

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

PATRICIA MAYUMI KOSSUGUE

**Diferenciação de células-tronco embrionárias
murinas (*mESCs*) em células produtoras de insulina
(*IPCs*) e caracterização funcional do gene *Purkinje*
Cell Protein 4 (Pcp4) neste processo**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
8 de Abril de 2013

PATRICIA MAYUMI KOSSUGUE

**Diferenciação de células-tronco embrionárias
murinas (*mESCs*) em células produtoras de insulina
(*IPCs*) e caracterização funcional do gene *Purkinje*
Cell Protein 4 (Pcp4) neste processo**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K86d Kossugue, Patricia Mayumi
Diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (*mESCs*) em células produtoras de insulina (*IPCs*) e caracterização funcional do gene *Purkinje cell protein 4 (Pcp4)* neste processo / Patricia Mayumi Kossugue. -- São Paulo, 2013.
112p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Sogayar, Mari Cleide

1. Expressão gênica 2. Biologia celular 3. Diabetes mellitus : Tratamento 4. Células-tronco : Genética experimental I. T. II. Sogayar, Mari Cleide, orientador.

574.88 CDD



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (mESCs) em células produtoras de insulina (IPCs) e caracterização funcional do gene *Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)* neste processo”

PATRICIA MAYUMI KOSSUGUE

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
Orientadora e Presidente

Profa. Dra. Deborah Schechtman
IQ - USP

Profa. Dra. Daniela Sanches Basseres
IQ - USP

Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira Carramaschi
IB - USP

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso
FCM - Unicamp

SÃO PAULO
28 de maio de 2013

**Aos meus pais e minha irmã, sempre presentes na minha vida,
e ao meu irmão, que já cumpriu sua jornada.**

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço à Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, por ter me recebido no laboratório, pela orientação crítica e discussões construtivas, que contribuíram para o resultado final desta tese.

Ao Dr. Fernando Lojudice, meu supervisor (na prática, co-orientador), que esteve me ajudando no dia-a-dia, tirando minhas dúvidas, delineando experimentos, discutindo resultados, controlando meus momentos de euforia, ouvindo minhas várias lamentações, me incentivando tanto como supervisor, como um grande amigo.

Ao Dr. Renato Astorino Filho, por ter contribuído de forma significativa na realização da superexpressão do gene de interesse, construindo os vetores de expressão e montando o sistema *Tet-On*; além das conversas e sempre ter me incentivado nos momentos difíceis.

Ao Dr. Marcos Demasi, por me ensinar e tirar dúvidas sobre produção e transdução lentiviral, que foram técnicas importantes utilizadas neste trabalho.

À Gisella Grazioli, por ter me ajudado no microencapsulamento das células, me ensinado a diabetizar e realizar os transplantes nos camundongos.

À Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira (IBUSP), ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero (IB-Unicamp), à Dra. Elaine Bortoleti de Araújo (IPEN-CNEN/SP) por terem cedido gentilmente as linhagens USP-4, MIN-6 e AR42J, respectivamente.

Aos eng. Carlos Gaia da Silveira e Elizabeth Somessari (CTR-IPEN), sempre muito dispostos, por irradiar meus diversos lotes de *MEFs*, indispensáveis para a expansão das *mESCs* para os experimentos de diferenciação.

À toda equipe do biotério, por auxiliar nos cuidados com os camundongos diariamente.

À Rosângela Wailemann, por ter me ajudado no experimento de Fragmentação de DNA, passando as dicas para a realização deste experimento.

Ao Túlio Pereira, que, apesar de estar a pouco tempo no laboratório, teve a disposição de me ajudar no experimento de Fragmentação de DNA, operando o FACS; além das conversas e incentivo tanto para a tese como na vida pessoal.

À Dra. Maria Fernanda Forni e Marina Trombetta Lima, por terem me ajudado nas análises com o *FlowJo*, além das conversas e discussões construtivas que contribuíram para a tese. À Nanda, também, pela companhia nas viagens de congressos, em aventuras com histórias hilárias e inacreditáveis.

À Marluce Mantovani, por sempre estar disposta a “quebrar nosso galho”, colocando ordem em tudo no laboratório, para que nada falte; além da grande amizade, companhia em viagens, baladas e jantares.

À equipe técnica, Débora Cristina Lopes, Zizi Mendonça e Ricardo (apesar de não estar mais no lab), pela disposição em manter o laboratório sempre provido de reagentes, soluções e material.

À Roberta Ferrari Mourão, Ilana Gabanyi (agora na Vet) e Camila Leal, minhas “irmãs”, que sempre estiveram ao meu lado no dia-a-dia, contribuindo em discussões e “quebrando uns galhos”; também pela amizade e companhia em vários momentos de descontração.

À Cristiane Oliveira, não só pela ajuda na compra de reagentes e material, mas também pela amizade e companhia nos fins de semana.

À toda equipe do Nucel, tanto os que ainda estão, como os que já foram, por contribuírem, mesmo que indiretamente, em discussões na reunião, empréstimo de

reagentes e material, sugestões, ou até mesmo conversas de incentivo, almoços, *happy hours*, enfim, pelo ambiente agradável e construtivo que proporcionam ao laboratório.

Aos amigos, Chu, Érica, Gi Izzo, Katy, Naty e Poli, que ajudaram de formas indiretas, sendo sempre presentes e grandes amigos, apesar de nem sempre podermos nos encontrar pela correria do dia-a-dia.

Ao Bruno, que me deu forças nestes últimos dias de desespero para terminar a tese, pela companhia e conversas agradáveis, apesar de não entender muito bem o que se passava.

Aos amigos do adestramento, em especial ao instrutor Gilmar, que me proporcionaram momentos de distração e diversão com o meu “filho” Yoshi.

Ao Yoshi, meu “filhotinho”, que me ama incondicionalmente, mesmo quando eu o abandonava para ir aos congressos, sempre me recebendo com muita alegria, me fazendo companhia nos dias alegres e tristes, inclusive enquanto eu escrevia a tese.

A toda a minha família, sempre unida, tanto os “Kossugues” como os “Kodamas”, que são exemplos de como deve ser uma família. A todos os primos e primas, tios e tias, e as avós, que sempre me proporcionaram momentos inesquecíveis e de muita diversão, mesmo nos momentos mais difíceis da nossa família. Em especial, “domo arigatou gozaimasu” à família da Márcia e Evaldo, que me receberam de braços abertos e muito carinho em sua casa no Japão, quando fui ao *ISSCR*.

Por último e não menos importante, aos meus pais, que contribuíram na construção de tudo que tenho hoje, pelo amor e carinho, incentivo e disciplina, sendo grandes exemplos na minha vida. À minha irmã, pela companhia e

preocupação, tanto na vida profissional como na pessoal, sem nossa união, não conseguiríamos superar os momentos difíceis. Também ao Sancho, meu cunhado, por toda a ajuda e “me alimentar” aos fins de semana. Por fim, ao meu irmão, que apesar de não estar presente em corpo, sempre foi um exemplo de como aproveitar a vida ao máximo fazendo tudo que me dá prazer.

Ao apoio financeiro, FAPESP, CNPq, BNDES, MS-DECIT, MCTI.

**“A Felicidade não se resume na ausência de problemas,
mas sim na sua capacidade de lidar com eles.”**

(Albert Einstein)

RESUMO

Kossugue P. M. **Diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (*mESCs*) em células produtoras de insulina (*IPCs*) e caracterização funcional do gene *Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)* neste processo.** 2013. 112p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Fontes alternativas de células β têm sido estudadas para o tratamento de Diabetes mellitus tipo 1, dentre as quais a mais promissora consiste das células-tronco diferenciadas em células produtoras de insulina (*IPCs*). Alguns trabalhos demonstram a capacidade de células-tronco embrionárias murinas (*mESCs*) de formarem estruturas semelhantes a ilhotas pancreáticas, porém, os níveis de produção de insulina são insuficientes para a reversão do diabetes em camundongos diabetizados. Este trabalho visa desenvolver um protocolo adequado para geração de *IPCs* e contribuir para a identificação e caracterização funcional de novos genes associados à organogênese pancreática.

Logo no início da diferenciação das *mESCs* em *IPCs*, foi possível verificar o surgimento de células progenitoras, evidenciado pela expressão de marcadores importantes da diferenciação beta-pancreática. Ao final do processo de diferenciação *in vitro*, ocorreu a formação de agrupamentos (*clusters*) semelhantes a ilhotas, corando positivamente por ditizona, que é específica para células β -pancreáticas. Para avaliar seu potencial *in vivo*, estes *clusters* foram microencapsulados em Biodritina[®] e transplantados em camundongos diabetizados. Apesar dos níveis de insulina produzidos não serem suficientes para estabelecer a normoglicemia, os animais tratados com *IPCs* apresentaram melhores condições, quando comparados ao grupo controle, tendo melhor controle glicêmico, ganho de massa corpórea e melhor aparência da pelagem, na ausência de apatia. Além disso, análise dos *clusters* transplantados nestes animais indicou aumento da expressão de genes relacionados à maturação das células β . Porém, quando estes *clusters* foram microencapsulados em *Bioprotect*[®] e submetidos à maturação *in vivo* em animais normais, ocorreu um aumento drástico na expressão de todos os genes analisados, indicando sua maturação completa em células beta. O transplante destas células completamente maturadas em animais diabetizados, tornou-os normoglicêmicos e capazes de responder ao teste de tolerância à glicose (*OGTT*) de forma semelhante aos animais normais.

