypoxic preconditioning increases survival and pro-Angiogenic capacity of human cord blood mesenchymal stromal cells in vitro. *PLoS ONE*, 10(9).
- Balamurugan, A. N., Naziruddin, B., Wease, S., Messinger, S., & Ricordi, C. (2014). Islet Product Characteristics and Factors Related to Successful Human Islet Transplantation From the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) 1999 – 2010. *American Journal of Transplantation*, 14, 2595–2606.
- Ballian, N., & Brunicaudi, F. C. (2007). Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. In *World Journal of Surgery* (Vol. 31, pp. 705–714).
- Bartmann, C., Rohde, E., Schallmoser, K., Pürstner, P., Lanzer, G., Linkesch, W., & Strunk, D. (2007). Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion*, 47(8), 1426–1435.
- Barton, F. B., Rickels, M. R., Alejandro, R., Hering, B. J., Wease, S., Naziruddin, B., ... Shapiro, A. M. J. (2012). Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care*, 35, 1436–1445.
- Bell, G. I., Meschino, M. T., Hughes-Large, J. M., Broughton, H. C., Xenocostas, A., & Hess, D. a. (2012). Combinatorial Human Progenitor Cell Transplantation Optimizes Islet Regeneration Through Secretion of Paracrine Factors. *Stem Cells and Development*, 21(11), 1863–1876.
- Bhang, S. H., Jung, M. J., Shin, J.-Y., La, W.-G., Hwang, Y. H., Kim, M. J., ... Lee, D. Y. (2013). Mutual effect of subcutaneously transplanted human adipose-derived stem cells and pancreatic islets within fibrin gel. *Biomaterials*, 34(30), 7247–56.
- Brissova, M., Fowler, M., Wiebe, P., Shostak, A., Shiota, M., Radhika, A., ... Powers, A. C. (2004). Intra-islet Endothelial Cells Contribute to Revascularization of Transplanted Pancreatic Islets. *Diabetes*, 53(5), 1318–1325.
- Bruni, A., Gala-Lopez, B., Pepper, A. R., Abualhassan, N. S., & James Shapiro, A. M. (2014). Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: Recent advances and future challenges. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 211–223.

- Buravkova, L. B., Andreeva, E. R., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2014). Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? *Mitochondrion*, 19(Part A), 105–112.
- Bydlowski, P. S.; Debes, A. A.; Maselli, M. F. L.; Janz, L. F. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 31 p. 25-35, 2009.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P.-O., & Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2334–9.
- Cao, X.-K., Li, R., Sun, W., Ge, Y., & Liu, B.-L. (2016). Co-combination of islets with bone marrow mesenchymal stem cells promotes angiogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 78, 156–64.
- Cappuzzello, C., Doni, A., Dander, E., Pasqualini, F., Nebuloni, M., Bottazzi, B., ... D'Amico, G. (2015). Mesenchymal Stromal Cell-Derived PTX3 Promotes Wound Healing via Fibrin Remodeling. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(April), 293–300.
- Chang, C.-P., Chio, C.-C., Cheong, C.-U., Chao, C.-M., Cheng, B.-C., & Lin, M.-T. (2013). Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 124(3), 165–76.
- Chang, W. G., Andrejcsk, J. W., Kluger, M. S., Saltzman, W. M., & Pober, J. S. (2013). Pericytes modulate endothelial sprouting. *Cardiovascular Research*, 100(3), 492–500.
- Chen, L., Xu, Y., Zhao, J., Zhang, Z., Yang, R., Xie, J., ... Qi, S. (2014). Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS ONE*, 9(4).
- Chevallier, N., Anagnostou, F., Zilber, S., Bodivit, G., Maurin, S., Barrault, A., (2010). Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials*, 31(2), 270–278.
- Clarkin, C. E., King, A. J., Dhadda, P., Chagastelles, P., Nardi, N., Wheeler-Jones, C. P., & Jones, P. M. (2013). Activin receptor-like kinase 5 inhibition reverses impairment of endothelial cell viability by endogenous islet mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*, 31(3), 547–559.
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J., Jo, A., & Lenzen, S. (2005). Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 54(December 2005), 97–107.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., ... P? ? ault, B. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301–313.
- Da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I., & Nardi, N. B. (2008). In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 26(9), 2287–2299.