A segunda parte do trabalho visou analisar genes diferencialmente expressos identificados em estudo anterior do nosso grupo, comparando, através de DNA microarray, *mESCs* indiferenciadas e diferenciadas em *IPCs*. Um dos genes diferencialmente expressos é aquele que codifica para a *Purkinje cell protein 4 (Pcp4)*, sendo 3.700 vezes mais expresso em *IPCs*. Para investigar o possível papel do gene *Pcp4* em células β e no processo de diferenciação β -pancreática, adotou-se o enfoque de genômica funcional, superexpressando e inibindo sua expressão em células MIN-6 e *mESCs*. Apesar da alteração na expressão de *Pcp4* em células MIN-6 não ter interferido de forma expressiva na expressão dos genes analisados, quando inibido, modificou o perfil da curva de crescimento celular, aumentando seu tempo de dobramento de forma significativa e diminuindo da viabilidade celular em

ensaios de indução de apoptose. Já na diferenciação de *mESCs* em *IPCs*, a superexpressão de *Pcp4* interferiu de forma positiva apresentando uma tendência a aumentar a expressão dos genes relacionado à diferenciação β -pancreática.

Concluindo, desenvolvemos um novo protocolo de diferenciação de *mESCs* em *IPCs* as quais foram capazes de reverter o diabetes em camundongos diabetizados e descrevemos, pela primeira vez, o gene *Pcp4* como sendo expresso em células β -pancreáticas, podendo estar relacionado à manutenção da viabilidade celular e maturação destas células.

Palavras-chave: células-tronco embrionárias, células produtoras de insulina, pâncreas, diabetes, *Purkinje Cell Protein 4*, terapia celular

ABSTRACT

Kossugue P. M. **Differentiation of murine embryonic stem cells (mESCs) into insulin-producing cells (IPCs) and functional characterization of the Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4) gene in this process.** 2013. 112p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

New cellular sources for type 1 Diabetes mellitus treatment have been previously investigated, the most promising of which seems to be the insulin producing cells (IPCs), obtained by stem cells differentiation. Some reports show that murine embryonic stem cells (mESCs) are able to form islet-like structures, however, their insulin production is insufficient to render diabetic mice normoglycemic. This work aims at developing an adequate protocol for generation of IPCs and searching for new genes which could be involved in the pancreatic organogenesis process.

Early on during mESCs differentiation into IPCs, we observed the presence of progenitor cells, which were able to express pancreatic β -cell markers. At the end of the differentiation process, the islet-like clusters positively stained for the insulin-specific dithizone. These clusters were microencapsulated in Biodritin[®] microcapsules, and then transplanted into diabetized mice. Although the levels of insulin production were insufficient for the animals to achieve normoglycemia, those which received IPCs displayed improved conditions, when compared to the control group, as judged by a better glycemic control, body weight gain and healthy fur appearance, in the absence of apathy. In addition, when these transplanted clusters were retrieved, high levels of expression of the genes related to β -cell maturation were detected. IPCs were also microencapsulated in Bioprotect[®] and subjected to *in vivo* maturation in normal animals. A dramatic increase of the analyzed genes expression was observed, indicating complete maturation of the differentiated cells. When these cells were transplanted into diabetized mice, these animals achieved normoglycemia and were able to display glucose tolerance test (OGTT) response very similar to that of normal mice.

In the second part of this work, we analyzed upregulated genes described in previous work from our group, comparing undifferentiated mESCs to IPCs using a microarray platform. One of these genes is that coding for the Purkinje cell protein 4 (*Pcp4*), which is 3,700 more expressed than in undifferentiated mESC cells. We adopted a functional genomics approach to investigate the role played by the *Pcp4* gene in β -cells and in β -cell differentiation, by inducing overexpression and knocking down this gene in MIN-6 and mESC cells. Although the differential expression of *Pcp4* in MIN-6 was not able to interfere with the expression of the genes analyzed, we observed different cell growth rates, with increased doubling time and decreased cell viability when its expression was knocked down. In addition, overexpression of *Pcp4* in mESCs subjected to differentiation into IPCs apparently increases the expression of genes related to β -cell differentiation.

In conclusion, we developed a new protocol for ESCs differentiation into IPCs, which is able to revert diabetes in diabetized mice, and we also describe here, for the first time, the *Pcp4* gene as being expressed in pancreatic β -cells and possibly being related to maintenance of cell viability and β -cell maturation.

Keywords: embryonic stem cells, insulin-producing cells, pancreas, diabetes, Purkinje Cell Protein 4, cell therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1: Tecidos adjacentes influenciam no destino das células localizadas em cada porção do tubo digestivo primitivo, por meio de moléculas secretadas, como *FGFs*, *Activina* e *BMP4*.

Figura 2: Em camundongos, a embriogênese pancreática inicia-se no dia E8 com a expressão de *Pdx1* em células da porção do intestino primitivo anterior/médio. Estas células proliferam formando os brotos pancreáticos ventral e dorsal, que, posteriormente, se fundem, quando surgem ramificações organizadas, em que células progenitoras acinares localizam-se nas pontas, enquanto células progenitoras endócrinas/ductais, nos ramos. Por fim, células progenitoras endócrinas iniciam a expressão de *Ngn3* e destacam-se dos ramos, formando agrupamentos de células que darão origem às ilhotas pancreáticas (figura modificada de Lojudice *et al*, 2012 (12)).

Figura 3: Estratégias de obtenção de células beta-pancreáticas a partir de tecidos adultos: ilhotas pancreáticas isoladas e purificadas à partir de doadores, proliferação de células beta *in vitro*, diferenciação de células progenitoras e de células-tronco mesenquimais, transdiferenciação de células alfa e reprogramação de células acinares.

Figura 4: Principais fontes de células de origem não-pancreática e diferentes estratégias de geração de células β -pancreáticas *in vitro*: diferenciação de células-tronco mesenquimais, embrionárias e pluripotente induzidas, e/ou reprogramação direta de células adultas.

Figura 5: Exemplos de protocolos de diferenciação de células tronco embrionárias em células produtoras de insulina descritos na literatura. Todos possuem diferentes etapas diversos fatores indutores de diferenciação. M: camundongo; H: humano; EB: corpos embriões; Fn: fibronectina; P-O: poli-ornitina; NA: nicotinamida; α MTG: α -monotioglicerol; Lam: Laminina; Act: activina; CYC: ciclopamina; AR: ácido retinoico; BS: butirato de sódio; EXD4: exendina-4; BTC: betacelulina; AA: ácido ascórbico; ME: mercaptoetanol; WM: wortmannin; *CXCR4*⁺: células selecionadas pelo marcador *CXCR4*.

Figura 6: Populações distintas de células-tronco podem residir no pâncreas adulto. Dentre elas, as células-tronco ductais e as células mesenquimais, que podem estar presentes no tecido acinar e, inclusive, dentro das ilhotas (figura modificada de Lojudice *et al*, 2012 (12)).

Figura 7: Protocolo de diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina. O protocolo consiste de seis etapas após a formação de corpos embriões (mEBs): 1) Adesão em placa revestida por Matrigel contendo seguida de adição de 10^{-6} M Ácido Retinóico, 2) 2ng/mL Activina A e 10ng/mL FGF2, 3) 2ng/mL Activina A, 10ng/mL FGF2, 1X Suplemento N2 e 1X Suplemento B27, 4) 10ng/mL FGF2, 1X Suplemento N2 e 1X Suplemento B27, 5) 10mM Nicotinamida, 6) 10nM Exendina-4.

Figura 8: Esquema do primeiro experimento *in vivo*. As *mESCs* foram diferenciadas *in vitro*, microencapsuladas e transplantadas em camundongos diabetizados por estreptozotocina. Inicialmente, a glicemia dos animais foi mantida por implantes subcutâneos contendo insulina.

Figura 9: Esquema do segundo experimento *in vivo*. As *mESCs* foram diferenciadas *in vitro*, microencapsuladas e transplantadas em camundongos normais para diferenciação final *in vivo*. Após 60 dias, as células foram retiradas e retransplantadas em camundongos diabetizados.

Figura 10: Esquema dos cassetes de expressão dos vetores pLV-CMVTO/*Pcp4* e pCMVTO/SV40p/*neo* (vetor controle) utilizados no estudo de superexpressão do gene *Pcp4*.

Figura 11: Mapa do vetor pLKO.1-puro utilizado no estudo de inibição da expressão do gene *Pcp4* (88).

Figura 12: Morfologia de *mESCs* submetidas à diferenciação em *IPCs* por microscopia de fase (aumento 40X), nas diferentes etapas no dias 0, 7, 8, 10, 13, 16, 23 e 30. DTZ: Coloração por ditizona; células diferenciadas espontaneamente no quadro inferior direito.

Figura 13: Expressão dos genes *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA* de *mESCs* submetidas à diferenciação em *IPCs* nos diferentes dias, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *versus* d0).

Figura 14: Imunofluorescência das proteínas *CXCR4*, Proinsulina, *PDX1*, *GLUT2*, *NGN3* e *PAX4* em *mESCs* submetidas à diferenciação em *IPCs* nos dias 10, 23 e 30 (aumento: 600X; núcleos corados por *DAPI*).

Figura 15: Células microencapsuladas (*IPCs* ou *mESCs* indiferenciadas) por microscopia de fase (aumento: 40X), e aparência da pelagens de animais tratados com *mESCs* indiferenciadas (controle) ou *IPCs*.

Figura 16: A) Monitoramento da glicemia nos animais tratados com *mESCs* indiferenciadas (controle) ou *IPCs*. **B)** Monitoramento da massa corpórea. **C)** Teste oral de tolerância à glicose (*OGTT*), 6 semanas após o transplante. **D)** Área sob as curvas de *OGTT*. (a=morte; b=eutanásia). * um dos animais controle apresentou glicemia acima de 600mg/dL no início do teste, impossibilitando sua análise.

Figura 17: A) Células produtoras de insulina (*IPCs*) que cresceram na periferia das cápsulas ou agrupamentos de células semelhantes a ilhotas, recuperados dos animais tratados (microscopia de fase, aumento: 40X). **B)** Estruturas coradas por ditizona (estereomicroscópio de luz, aumento: 3,5X). **C)** Expressão dos genes *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA* de *IPCs* recuperadas dos animais

transplantados, analisados por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; d30: n=3 e pós-*in vivo*: n=2; * $p < 0,05$).

Figura 18: A) À esquerda, *IPCs* encapsuladas após 30 dias de diferenciação *in vitro*. No centro, *IPCs* após 30 dias de diferenciação *in vitro* e 60 dias de maturação *in vivo* (microscopia de fase, aumento: 40X) e, à direita, coradas com ditizona (esteromicroscópio de luz, aumento: 3,5X). **B)** Expressão dos genes *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA* de *IPCs* recuperadas após 60 dias de diferenciação *in vivo*, analisados por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; d30: n=3 e d90: n=1).

Figura 19: A) Monitoramento da glicemia nos animais tratados com *IPCs* encapsuladas ou cápsulas vazias (controle). **B)** Monitoramento da massa corpórea. **D)** Teste oral de tolerância à glicose (*OGTT*), 7 dias após o transplante. **E)** Área sob as curvas de *OGTT*. * experimento em andamento; ** um dos animais controle foi sacrificado antes do teste (** $p < 0,001$, em relação aos animais diabéticos).

Figura 20: A) Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Nnat* e *Igfbp5*, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*, n=1). *mESCs*: células tronco embrionárias murinas indiferenciadas; Dif-L: *mESCs* diferenciadas segundo o protocolo de Lumelsky e cols. **B)** Expressão de *Pcp4* durante a diferenciação de *mESCs* pelo protocolo de Lumelsky e cols, pelo novo protocolo descrito neste trabalho e em diferentes células e tecidos, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*, n=1). AR42J: linhagem de células acinares murinas imortalizada; Pâncreas: tecido pancreático total murino; Cerebelo: tecido de cerebelo murino.

Figura 21: Morfologia das células MIN-6 modificadas para o estudo funcional do gene *Pcp4*, por microscopia de fase (aumento 40X). Nenhuma mudança morfológica foi observada. **A)** Células inibindo a expressão de *Pcp4* (Controle: vetor pLKO.1). **B)** Células superexpressando o gene *Pcp4* (Controle: vetor pCMVTO/SV40p/neo).

Figura 22: Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Glut2* e *MafA* em células MIN-6 modificadas, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; * $p < 0,05$). Superexpressão: vetor pLV-CMVTO/*Pcp4*; Controle: vetor pCMVTO/SV40p/neo (vazio).

Figura 23: Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Glut2* e *MafA* em células MIN-6 modificadas geneticamente, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Controle: vetor pLKO.1 (vazio).

Figura 24: A) Curvas de crescimento de células MIN-6 modificadas geneticamente (n=3). **B)** Tempo de dobramento das células MIN-6 geneticamente modificadas. **C)** Ensaio de fragmentação de DNA em células MIN-6 modificadas submetidas à ação de citocinas (n=1). * $p < 0,05$, em relação ao respectivo controle.

Figura 25: Morfologia das *mESCs* modificadas para o estudo funcional do gene *Pcp4* após seleção com respectivo antibiótico, por microscopia de fase (aumento 40X). Nenhuma mudança morfológica

foi observada. **A)** Células inibindo a expressão de *Pcp4* sobre *iMEF* (Controle: vetor pLKO.1). **B)** Células superexpressando o gene *Pcp4* na ausência de *iMEF* (Controle: vetor pCMVTO/SV40p/neo).

Figura 26: Morfologia das *mESCs* geneticamente modificadas para superexpressarem o gene *Pcp4* submetidas à diferenciação em *IPCs*, por microscopia de fase (aumento: 40X). É possível notar um discreto aumento na formação de agrupamentos celulares em células que superexpressam *Pcp4*.

Figura 27: Morfologia das *mESCs* geneticamente modificadas para inibir a expressão do gene *Pcp4* submetidas à diferenciação em *IPCs*, por microscopia de fase (aumento: 40X). Verificou-se uma discreta diminuição na formação de agrupamentos celulares em células nas quais a expressão de *Pcp4* foi inibida.

Figura 28: Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Ins1*, *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Glut2* e *MafA* em células *mESCs* superexpressando *Pcp4* e submetidas à diferenciação segundo protocolos descrito por Lumelsky e cols, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; **p<0,01). Superexpressão: vetor pLV-CMVTO/PCP4; Controle: vetor pCMVTO/SV40p/neo (vazio).

Figura 29: Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Ins1*, *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA* em células *mESCs* com expressão de *Pcp4* inibida e submetidas à diferenciação segundo protocolos descrito por Lumelsky e cols, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; *p<0,05, **p<0,01). Controle: vetor pLKO.1 (vazio).

Tabela 1: Lista dos 20 genes mais expressos estudados e informações coletadas em bancos de dados até junho/2010.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MTG	- α -monotioglicerol
AA	- ácido ascórbico
ActA	- activina A
<i>Aldh1a2</i>	- <i>aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2</i>
ASC	- <i>Adult stem cell</i>
AR	- ácido retinóico
AR42J	- linhagem de células acinares de rato
<i>Astn1</i>	- <i>astrotactin 1</i>
<i>Arx</i>	- <i>aristaless related homeobox</i>
B27	- suplemento B27
<i>Bax</i>	- <i>BCL2-associated X protein</i>
<i>Bcl2</i>	- <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
<i>Bcl-xl</i>	- <i>BCL2-like 1</i>
<i>bFGF (FGF2)</i>	- <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
<i>BMP4</i>	- <i>bone morphogenetic protein 4</i>
BS	- butirato de sódio
BSA	- <i>Bovine serum albumine</i>
BTC	- betacelulina
<i>C1qa</i>	- <i>complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide</i>
<i>C1qb</i>	- <i>complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide</i>
<i>CD4</i>	- <i>T-cell antigen T4/LEU3</i>
<i>CD8</i>	- <i>T8 T-cell antigen</i>
<i>CD14 (LPS-r)</i>	- <i>Monocyte differentiation antigen</i>
<i>CD29 (ITGB1)</i>	- <i>Integrin beta 1</i>
<i>CD34</i>	- <i>Hematopoietic progenitor cell antigen</i>
<i>CD45 (PTPRC/GP180)</i>	- <i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type C</i>
<i>CD90 (THY-1)</i>	- <i>Thy-1 cell surface antigen</i>
<i>CD105 (ENG)</i>	- <i>Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)</i>
cDNA	- <i>complementary DNA</i>
<i>CK19 (KRT19)</i>	- <i>cytokeratin 19</i>
<i>c-Kit</i>	- <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
CMV	- <i>cytomegalovirus</i>
<i>c-Myc</i>	- <i>v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CEUA	- Comitê de Ética em Uso Animal
<i>Col3a1</i>	- <i>procollagen, type III, alpha 1</i>
<i>CXCL12</i>	- <i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>
<i>CXCR4</i>	- <i>chemokine, CXC motif, receptor 4</i>
CYC	- ciclopamina
<i>DAPT</i>	- <i>N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butylester</i>
<i>DCAMKL-1</i>	- <i>doublecortin-like kinase 1</i>
<i>Dcn</i>	- <i>decorin</i>
Dif-L	- mESCs diferenciadas segundo o protocolo de Lumelsky et al
DM1	- Diabetes mellitus tipo 1

<i>DMEM</i>	- <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<i>DMEM:F12</i>	- <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham</i>
<i>DMSO</i>	- <i>Dimethyl sulfoxide</i>
<i>DNA</i>	- <i>deoxyribonucleic acid</i>
<i>dNTP</i>	- <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
<i>DAPI</i>	- <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<i>dNTP</i>	- <i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
<i>DsRed</i>	- <i>Red Fluorescent Protein</i>
<i>DTT</i>	- <i>Dithiothreitol</i>
<i>DTZ</i>	- <i>ditizona</i>
<i>EB</i>	- <i>Embryoid Body</i>
<i>EDTA</i>	- <i>Ethylenediaminetetra-acetic acid</i>
<i>EF1-alpha</i>	- <i>Elongation factor 1-alpha</i>
<i>EGF</i>	- <i>Epidermal Growth Factor</i>
<i>EMT</i>	- <i>Transição Epitélio-Mesênquima</i>
<i>ESC</i>	- <i>Embryonic Stem Cell</i>
<i>EXD-4</i>	- <i>Exendina 4</i>
<i>Fabp7</i>	- <i>fatty acid binding protein 7</i>
<i>FACS</i>	- <i>Fluorescent-activated cell sorting</i>
<i>FGF</i>	- <i>fibroblast growth factor</i>
<i>FGF2 (bFGF)</i>	- <i>fibroblast growth factor 2</i>
<i>FGF4</i>	- <i>fibroblast growth factor 4</i>
<i>FGF10</i>	- <i>fibroblast growth factor 10</i>
<i>Foxa1</i>	- <i>forkhead box Protein A1</i>
<i>Foxa2</i>	- <i>forkhead box Protein A2</i>
<i>Gata4</i>	- <i>GATA-binding protein 4</i>
<i>Gata5</i>	- <i>GATA-binding protein 5</i>
<i>Gata6</i>	- <i>GATA-binding protein 6</i>
<i>Gkn1</i>	- <i>gastrokine 1</i>
<i>Gkn2</i>	- <i>gastrokine 2</i>
<i>GFP</i>	- <i>Green Fluorescent Protein</i>
<i>GLUT2</i>	- <i>glucose transporter 2</i>
<i>HES1</i>	- <i>hairy and enhancer of split homolog</i>
<i>HGF</i>	- <i>hepatocyte growth factor</i>
<i>hiPSC</i>	- <i>human induced Pluripotent Stem Cell</i>
<i>Hnf1b</i>	- <i>hepatocyte nuclear factor 1β</i>
<i>Hnf1b</i>	- <i>hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B</i>
<i>Hnf6</i>	- <i>hepatocyte nuclear factor 6</i>
<i>Hprt</i>	- <i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
<i>IgG</i>	- <i>imunoglobulina</i>
<i>IGF1</i>	- <i>insulin-like growth factor 1</i>
<i>IGF2</i>	- <i>insulin-like growth factor 2</i>
<i>Igfbp5</i>	- <i>insulin-like growth factor binding protein 5</i>
<i>IL1b</i>	- <i>Interleukin 1β</i>
<i>iMEF</i>	- <i>inactivated Mouse Embryonic Fibroblast</i>
<i>INF-γ</i>	- <i>Interferon Gamma</i>