- Daltro, G. C., Fortuna, V., de Souza, E. S., Salles, M. M., Carreira, A. C., Meyer, R., ... Borojevic, R. (2015). Efficacy of autologous stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head in sickle cell disease: a five-year follow-up study. ***Stem Cell Research & Therapy***, 6(1), 110.
- Davis, J., Crampton, S. P., & Hughes, C. C. W. (2007). Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). ***Journal of Visualized Experiments: JoVE***, e183.
- Derakhshan, B., Harrison, K. D., Miao, Q. R., & Sessa, W. C. (2008). Chapter 1 Approaches for Studying Angiogenesis-Related Signal Transduction. ***Methods in Enzymology***.
- Di Santo, S., Yang, Z., von Ballmoos, M. W., Voelzmann, J., Diehm, N., Baumgartner, I., & Kalka, C. (2009). Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: In vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. ***PLoS ONE***, 4(5).
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. ***Cytotherapy***, 8(4), 315–7.
- Edwards, S. S., Zavala, G., Prieto, C. P., Elliott, M., Martinez, S., Egaa, J. T., ... Palma, V. (2014). Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration. ***Angiogenesis***, 17(4), 851–866.
- Figliuzzi, M., Bonandrini, B., Silvani, S., & Remuzzi, A. (2014). Mesenchymal stem cells help pancreatic islet transplantation to control type 1 diabetes. ***World Journal of Stem Cells***, 6(2), 163–72.
- Fransson, M., Brännström, J., Duprez, I., Essand, M., Le Blanc, K., Korsgren, O., & Magnusson, P. U. (2015). Mesenchymal stromal cells support endothelial cell interactions in an intramuscular islet transplantation model. ***Regenerative Medicine Research***, 3(1), 1.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. ***Experimental Hematology***, 4(5), 267–74.
- Fuggle, S. V., Allen, J. E., Johnson, R. J., Collett, D., Mason, P. D., Dudley, C., ... Watson, C. J. E. (2010). Factors affecting graft and patient survival after live donor kidney transplantation in the UK. ***Transplantation***, 89(6), 694–701.
- Geevarghese, A., & Herman, I. M. (2014). Pericyte-endothelial crosstalk: Implications and opportunities for advanced cellular therapies. ***Translational Research***, 163(4), 296–306.
- Gleason, C.E., Gonzalez, M., Harmon, J.S., Robertson, R.P., 2000. Determinants of glucose toxicity and its reversibility in the pancreatic islet beta-cell line, HIT-T15. ***Am J Physiol Endocrinol Metab***. 279, E997-1002.

- Griffith, C. K., & George, S. C. (2009). The effect of hypoxia on in vitro prevascularization of a thick soft tissue. *Tissue Engineering. Part A*, 15(9), 2423–2434.
- Griffith, C. K., Miller, C., Sainson, R. C. a, Calvert, J. W., Jeon, N. L., Hughes, C. C. W., & George, S. C. (2005). Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Engineering*, 11(1-2), 257–66.
- Haque, N., Rahman, M. T., Abu Kasim, N. H., & Alabsi, A. M. (2013). Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Hartmann, A., Kunz, M., Köstlin, S., Gillitzer, R., Toksoy, A., Bröcker, E. B., & Klein, C. E. (1999). Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Research*, 59(7), 1578–1583.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48(2), 422–427.
- Hung, S.-C., Pochampally, R. R., Chen, S.-C., Hsu, S.-C., & Prockop, D. J. (2007). Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells*, 25(9), 2363–2370.
- Hung, S.-P., Ho, J. H., Shih, Y.-R. V, Lo, T., & Lee, O. K. (2012). Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 30(2), 260–6.
- Ikebe, C., & Suzuki, K. (2014). Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: Optimization of cell preparation protocols. *BioMed Research International*, 2014(1).
- Ito, T., Itakura, S., Todorov, I., Rawson, J., Asari, S., Shintaku, J., ... Mullen, Y. (2010). Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function. *Transplantation*, 89(12), 1438–1445.
- Kang, S., Kim, S.-M., & Sung, J.-H. (2014). Cellular and molecular stimulation of adipose-derived stem cells under hypoxia. *Cell Biology International*, 38(5), 553–62.
- Kido, Y., Burks, D.J., Withers, D., Bruning, J.C., Kahn, C.R., White, M.F., Accili, D., 2000. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest*. 105, 199-205.
- Kim, H. O., Choi, S. M., & Kim, H. S. (2013). Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 10(3), 93–101.
- Kim, J. H., Park, S.-H., Park, S. G., Choi, J.-S., Xia, Y., & Sung, J.-H. (2011). The pivotal role of reactive oxygen species generation in the hypoxia-induced stimulation of adipose-derived stem cells. *Stem Cells and Development*, 20(10), 1753–61.

- King, A. J. F., Clarkin, C. E., Austin, A. L. F., Ajram, L., Dhunna, J. K., Jamil, M. O., ... Jones, P. M. (2015). ALK5 inhibition maintains islet endothelial cell survival but does not enhance islet graft revascularisation or function. *Hormone and Metabolic Research*, 47(1), 78–83.
- Krampera, M., Franchini, M., Pizzolo, G., & Aprili, G. (2007). Mesenchymal stem cells: From biology to clinical use. *Blood Transfusion*, 5(3), 120–129.
- Kwon, H. M., Hur, S. M., Park, K. Y., Kim, C. K., Kim, Y. M., Kim, H. S., ... Kim, Y. M. (2014). Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascular Pharmacology*, 63(1), 19–28.
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 887, 41–47.
- Lebouvier, A., Poignard, A., Coquelin-Salsac, L., Lotot, J., Homma, Y., Jullien, N., ... Rouard, H. (2015). Autologous bone marrow stromal cells are promising candidates for cell therapy approaches to treat bone degeneration in sickle cell disease. *Stem Cell Research*, 15(3), 584–594.
- Lee, C.-N., Cheng, W.-F., Chang, M.-C., Su, Y.-N., Chen, C., & Hsieh, F.-J. (2005). Hypoxia-induced apoptosis in endothelial cells and embryonic stem cells. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 10(4), 887–894.
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2(2), 329–333.
- Lindner, U., Kramer, J., Rohwedel, J., & Schlenke, P. (2010). Mesenchymal stem or stromal cells: Toward a better understanding of their biology? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37(2), 75–83.
- Liu, H., Chen, B., & Lilly, B. (2008). Fibroblasts potentiate blood vessel formation partially through secreted factor TIMP-1. *Angiogenesis*, 11(3), 223–234.
- Liu, J., Hao, H., Xia, L., Ti, D., Huang, H., Dong, L., ... Han, W. (2015). Hypoxia pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells facilitates angiogenesis by improving the function of endothelial cells in diabetic rats with lower ischemia. *PLoS ONE*, 10(5), 1–18.
- Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 40(2), 294–309.
- Maumus, M., Jorgensen, C., & Noël, D. (2013). Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: role of secretome and exosomes. *Biochimie*, 95(12), 2229–34.
- McCloy, R. A., Rogers, S., Caldon, C. E., Lorca, T., Castro, A., & Burgess, A. (2014). Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*, 13(9), 1400–1412.
- MEIRELLES, S. L.; CAPLAN, I. A.; NARDI, B. N. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. v. 26, p. 2287–2299, 2008.

Meyer, C. (2010). Final answer: Ghrelin can suppress insulin secretion in humans, but is it clinically relevant? *Diabetes*, 59(11), 2726–2728.