<i>INS1</i>	- <i>Insulin 1</i>
<i>INS2</i>	- <i>insulin 2</i>
<i>IPC</i>	- <i>insulin-producing cell</i>
<i>iPSC</i>	- <i>induced Pluripotent Stem Cell</i>
<i>ISL1</i>	- <i>islet transcription factor 1</i>
<i>ITS</i>	- <i>Insulin-transferrin-selenium</i>
<i>ITSFn</i>	- <i>Insulin-transferrin-selenium-fibronectin</i>
<i>KGF</i>	- <i>keratinocyte growth factor</i>
<i>Kitl</i>	- <i>kit ligand</i>
<i>Klf4</i>	- <i>kruppel-like factor 4</i>
<i>Lam</i>	- <i>laminina</i>
<i>LIF</i>	- <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
<i>LY294002</i>	- <i>PI3 kinase inhibitor</i>
<i>MafA</i>	- <i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog, protein A</i>
<i>MafB</i>	- <i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog, protein B</i>
<i>ME</i>	- <i>mercaptoetanol</i>
<i>MEF</i>	- <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
<i>mEB</i>	- <i>murine Embryod Body</i>
<i>mESC</i>	- <i>murine Embryonic Stem Cell</i>
<i>MIN-6</i>	- <i>mouse insulinoma 6; linhagem de células de insulinamo murino</i>
<i>MOI</i>	- <i>Multiplicity of Infection</i>
<i>mRNA</i>	- <i>messenger RNA</i>
<i>MSC</i>	- <i>Mesenchymal stem cell</i>
<i>N2</i>	- <i>suplemento N2</i>
<i>NA</i>	- <i>nicotinamida</i>
<i>NANOG</i>	- <i>Homeobox transcription factor NANOG</i>
<i>NCBI</i>	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>NEUROD1</i>	- <i>neurogenic differentiation 1</i>
<i>NGN3</i>	- <i>neurogenin 3</i>
<i>NK</i>	- <i>natural killer</i>
<i>NKX2.2</i>	- <i>NK2 homeobox 2</i>
<i>NKX6.1</i>	- <i>NK Homeobox , Family 6</i>
<i>Nnat</i>	- <i>Neuronatin</i>
<i>Nrp1</i>	- <i>neuropilin 1</i>
<i>OCT4</i>	- <i>octamer binding transcription factor 4</i>
<i>OGTT</i>	- <i>Oral Glucose Tolerance Test</i>
<i>OMIM</i>	- <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<i>OSF1</i>	- <i>pleiotrophin</i>
<i>P-O</i>	- <i>poli-ornitina</i>
<i>PAX4</i>	- <i>paired box gene 4</i>
<i>PAX6</i>	- <i>Paired box gene 6</i>
<i>Pcp4 (PEP-19)</i>	- <i>purkinje cell protein 4 (brain-specific polypeptide PEP-19)</i>
<i>PBSA</i>	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<i>Pbx1</i>	- <i>pre B cell leukemia homeobox 1</i>
<i>PCR</i>	- <i>Polimerase chain reaction</i>
<i>PDX1</i>	- <i>pancreatic and duodenal homeobox 1</i>

<i>PI</i>	- iodeto de propídeo
<i>Ptf1a</i>	- <i>pâncreas transcription factor 1^a</i>
<i>qRT-PCR</i>	- RT-PCR quantitativo em tempo real
<i>shRNA</i>	- <i>small hairpin RNA</i>
<i>RNA</i>	- <i>Ribonucleic acid</i>
<i>RPMI</i>	- <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SFB	- Soro fetal bovino
SFB-ES	- Soro Fetal Bovino-ES qualified
<i>Scg3</i>	- <i>secretogranin III</i>
<i>Shh</i>	- <i>sonic hedgehog</i>
<i>Siat8b</i>	- <i>sialyltransferase 8 B</i>
<i>Sox2</i>	- <i>(sex determining region Y)-box 2</i>
<i>Sox9</i>	- <i>(sex determining region Y)-box 9</i>
<i>Sparcl1</i>	- <i>SPARC-like 1</i>
SSEA	- <i>Stage specific embryonic antigen</i>
SV40	- <i>Simian vacuolating virus 40</i>
TBE	- Tris-borato-EDTA
<i>TetR</i>	- <i>Tet repressor</i>
TO	- <i>Tet operator</i>
<i>Tna</i>	- tetranectin
<i>TNF-α</i>	- <i>Transforming Growth Factor Alpha</i>
UFC	- unidade formadora de colônia
WM	- <i>wortmannin (PI3 kinase inhibitor)</i>
<i>Wnt3a</i>	- <i>wingless-type MMTV integration site family, member 3A</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1. IMPORTÂNCIA DO PÂNCREAS	27
1.2. EMBRIOLOGIA E ORGANOGÊNESE PANCREÁTICA	28
1.3. EXPANSÃO VERSUS NEOGÊNESE DA CÉLULA B PANCREÁTICA	32
1.4. ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS B-PANCREÁTICAS	33
1.4.1. <i>Expansão in vitro de células β-pancreáticas</i>	35
1.4.2. <i>Células-tronco como fonte de células produtoras de insulina</i>	36
1.4.2.1. Células-tronco embrionárias (ESCs)	37
1.4.2.2. Células-tronco adultas (ASCs)	41
1.4.2.2.1. Precursoras pancreáticas	41
1.4.2.2.2. Células-tronco mesenquimais (MSCs) e hematopoiéticas	44
1.4.2.2.3. Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs)	45
1.4.2.2.4. Transdiferenciação e reprogramação direta	47
1.5. PROBLEMÁTICA	48
2. OBJETIVOS	51
2.1. OBJETIVOS GERAIS	51
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
2.2.1. <i>Parte 1:</i>	51
2.2.2. <i>Parte 2:</i>	52
3. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1. LISTA DE REAGENTES (PROCEDÊNCIA)	53
3.2. CULTIVO CELULAR	54
3.2.1. <i>Fibroblastos embrionários de camundongos (MEF - Mouse Embryonic Fibroblast)</i>	55
3.2.2. <i>Células-tronco embrionárias murinas (mESCs)</i>	55
3.2.3. <i>Diferenciação de mESC em células produtoras de insulina</i>	56
3.2.4. <i>Células de insulinoma de camundongo (MIN-6)</i>	57
3.2.5. <i>Linhagem de células acinares de rato (AR42J)</i>	57
3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	58
3.3.1. <i>Extração e Purificação de RNA</i>	58
3.3.2. <i>Síntese de cDNA</i>	58
3.3.2.1.1. <i>Controle de qualidade do cDNA</i>	59
3.3.3. <i>RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)</i>	59
3.4. IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA	60
3.4.1. <i>Anticorpos</i>	60
3.5. ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	61
3.5.1. <i>Microencapsulamento de IPCs</i>	61
3.5.2. <i>Diabetização de camundongos</i>	62
3.5.3. <i>Monitoramento da glicemia</i>	62
3.5.4. <i>Transplante das células microencapsuladas</i>	62