Miyake, M., Goodison, S., Lawton, A., Gomes-Giacoa, E., & Rosser, C. (2015). Angiogenin promotes tumoral growth and angiogenesis by regulating matrix metalloproteinase-2 expression via the ERK1/2 pathway. *Oncogene*, 48(Suppl 2), 890–901.

Muir, K. R., Lima, M. J., Docherty, H. M., & Docherty, K. (2014). Cell Therapy for Type 1 Diabetes. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 107(January), 253–259.

Mundra, V., Wu, H., & Mahato, R. I. (2013). Genetically modified human bone marrow derived mesenchymal stem cells for improving the outcome of human islet transplantation. *PloS One*, 8(10), e77591.

Nakatsu, M. N., & Hughes, C. C. W. (2008). Chapter 4 An Optimized Three-Dimensional In Vitro Model for the Analysis of Angiogenesis. *Methods in Enzymology*, 443(08), 65–82.

Newman, A. C., Chou, W., Welch-Reardon, K. M., Fong, A. H., Popson, S. A., Phan, D. T., ... Hughes, C. C. W. (2013). Analysis of stromal cell secretomes reveals a critical role for stromal cell-derived hepatocyte growth factor and fibronectin in angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(3), 513–522.

Newman, A. C., Nakatsu, M. N., Chou, W., Gershon, P. D., & Hughes, C. C. W. (2011). The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Molecular Biology of the Cell*, 22(20), 3791–3800.

Noble, J. A., & Erlich, H. A. (2012). Genetics of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a007732–a007732.

Nyqvist, D., Köhler, M., Wahlstedt, H., & Berggren, P. O. (2005). Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts. *Diabetes*, 54(8), 2287–2293.

Nyqvist, D., Speier, S., Rodriguez-Diaz, R., Molano, R. D., Lipovsek, S., Rupnik, M., ... Berggren, P. O. (2011). Donor islet endothelial cells in pancreatic islet revascularization. *Diabetes*, 60(10), 2571–2577.

Oskowitz, A., McFerrin, H., Gutschow, M., Carter, M. L., & Pochampally, R. (2011). Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. *Stem Cell Research*, 6(3), 215–225.

Park, K. S., Kim, Y. S., Kim, J. H., Choi, B., Kim, S. H., Tan, A. H., ... Kim, K. W. (2010). Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation. *Transplantation*, 89(5), 509–517.

Pawitan, J. A. (2014). Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in 10.1155/2014/965849 Medicine. *BioMed Research International*, 2014, 965849.

Pfaffl, M. W. (2004). Relative quantification. *Real-Time PCR*, 63–82.

Pellegrini, S., Cantarelli, E., Sordi, V., Nano, R., & Piemonti, L. (2016). The state of the art of islet transplantation and cell therapy in type 1 diabetes. *Acta Diabetologica*, (February).

Peng, H., & Hagopian, W. (2006). Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 7(3), 149–62.

Pepper, A. R., Gala-Lopez, B., Ziff, O., & Shapiro, A. M. J. (2013). Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.

Rackham, C. L., Dhadda, P. K., Chagastelles, P. C., Simpson, S. J. S., Dattani, A. A., Bowe, J. E., ... King, A. J. F. (2013). Pre-culturing islets with mesenchymal stromal cells using a direct contact configuration is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. *Cytotherapy*, 15(4), 449–459.

Rekittke, N. E., Ang, M., Rawat, D., Khatri, R., & Linn, T. (2016). Regenerative Therapy of Type 1 Diabetes Mellitus: From Pancreatic Islet Transplantation to Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016, 3764681.

Ryan, E.A., et al. (2005). Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54: 2060–2069.

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., ... Bianco, P. (2007). Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*, 131(2), 324–336.

Salem, H. K., & Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells*, 28(3), 585–596.

Scharfmann, R., Xiao, X., Heimberg, H., Mallet, J., & Ravassard, P. (2008). Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors. *PLoS ONE*, 3(10), 1–8.