3.5.4.1. Uso de <i>IPCs</i> no tratamento de camundongos diabetizados ...	62
3.5.4.2. Diferenciação final de <i>IPCs in vivo</i>	63
3.5.5. <i>Teste oral de tolerância à glicose (OGTT)</i>	64
3.6. ESTUDO FUNCIONAL DO GENE <i>PURKINJE CELL PROTEIN 4 (PCP4)</i>	64
3.6.1. <i>Superexpressão do gene Pcp4</i>	65
3.6.1.1. Construção do vetor de expressão.....	65
3.6.1.2. Clonagem da região codificadora do gene <i>Pcp4</i>	66
3.6.2. <i>Knockdown do gene Pcp4</i>	67
3.6.3. <i>Produção de partículas lentivirais</i>	68
3.6.4. <i>Transdução lentiviral</i>	69
3.6.5. <i>Curva de crescimento</i>	69
3.6.6. <i>Ensaio de apoptose</i>	70
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
4. RESULTADOS	71
4.1. DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS (<i>MESCs</i>) EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA (<i>IPCs</i>).....	71
4.1.1. <i>Diferenciação in vitro</i>	71
4.1.2. <i>Utilização das IPCs no tratamento de camundongos diabetizados</i>	75
4.1.3. <i>Maturação final de IPCs in vivo</i>	79
4.2. ESTUDO FUNCIONAL DO GENE <i>PURKINJE CELL PROTEIN 4 (PCP4)</i>	82
4.2.1. <i>Escolha do gene Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)</i>	82
4.2.2. <i>Estudo do funcional do gene Pcp4 em células β-pancreáticas murinas</i> ..	85
4.2.3. <i>Estudo funcional do gene Pcp4 em células-tronco embrionárias murinas (mESCs)</i>	88
5. DISCUSSÃO	95
5.1. DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS (<i>MESCs</i>) EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA (<i>IPCs</i>).....	95
5.2. ESTUDO FUNCIONAL DO GENE <i>PURKINJE CELL PROTEIN 4 (PCP4)</i>	99
6. CONCLUSÕES	103
7. PERSPECTIVAS	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9. LISTA DE ANEXOS	113

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância do pâncreas

A glicose é a principal fonte de energia metabólica utilizada pelos tecidos, sendo essencial para algumas células, como os neurônios e os eritrócitos. A manutenção da glicemia é de importância fundamental para o bom funcionamento do metabolismo dos indivíduos, sendo regulada por diversos processos fisiológicos, dentre os quais o mais importante é o mecanismo hormonal, orquestrado principalmente pelo pâncreas.

O pâncreas é um órgão composto por dois tipos diferentes de tecidos glandulares: o exócrino, que secreta enzimas digestivas para o intestino, e o endócrino, que secreta hormônios para a corrente sanguínea. As células endócrinas estão agrupadas nas chamadas ilhotas de Langerhans, que são compostas por cinco tipos de células, que secretam diferentes hormônios: α (glucagon), β (insulina, peptídeo C, amilina), δ (somatostatina), PP (polipeptídeo pancreático) e ϵ (grelina) (1).

As células α e β , presentes nas ilhotas pancreáticas, monitoram a concentração de glicose no sangue e respondem à variação de glicemia com a secreção de hormônios (glucagon e insulina, respectivamente) que possuem efeitos opostos, visando a manutenção da normoglicemia. Após uma refeição, a concentração sanguínea da glicose aumenta, e as células β secretam a insulina, a qual estimula a captação da glicose pelas células do corpo e, também, a conversão da glicose em glicogênio no fígado, diminuindo, assim, a concentração de glicose no sangue. Quando o nível de glicose no sangue diminui, as células α secretam glucagon, que estimula a hidrólise do glicogênio do fígado em glicose, aumentando, assim, a concentração de glicose no sangue entre as refeições.

Um exemplo de desordem metabólica causada por uma alteração na atividade do pâncreas é o Diabetes mellitus, caracterizado por hiperglicemia, provocada pela falta ou por ação deficiente da insulina, ou ambos. O Diabetes tipo 1 (DM1) é caracterizado pela destruição autoimune das células β produtoras de insulina do pâncreas por linfócitos T $CD4^+$ $CD8^+$ e macrófagos infiltrados nas ilhotas. O tratamento do DM1 é realizado através de injeções diárias de insulina, aplicadas de acordo com os níveis de glicemia do paciente, evitando o desenvolvimento de cetoacidose. Dentre as complicações crônicas do Diabetes destacam-se: doenças microvasculares, cardiovasculares e cerebrovasculares (2).

1.2. Embriologia e organogênese pancreática

A primeira etapa de diferenciação durante a embriogênese murina (E7.5) ocorre durante a gastrulação, quando ocorre a formação dos três folhetos embrionários: endoderme, mesoderme e ectoderme. A sinalização pela via de *Nodal* é responsável pela indução inicial da endoderme (altos níveis de *Nodal*) e mesoderme (baixos níveis de *Nodal*), sendo necessária para a correta gastrulação e orientação dos eixos (3). É da endoderme que se origina todo o sistema digestivo, iniciando-se com a formação do intestino primitivo. A expressão de genes como *Hnf1b* (*hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B*), *Hnf6* (*hepatocyte nuclear factor 6*), *Foxa1* (*forkhead box protein A1*), *Foxa2* (*forkhead box protein A2*), *Gata4* (*GATA-binding protein 4*), *Gata5* e *Gata6* por células da endoderme confere competência às mesmas para responder corretamente a sinais oriundos de tecidos adjacentes (4). Desta forma, cada porção deste intestino primitivo recebe sinais e estímulos de tecidos adjacentes distintos, que induzem a formação de diferentes órgãos, como esôfago, traqueia, estômago, pulmões, tireoide, fígado, sistema biliar, pâncreas e

duodeno. Por secretar fatores como *BMP4* (*bone morphogenetic protein 4*) e *FGF2* (*fibroblast growth factor 2*), a mesoderme cardíaca possui forte influência principalmente sobre a porção anterior/média que dará origem ao fígado. Estes mesmo fatores alcançam a região que dará origem ao pâncreas ventral, porém em concentrações muito baixas, permitindo o desenvolvimento pancreático ao invés do hepático, o qual necessita de altas doses destes fatores. Já na porção mais posterior do intestino primitivo, não há influência alguma da mesoderme, sendo assim possível a formação dos intestinos. Da mesma forma, a notocorda e a aorta dorsal, secretam fatores como *FGF2* e *Activina*, os quais inibem a expressão de *Shh* (*sonic hedgehog*), possibilitando o desenvolvimento do pâncreas dorsal (5) (Figura 1).

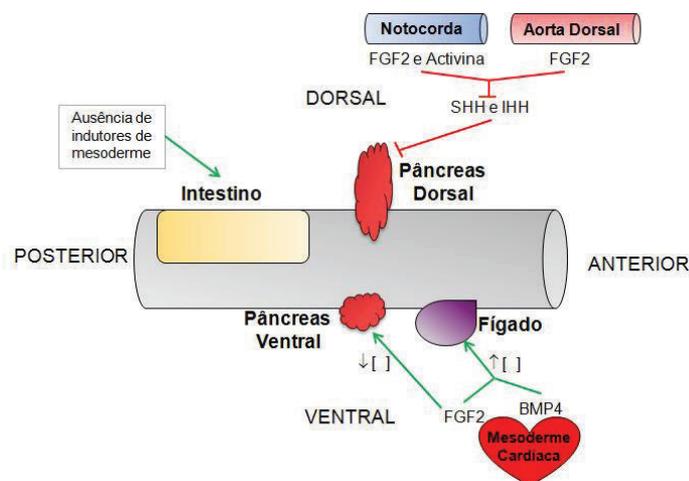


Figura 1: Tecidos adjacentes influenciam no destino das células localizadas em cada porção do tubo digestivo primitivo, por meio de moléculas secretadas, como *FGFs*, *Activina* e *BMP4*.

Em camundongos, o desenvolvimento pancreático começa no dia embrionário 8.5, tendo sua origem em duas porções do epitélio do intestino anterior/médio onde há o desenvolvimento dos dois brotos embrionários (E9.5), que darão origem ao pâncreas: brotos ventral e dorsal.

Existem fatores como *PDX1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) que são necessários para o início do desenvolvimento do pâncreas ventral, enquanto outros, como o Ácido Retinoico e *HLXB9* (*homeobox gene Hb9*), precedendo a expressão de *Pdx1*, são necessários para o desenvolvimento do pâncreas dorsal. Sabe-se que tanto as células exócrinas como as endócrinas do pâncreas, originam-se das células endodérmicas que expressam *PDX1* (6, 7). As células progenitoras pancreáticas também expressam *HES1* (*hairy and enhancer of split homolog*), que as mantém indiferenciadas (8), e a proliferação é estimulada por *FGFs* (*fibroblast growth factors*) (9).

Durante o desenvolvimento dos brotos ventral e dorsal ocorre a organização de células progenitoras exócrinas e células progenitoras endócrinas/ductais. Em seguida, há a fusão dos brotos, quando surgem ramificações a partir do epitélio, determinando dois domínios celulares diferentes, denominados “ponta” (“*tip*”) e “tronco” (“*trunk*”). O domínio da “ponta” é determinado por células expressando *Pdx1* e *Ptf1a* (*pâncreas transcription factor 1a*), que podem se comprometer para linhagem acinar, enquanto o domínio do “tronco” é definido por células expressando *Sox9* (*(sex determining region Y)-box 9*), *Nkx6.1* (*NK6 homeobox 1*), *Hnf1 β* (*hepatocyte nuclear factor 1 β*) e *Pdx1*, que podem se comprometer à linhagens ductal ou endócrina. A diferenciação endócrina *versus* exócrina é mediada pela via de *Notch*, o qual inibe o fator de transcrição *NGN3* (*neurogenin 3*), indutor da diferenciação endócrina das células epiteliais do ducto. Assim, células nas quais a via de *Notch* é ativada mantêm a capacidade proliferativa, enquanto células com esta via inativada expressam *Ngn3* destacam-se do “tronco” das ramificações do epitélio e se comprometem à linhagem endócrina (progenitoras endócrinas). A expressão de *Ngn3* está presente apenas em células precursoras, não sendo

expressa em células endócrinas maduras. Enquanto células *NGN3*-positivas estão destinadas à linhagem endócrina, células em que a via de *Notch* inibe a expressão de *Ngn3*, podem se comprometer à linhagem exócrina, expressando fatores como o *Ptf1a*, necessário para a diferenciação em células acinares (4).

As células progenitoras endócrinas *NGN3*-positivas podem se diferenciar em qualquer uma das cinco células endócrinas presentes nas ilhotas. Altos níveis de *NGN3* também induzem a expressão de fatores como *Snail2* e *NeuroD1* (*neurogenic differentiation 1*), o qual induz a expressão de diversos genes endócrinos, incluindo *Isl1* (*islet 1*), *Pax6* (*paired Box gene 6*) e hormônios pancreáticos (10). A expressão de *Pax4* determina a diferenciação em precursoras de células β/δ , enquanto a expressão de *Arx* (*aristaless related homeobox*) determina diferenciação em células α (11).

A maturação das células precursoras endócrinas acontece, inicialmente, em células mono-hormonais imaturas e, finalmente, em células fisiologicamente funcionais, sendo que a maturação completa ocorre no período pós-natal. A estabilização da identidade da célula β a partir do precursor endócrino tem sido relacionada à expressão de *Nkx2.2* (*NK2 homeobox 2*), inibindo a expressão de *Arx*, fator de transcrição determinante de células α . Já expressão de *MafA* (*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog, protein A*) e *MafB* (*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog, protein B*) são determinantes para a maturação de células α e β . Ambos fatores de transcrição são expressos em células endócrinas imaturas, porém, em um determinado momento, ocorre a decisão de expressar *MafA* apenas, e se tornar célula α , ou *MafB* apenas, e se tornar célula β . Apesar da decisão pela expressão de *MafA* ou *MafB* ser importante para a

maturação final das células α e β , os fatores pós-parto indutores deste evento ainda são desconhecidos (11).

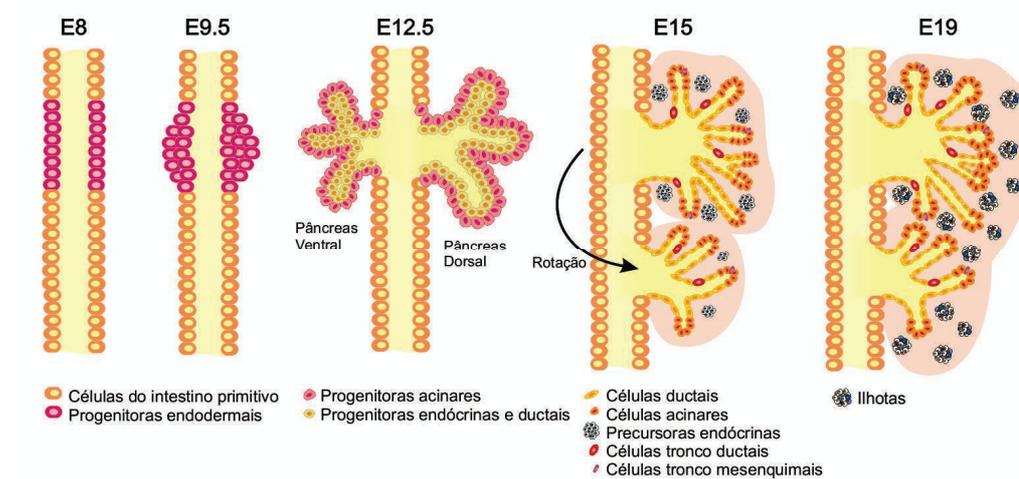


Figura 2: Em camundongos, a embriogênese pancreática inicia-se no dia E8 com a expressão de *Pdx1* em células da porção do intestino primitivo anterior/médio. Estas células proliferam formando os brotos pancreáticos ventral e dorsal, que, posteriormente, se fundem, quando surgem ramificações organizadas, em que células progenitoras acinares localizam-se nas pontas, enquanto células progenitoras endócrinas/ductais, nos ramos. Por fim, células progenitoras endócrinas iniciam a expressão de *Ngn3* e destacam-se dos ramos, formando agrupamentos de células que darão origem às ilhotas pancreáticas (figura modificada de Lojudice *et al* (12)).

1.3. Expansão versus Neogênese da célula β pancreática

Após a organogênese pancreática, novas células β podem se originar, o que é evidenciado pelo aumento na massa de ilhotas após o nascimento e descobrimento de células progenitoras pancreáticas próximas às estruturas ductais. Este mesmo fenômeno é descrito durante a gravidez/lactação, em que a presença de prolactina induz aumento de massa de células β (13). Sabe-se, também, que há uma regeneração significativa do tecido pancreático, incluindo o aumento de massa de células beta, como descrito em ratos submetidos a 90% de pancreatectomia. Em

vista disso, existem duas principais teorias: a de expansão e a de neogênese (14). Na primeira teoria, novas células β originam-se por replicação de células β pré-existentes, e na segunda, as novas células β são células progenitoras pancreáticas que se diferenciaram. A ausência da expressão de *NGN3* no pâncreas adulto suporta a teoria da expansão, enquanto a presença de pequenos agrupamentos de células β ou até mesmo células β sozinhas em regiões adjacentes a ductos, é frequentemente interpretada como produtos de neogênese.

Em indivíduos adultos, sabe-se que o mecanismo de reposição de células β depende principalmente da expansão de células β pré-existentes, ao invés da diferenciação de células tronco precursoras. Dessa forma, muitos fatores e hormônios, como a prolactina, têm sido estudados na procura de indutores do crescimento de células β pancreáticas (15). Por outro lado, sabe-se, também, que quando o ducto pancreático é estimulado, pode ocorrer neogênese, pois precursoras *NGN3*-positivas surgem dos ductos e se diferenciam em novas células β (16).

1.4. Estratégias para obtenção de células β -pancreáticas

A principal fonte de células β utilizada atualmente no tratamento do Diabetes Tipo 1 é oriunda do transplante de pâncreas órgão total. Desde a década de 80, o transplante de pâncreas é realizado comumente, com sucesso, sendo que a taxa de aceitação dos pâncreas transplantados (pega do enxerto) nos pacientes diabéticos tem se igualado àquelas de outros transplantes heterólogos como o de rim.

Nos últimos 20 anos, o transplante de ilhotas tem sido utilizado em diversos Centros, tendo sido implantado no Brasil pelo nosso grupo em 2002 (17). Esta técnica baseia-se no isolamento das ilhotas pancreáticas do pâncreas de um doador com morte encefálica, por um processo de digestão enzimática (colagenase),

purificação das mesmas através de gradiente de densidade, e implante das ilhotas purificadas no fígado do receptor. Ao contrário do transplante de pâncreas, órgão sólido, o transplante de ilhotas é um procedimento menos invasivo, envolvendo apenas a introdução de um cateter num dos três principais ramos da veia porta hepática. Entretanto, o transplante de ilhotas exige de dois a quatro doadores por paciente, pois a eficiência do isolamento de ilhotas não é de 100% e, além disso, apenas cerca de 50% das ilhotas implantadas sobrevivem após o transplante (18). Muitos fatores interferem na pega deste enxerto, durante o transplante de ilhotas, como: a qualidade do órgão doado, a viabilidade das ilhotas recuperadas, além da própria reação imunológica do paciente.

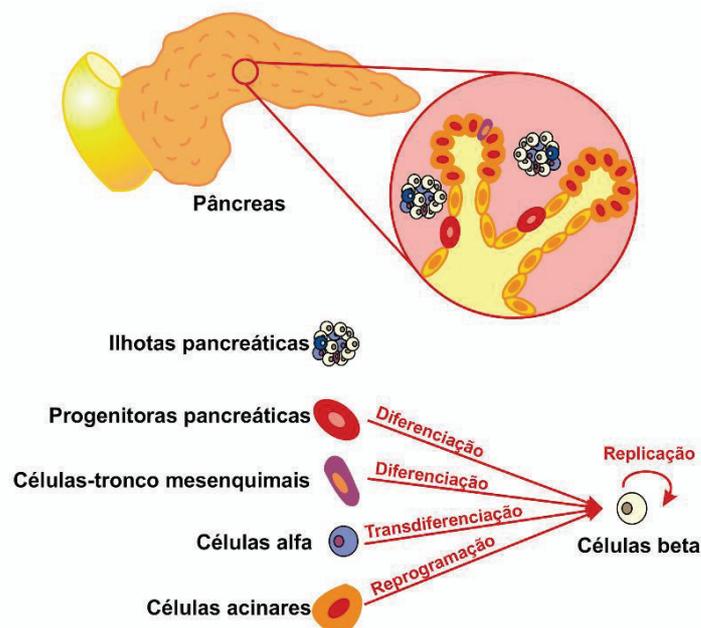


Figura 3: Estratégias de obtenção de células beta-pancreáticas a partir de tecidos adultos: ilhotas pancreáticas isoladas e purificadas à partir de doadores, proliferação de células beta *in vitro*, diferenciação de células progenitoras e de células-tronco mesenquimais, transdiferenciação de células alfa e reprogramação de células acinares.

Muitos avanços têm sido alcançados nesta área, porém a necessidade de um número grande de ilhotas viáveis continua sendo o maior desafio. Deste modo, há uma busca intensiva de técnicas que permitam a expansão de células β *in vitro* ou mesmo, de fontes alternativas para sua obtenção (Figura 3).

1.4.1. Expansão *in vitro* de células β -pancreáticas

A busca por alternativas de obtenção de um maior número de células β para transplante levou à tentativa de expansão das ilhotas *in vitro*. Porém, com exceção dos períodos gestacional e neonatal, em que há uma alta proliferação de células β pancreáticas, estas raramente se multiplicam e muito lentamente. Por isso, moléculas envolvidas no ciclo celular, como ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, e hormônios, como a prolactina, têm sido estudadas com o intuito de estimular a proliferação de células β (15, 19).