Shin, J., Jeong, J.-H., Han, J., Bhang, S. H., Jeong, G., Haque, M. R., ... Kim, B.-S. (2015). Transplantation of Heterospheroids of Islet Cells and Mesenchymal Stem Cells for Effective Angiogenesis and Antiapoptosis. *Tissue Engineering Part A*, 21(5-6), 1024–1035.

Sigma. (2002). Substrate Systems for Enzymes Detection. *Life Science*, 3(4), 2002.

Silveira, R., Ferreira L., Ginani F., Barboza C.; Influence of the laboratory protocol on the in yield of bone marrow mesenchymal stem cells (2010) *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*.

Sordi, V., & Piemonti, L. (2010). Mesenchymal stem cells as feeder cells for pancreatic islet transplants. *The Review of Diabetic Studies : RDS*, 7(2), 132–143.

- Tsai, C. C., Chen, Y. J., Yew, T. L., Chen, L. L., Wang, J. Y., Chiu, C. H., & Hung, S. C. (2011). Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*, *117*(2), 459–469.
- Unsal, I. O., Ginis, Z., Pinarli, F. A., Albayrak, A., Cakal, E., Sahin, M., & Delibasi, T. (2015). Comparison of Therapeutic Characteristics of Islet Cell Transplantation Simultaneous with Pancreatic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rats with Type 1 Diabetes Mellitus. *Stem Cell Reviews and Reports*, *11*(3), 526–532.
- Vajkoczy, P., Olofsson, M., Lehr, H. a, Leiderer, R., Hammersen, F., Arfors, K. E., & Menger, M. D. (1995). Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin. *The American Journal of Pathology*, *146*(6), 1397–1405.
- Venturini, M., Angeli, E., Maffi, P., Fiorina, P., Bertuzzi, F., Salvioni, M., ... Del Maschio, A. (2005). Technique, complications, and therapeutic efficacy of percutaneous transplantation of human pancreatic islet cells in type 1 diabetes: the role of US. *Radiology*, *234*(2), 617–624.
- Wan, C., Shao, J., Gilbert, S. R., Riddle, R. C., Long, F., Johnson, R. S., ... Clemens, T. L. (2010). Role of HIF-1 alpha in skeletal development. *Skeletal Biology and Medicine*, *1192*, 322–326.
- Wittig, C., Laschke, M. W., Scheuer, C., & Menger, M. D. (2013). Incorporation of Bone Marrow Cells in Pancreatic Pseudoislets Improves Posttransplant Vascularization and Endocrine Function. *PLoS ONE*, *8*(7).
- Yu, S. P., Wei, Z., & Wei, L. (2013). Preconditioning Strategy in Stem Cell Transplantation Therapy. *Translational Stroke Research*, *4*(1), 76–88.
- Zanone, M. M., Favaro, E., & Camussi, G. (2008). From endothelial to beta cells: insights into pancreatic islet microendothelium. *Current Diabetes Reviews*, *4*(1), 1–9.
- Zuk, P. a, Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, a J., ... Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, *7*(2), 211–228.

8 ANEXO

VIA DO PACIENTE

Estudo: Avaliação *in vitro* do potencial angiogênico de células tronco mesenquimais multipotentes como ferramenta no transplante de ilhotas pancreáticas humanas.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Coleta de Cordão Umbilical

Para ser entregue à parturiente ANTES de sua entrada na sala de parto.

Projeto: “Avaliação *in vitro* do potencial angiogênico de células tronco mesenquimais multipotentes como ferramenta no transplante de ilhotas pancreáticas humanas.”

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente: _____
2. Documento de Identidade: _____
3. Data Nascimento: _____
4. Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____
 CEP: _____ Telefone: _____

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Por favor, leia o formulário cuidadosamente. Você pode fazer perguntas sobre o propósito da pesquisa, os possíveis riscos e benefícios, seus direitos como um voluntário, e qualquer coisa a mais sobre a pesquisa ou este formulário que não estiver claro. Quando nós tivermos respondido todas as suas perguntas, você pode decidir se você quer realizar a doação ou não. Nós lhe daremos uma cópia deste formulário para seus registros.

PROPÓSITO E BENEFÍCIOS

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa realizada pela Universidade Federal da Bahia que visa estudar uma nova forma de cultivo de células em laboratório. Antes de participar deste estudo, você precisa entender a que ele se propõe.

Após o nascimento de seu (sua) filho(a), a placenta, o cordão umbilical e o sangue do cordão umbilical são rotineiramente desprezados. Você pode ajudar na pesquisa de células tronco destes tecidos, doando o sangue e o cordão umbilical de seu (sua) filho(a) que irá nascer.

A doação é um ato simples e livre, sem prejuízo para seu atendimento médico, e para isso basta que você expresse sua vontade através da assinatura deste termo de consentimento. A doação não implicará em nenhuma despesa adicional para você ou sua família e nem o sangue e o cordão colhidos serão utilizados para fins lucrativos.

VIA DO PACIENTE

Estudo: Avaliação *in vitro* do potencial angiogênico de células tronco mesenquimais multipotentes como ferramenta no transplante de ilhotas pancreáticas humanas. De acordo com nossa legislação, é proibido receber qualquer forma de remuneração ou recompensa pela doação de sangue, tecidos ou órgãos.

OBJETIVO: O objetivo da doação é obter células saudáveis que seriam descartadas junto com o cordão umbilical e serão testadas em laboratório para avaliar a capacidade de estimular a sobrevivência e o brotamento de novos vasos sanguíneos.

MÉTODO DE COLETA DO CORDÃO UMBILICAL: ocorrerá na sala de parto, logo após o desligamento e quando o recém nascido já se encontrar aos cuidados do pediatra. O cordão será cortado próximo da placenta e será armazenado adequadamente para uso posterior. Não há possibilidade de causar nenhum dano ao recém nascido ou a você.

INTERRUPÇÃO DO ESTUDO: Você é livre para se recusar a participar ou retirar seu termo de doação a qualquer momento ou por decisão da equipe médico-científica. Você também poderá anular este consentimento, mesmo após tê-lo assinado, quando retornarmos algumas horas após o parto para buscar seu re-consentimento.

CUSTO DA DOAÇÃO: Não há nenhum custo para você ou seus parentes. Vocês não serão cobrados pela coleta, análise, armazenamento do sangue do cordão e do cordão umbilical do se (sua) filho (a).

BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DO ESTUDO: Não há benefícios clínicos para você ou seu (sua) filho(a) com este projeto científico. Ressaltamos que, uma vez feita a doação, o material colhido **NÃO PODERÁ SER REIVINDICADO FUTURAMENTE PELA DOADORA PARA USO PRÓPRIO OU PARA USO DE ALGUM MEMBRO DA FAMÍLIA. NÃO ESTARÁ DISPONÍVEL NENHUMA COMPENSAÇÃO FINANCEIRA PELA SUA PARTICIPAÇÃO.**

CONFIDENCIALIDADE: Seu médico irá tratar da sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu prontuário vai permanecer confidencial. Apenas a equipe do Estudo e a equipe assistencial terão acesso a ele. Possível publicação científica resultante deste estudo não a identificará, de modo algum, como participante.

INDENIZAÇÃO: Ao assinar este termo, você não abre mão de nenhum direito legal que você eventualmente teria em caso de conduta incorreta e enganosa de qualquer membro da equipe que fará a coleta do material doado durante o estudo.

VIA DO PACIENTE

Estudo: Avaliação *in vitro* do potencial angiogênico de células tronco mesenquimais multipotentes como ferramenta no transplante de ilhotas pancreáticas humanas.

Em caso de dúvidas poderei chamar o pesquisador responsável **Dr. Vitor Antônio Fortuna** no telephone (71) 9230 1514 / 3235 9682, ramal 226, email: vfort@ufba.br ou o **Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira**, situado à Rua do Limoeiro, no 137 – Nazaré, CEP 40.005-150 – Salvador, BA, no telefone (71) 3283 – 9275, email: cepmco@gmail.com.