Porém, a cultura *ex vivo* para expansão de ilhotas isoladas tem se mostrado difícil por resultar na diminuição ou perda progressiva de função das células β pancreáticas. Em vista disso, diversos grupos buscam novas estratégias de cultivo destas células, envolvendo seu crescimento em biorreatores e o uso de diversos fatores indutores de proliferação (20). Um destes fatores é a prolactina, hormônio normalmente produzido durante a gestação, o qual apresenta atividade mitogênica sobre células β de ilhotas humanas cultivadas *in vitro*, induzindo a proliferação destas células, além de aumentar tanto a produção como a secreção de insulina pelas mesmas (15). Mesmo assim, com as diferentes passagens, as células β perdem a capacidade de produzir insulina. Assim, muitos estudos procuram desenvolver protocolos baseados em expansão e rediferenciação das células *in*

vitro, porém sem muito sucesso até o momento (10). Apesar de ter sido bastante questionado, este fenômeno de desdiferenciação durante a expansão das células oriundas das ilhotas isoladas, é chamado de transição epitélio-mesênquima (EMT). De acordo com esta teoria, células epiteliais de origem pancreática são levadas a um estágio indiferenciado (mesenquimal), podendo ser expandidas e, então, rediferenciadas para serem utilizadas como precursoras pancreáticas (21).

1.4.2. Células-tronco como fonte de células produtoras de insulina

Uma fonte promissora de células β , que tem sido exhaustivamente estudada, são as células-tronco, as quais, por definição, são células capazes de se renovarem e diferenciarem em diversos tipos celulares. Os primeiros estudos de diferenciação de células-tronco em células β iniciaram-se com células-tronco mesenquimais de medula óssea, utilizando nicotinamida e extrato pancreático como indutores. Desde então, células-tronco de diversas fontes têm sido submetidas a diversos protocolos de diferenciação, visando a obtenção de células produtoras de insulina (*Insulin Producing Cells - IPCs*) (22) (Figura 4).

As células-tronco podem ser classificadas, basicamente, em três tipos: 1) embrionárias (*ESCs*), 2) adultas (*ASCs*), e mais recentemente, 3) pluripotentes induzidas (*iPSCs*).

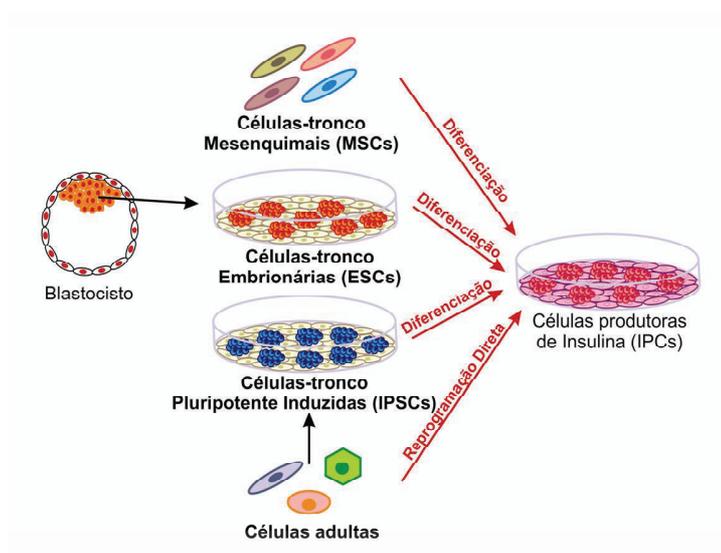


Figura 4: Principais fontes de células de origem não-pancreática e diferentes estratégias de geração de células β -pancreáticas *in vitro*: diferenciação de células-tronco mesenquimais, embrionárias e pluripotente induzidas, e/ou reprogramação direta de células adultas.

1.4.2.1. Células-tronco embrionárias (ESCs)

As células-tronco embrionárias (*Embryonic Stem Cells*) são comumente derivadas da massa celular interna do blastocisto, sendo as células-tronco de maior potencial de diferenciação nos mais diversos tipos celulares, tendo sido extensamente estudadas por diversos grupos. Para ativar o programa de diferenciação das *ESCs*, é necessário promover a agregação das células em estruturas esferóides chamadas corpos embrioides (*Embryod Bodies; EBs*), que mimetizam os estágios iniciais da embriogênese. Após a formação de corpos embrioides, existe a possibilidade de sua diferenciação em diversos tipos celulares, incluindo células produtoras de insulina.

Alguns trabalhos demonstram a capacidade de células tronco embrionárias murinas de formarem estruturas semelhantes a ilhotas pancreáticas, porém os níveis de produção de insulina são insuficientes para reversão do diabetes em

camundongos diabetizados. Inúmeros fatores tem sido utilizados para esta finalidade, incluindo altas concentrações de glicose, hormônios (como insulina, prolactina), fatores de crescimento (como *Fibroblast Growth Factors*, *FGFs*; *Endothelial Growth Factor*, *EGF*; *Hepatocyte Growth Factor*, *HGF*), proteínas componentes de matriz extracelular (como fibronectina, laminina, MatrigelTM), fatores neuronais (como suplementos N2 e B27), nicotinamida, indutores de diferenciação endodérmica (como activina A, Nodal, *Bone Morphogenetic Protein 4*, *BMP4*), etc (23-25).

Basicamente, dois tipos de estratégias têm sido utilizadas para diferenciação *in vitro* de células tronco embrionárias em células produtoras de insulina, ambas compostas por diferentes etapas, cada uma das quais utilizando um coquetel de fatores específicos (Figura 5). A primeira estratégia visa à seleção de células precursoras nestina-positivas, utilizando-se fatores de diferenciação neuronal. Resumidamente, o protocolo induz a formação de corpos embrióides, seguida da seleção e expansão de células nestina-positivas, e, por fim, a diferenciação e maturação em células produtoras de insulina. A seleção de células que expressam a proteína Nestina é baseada no fato de que há células precursoras de vários tipos celulares, incluindo precursoras neuronais e pancreáticas, que expressam esta proteína, a qual possui função essencial na maturação destas células (26, 27). A outra estratégia busca mimetizar os passos da organogênese pancreática, na qual, primeiramente, ocorre a diferenciação em células precursoras da endoderme definitiva, e, posteriormente, em precursoras pancreáticas, e, finalmente, a diferenciação e maturação em células produtoras de insulina. Entretanto, independente da estratégia de diferenciação *in vitro* adotada, os protocolos publicados, até o momento, não são adequados, pois as células permanecem

imaturas, geralmente expressando diferentes hormônios simultaneamente (insulina, glucagon e somatostatina). Além disso, há uma baixa produção de insulina, quando comparadas a uma célula β -pancreática e não respondem de maneira adequada à glicose em estudos funcionais, sendo incapazes de reverter o Diabetes em camundongos diabetizados (28, 29).

Uma alternativa que tem sido empregada atualmente é a combinação da diferenciação *in vitro* seguida pela diferenciação *in vivo*, sendo a maturação completa das células parcialmente diferenciadas *in vitro* em células β responsivas à glicose ocorreria *in vivo*. Esta técnica tem sido amplamente aplicada, sendo baseada no fato da maturação final das células endócrinas ocorrer apenas pós-nascimento. Porém ainda não está claro como esta maturação final ocorre *in vivo*, já que os fatores envolvidos ainda são desconhecidos, mas o nicho *in vivo* e as alterações metabólicas neste ambiente parecem ter grande importância na maturação da célula β (25).

Além disso, tem-se utilizado ferramentas moleculares para diferenciar *ESCs*, como, por exemplo, a transfecção com cassetes de seleção regulados pelos mais diversos genes ligados à diferenciação de célula beta, como o *Pdx1* e a *Ngn3*.

Embora o uso de *ESCs* em terapias celulares em humanos ainda seja um tópico de muita controvérsia, devido a aspectos éticos e à possibilidade de formação de teratomas, estes estudos têm contribuído significativamente para a elucidação das etapas moleculares envolvidas na organogênese pancreática (49, 50).