CONSENTIMENTO ANTES DO PARTO:

Nestes termos, eu abaixo assinado

- entendi e concordo em doar o cordão e / ou sangue de cordão umbilical.
 não autorizo a doação do cordão e / ou sangue de cordão umbilical.

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Assinatura do Médico: _____

Pesquisador: _____

Telefone: _____

Local e data: _____

VIA DO PACIENTE

Estudo: Avaliação *in vitro* do potencial angiogênico de células tronco mesenquimais multipotentes como ferramenta no transplante de ilhotas pancreáticas humanas.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Coleta de Cordão Umbilical

Para ser entregue à parturiente 4 – 6 horas APÓS o término do parto.

Projeto: “Avaliação *in vitro* do potencial angiogênico de células tronco mesenquimais multipotentes como ferramenta no transplante de ilhotas pancreáticas humanas.”

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente: _____
2. Documento de Identidade: _____
3. Data Nascimento: _____
4. Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____
 CEP: _____ Telefone: _____

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Por favor, leia o formulário cuidadosamente. Você pode fazer perguntas sobre o propósito da pesquisa, os possíveis riscos e benefícios, seus direitos como um voluntário, e qualquer coisa a mais sobre a pesquisa ou este formulário que não estiver claro. Quando nós tivermos respondido todas as suas perguntas, você pode decidir se você quer realizar a doação ou não. Nós lhe daremos uma cópia deste formulário para seus registros.

PROPÓSITO E BENEFÍCIOS

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa realizada pela Universidade Federal da Bahia que visa estudar uma nova forma de cultivo de células em laboratório. Antes de participar deste estudo, você precisa entender a que ele se propõe.

Após o nascimento de seu (sua) filho(a), a placenta, o cordão umbilical e o sangue do cordão umbilical são rotineiramente desprezados. Você pode ajudar na pesquisa de células tronco destes tecidos, doando o sangue e o cordão umbilical de seu (sua) filho(a) que irá nascer.

A doação é um ato simples e livre, sem prejuízo para seu atendimento médico, e para isso basta que você expresse sua vontade através da assinatura deste termo de consentimento. A doação não implicará em nenhuma despesa adicional para você ou sua família e nem o sangue e o cordão colhidos serão utilizados para fins lucrativos.

VIA DO PACIENTE

Estudo: Avaliação *in vitro* do potencial angiogênico de células tronco mesenquimais multipotentes como ferramenta no transplante de ilhotas pancreáticas humanas. De acordo com nossa legislação, é proibido receber qualquer forma de remuneração ou recompensa pela doação de sangue, tecidos ou órgãos.

OBJETIVO: O objetivo da doação é obter células saudáveis que seriam descartadas junto com o cordão umbilical e serão testadas em laboratório para avaliar a capacidade de estimular a sobrevivência e o brotamento de novos vasos sanguíneos.

MÉTODO DE COLETA DO CORDÃO UMBILICAL: ocorrerá na sala de parto, logo após o desligamento e quando o recém nascido já se encontrar aos cuidados do pediatra. O cordão será cortado próximo da placenta e será armazenado adequadamente para uso posterior. Não há possibilidade de causar nenhum dano ao recém nascido ou a você.

INTERRUPÇÃO DO ESTUDO: Você é livre para se recusar a participar ou retirar seu termo de doação a qualquer momento ou por decisão da equipe médico-científica. Você também poderá anular este consentimento, mesmo após tê-lo assinado, quando retornarmos algumas horas após o parto para buscar seu re-consentimento.

CUSTO DA DOAÇÃO: Não há nenhum custo para você ou seus parentes. Vocês não serão cobrados pela coleta, análise, armazenamento do sangue do cordão e do cordão umbilical do se (sua) filho (a).

BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DO ESTUDO: Não há benefícios clínicos para você ou seu (sua) filho(a) com este projeto científico. Ressaltamos que, uma vez feita a doação, o material colhido **NÃO PODERÁ SER REIVINDICADO FUTURAMENTE PELA DOADORA PARA USO PRÓPRIO OU PARA USO DE ALGUM MEMBRO DA FAMÍLIA. NÃO ESTARÁ DISPONÍVEL NENHUMA COMPENSAÇÃO FINANCEIRA PELA SUA PARTICIPAÇÃO.**

CONFIDENCIALIDADE: Seu médico irá tratar da sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu prontuário vai permanecer confidencial. Apenas a equipe do Estudo e a equipe assistencial terão acesso a ele. Possível publicação científica resultante deste estudo não a identificará, de modo algum, como participante.

INDENIZAÇÃO: Ao assinar este termo, você não abre mão de nenhum direito legal que você eventualmente teria em caso de conduta incorreta e enganosa de qualquer membro da equipe que fará a coleta do material doado durante o estudo.

VIA DO PACIENTE

Estudo: Avaliação *in vitro* do potencial angiogênico de células tronco mesenquimais multipotentes como ferramenta no transplante de ilhotas pancreáticas humanas.

Em caso de dúvidas poderei chamar o pesquisador responsável **Dr. Vitor Antônio Fortuna** no telephone (71) 9230 1514 / 3235 9682, ramal 226, email: vfort@ufba.br ou o **Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira**, situado à Rua do Limoeiro, no 137 – Nazaré, CEP 40.005-150 – Salvador, BA, no telefone (71) 3283 – 9275, email: cepmco@gmail.com.

RE-CONSENTIMENTO 4 A 6 HORAS APÓS O PARTO:

Nestes termos, eu abaixo assinado

- entendi e ainda concordo em doar o cordão e / ou sangue de cordão umbilical.
 anulo o meu consentimento inicial para doação do cordão e / ou sangue de cordão umbilical.

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Assinatura do Médico: _____

Pesquisador: _____

Telefone: _____

Local e data: _____



MATERNIDADE CLIMÉRIO DE
OLIVEIRA ((MCO/UFBA))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in vitro do potencial angiogênico de células tronco mesenquimais multipotentes como ferramenta no transplante de ilhotas pancreáticas humanas.

Pesquisador: Vitor Antonio Fortuna

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 24991814.5.0000.5543

Instituição Proponente: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 625.059

Data da Relatoria: 23/04/2014

Apresentação do Projeto:

O investigador submete um novo TCLE chamando-o de ANTES do parto e corrigindo o endereço do CEP, retira segunda aprovação do paciente no mesmo documento e melhora a forma de contato do pesquisador. Apresenta um novo TCLE, chamando-o de TCLE PÓS-PARTO.

Não há outras mudanças na submissão da emenda.

Objetivo da Pesquisa:

Não muda.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Aperfeiçoa/melhora a forma de coleta de autorização.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não muda.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE: Contêm todos os elementos da RES466/12.

Recomendações:

Não muda.

Endereço: Rua do Limoeiro, 137

Bairro: Nazaré

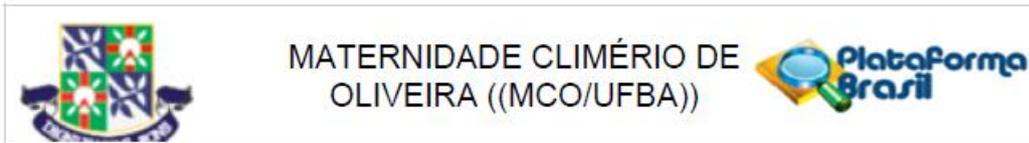
UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-9210

CEP: 40.005-150

E-mail: cepmco@ufba.br



Continuação do Parecer: 625.059

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SALVADOR, 24 de Abril de 2014

Assinador por:
Eduardo Martins Netto
(Coordenador)

Endereço: Rua do Limoeiro, 137

Bairro: Nazaré

UF: BA

Telefone: (71)3283-9210

Município: SALVADOR

CEP: 40.005-150

E-mail: cepmco@ufba.br