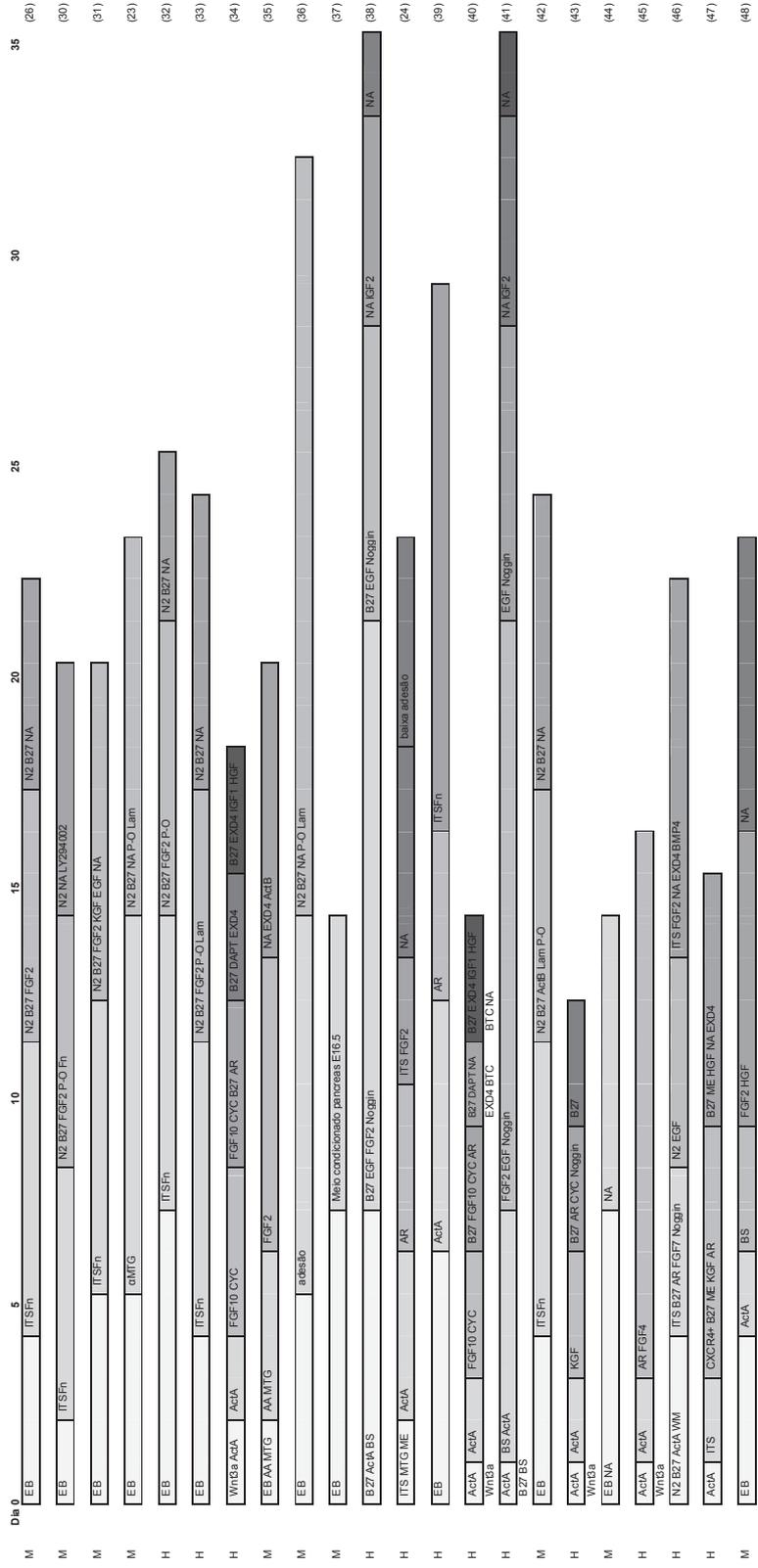


Figura 5: Exemplos de protocolos de diferenciação de células tronco embrionárias em células produtoras de insulina descritos na literatura. Todos possuem diferentes etapas diversos fatores indutores de diferenciação. M: camundongo; H: humano; EB: corpos embriões; Fn: fibronectina; P-O: poli-ornitina; NA: nicotina; αMTG: α-monotriglicerol; Lam: Laminina; Act: actina; CYC: ciclopamina; AR: ácido retinoico; BS: butirato de sódio; EXD4: extendina-4; BTC: betacelulina; AA: ácido ascórbico; ME: mercaptoetanol; WM: wortmannin; CXCR4+: células selecionadas pelo marcador CXCR4.

1.4.2.2. Células-tronco adultas (ASCs)

As células-tronco adultas (*Adult Stem Cells*) são encontradas em praticamente todos os tecidos de indivíduos adultos. Diferentes populações de ASCs já foram identificadas a partir de diversos tecidos adultos, incluindo a medula óssea, tecido neural, pele, retina, tecido muscular, pâncreas, etc. Apesar de possuírem menor capacidade de proliferação e serem comprometidas com certas linhagens celulares, as ASCs possuem a vantagem de possibilitar um transplante autólogo. Estudos recentes têm demonstrado uma grande plasticidade destas células, sendo possível diferenciá-las em linhagens diferentes daquelas às quais já estão naturalmente comprometidas.

1.4.2.2.1. Precursoras pancreáticas

As células-tronco pancreáticas tem sido estudadas há muitos anos devido ao seu poder de proliferação e comprometimento à linhagem endócrina. A estratégia de uso destas células é muito vantajosa, quando comparada ao uso de células de outras fontes, visto que existe a possibilidade de indução da expansão compensatória *in vivo* das células de interesse (51). Apesar de ser um assunto de muita controvérsia, há pelo menos duas populações de células tronco presentes no pâncreas (Figura 6). O primeiro grupo consiste de células ductais e acinares que expressam os marcadores ductais *CK-19 (Cytokeratin 19)* e *PDX1*, as quais poderiam proliferar e se diferenciar em células endócrinas (52, 53). O segundo grupo, consiste de células derivadas das ilhotas (54). Alguns trabalhos mostram células insulino-positivas surgindo de dentro de ilhotas submetidas à destruição de células β .

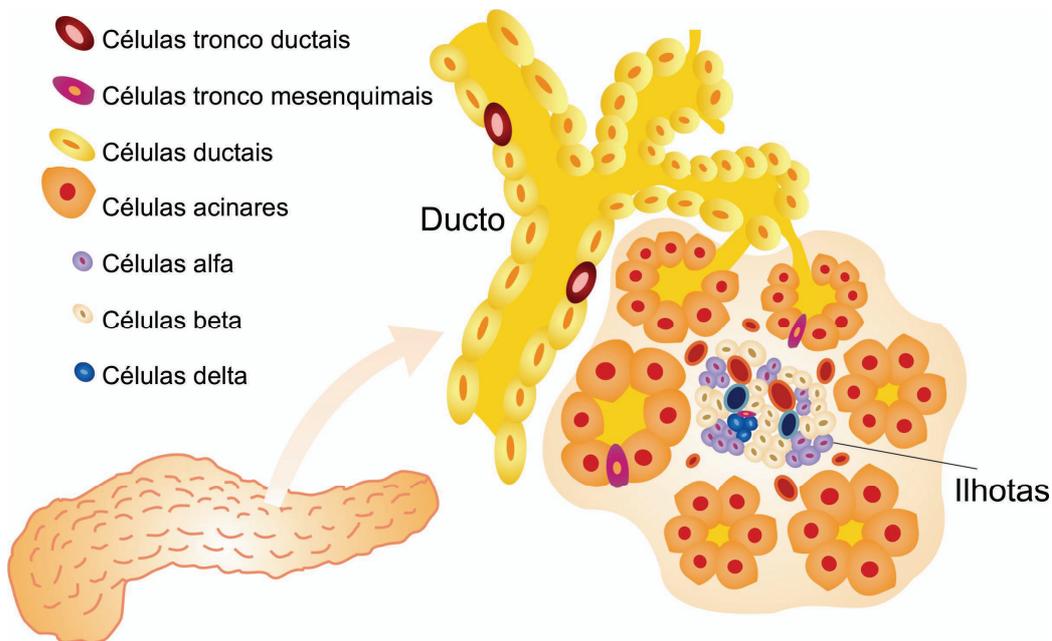


Figura 6: Populações distintas de células-tronco podem residir no pâncreas adulto. Dentre elas, as células-tronco ductais e as células mesenquimais, que podem estar presentes no tecido acinar e, inclusive, dentro das ilhotas (figura modificada de Lojudice *et al*, 2012 (12)).

Por muitos anos, células nestina-positivas foram consideradas as células-tronco oriundas das ilhotas pancreáticas, já que estas possuem um potencial proliferativo alto e podem se diferenciar *in vitro* em células com fenótipos de células hepáticas, exócrinas, ductais e endócrinas pancreáticas (55). No decorrer dos anos, a procura por células progenitoras pancreáticas foi intensa, e diversos marcadores foram descritos como sendo característicos de possíveis progenitoras pancreáticas, como o receptor de *HGF* (*hepatocyte growth factor*), *c-Kit* (também conhecido como marcador de células tronco), *DCAMKL-1* (*doublecortin-like kinase 1*), e outros (56-58).

Estudos que promovem a análise de células progenitoras nativas de cardiomiócitos e progenitoras hematopoiéticas tem contribuído muito para o conhecimento destas células progenitoras e, também, para a geração de

cardiomiócitos e células hematopoiéticas via diferenciação de células tronco de outras fontes. Em vista disso, diversos grupos procuram entender os diferentes fenótipos, perfis de expressão gênica e marcadores de superfície de células pancreáticas nativas com a finalidade de obter dados que possam contribuir na diferenciação de células tronco em células pancreáticas. Infelizmente, há pouca informação sobre o pâncreas pós-natal ou em desenvolvimento, sendo que a maioria dos estudos são focados em pâncreas órgão total, ilhotas, ou linhagens de células imortalizadas. Além disso, alguns estudos podem ter sido baseados em células obtidas de culturas “contaminadas”, uma mistura de diferentes tipos celulares, e não apenas progenitoras pancreáticas. Há algumas evidências de que células progenitoras, purificadas pela metodologia de *FACS sorting*, possam contribuir na obtenção de maiores quantidade de células produtoras de insulina, quase sem a contaminação de outros tipos celulares (59). O receptor *CXCR4* (*Chemokine (C-X-C motif) receptor 4*), conhecido por ser um marcador de endoderme definitiva, tem sido utilizado na seleção de células progenitoras da endoderme definitiva (células *CXCR4*-positivas). Quando estas células selecionadas são submetidas à diferenciação, 95% das células tornam-se *PDX1*-positivas, comparadas com menos de 10% na população de células *CXCR4*-negativas (47).

Apesar de haver muitos trabalhos descrevendo o isolamento de células-tronco pancreáticas, e de aparentemente mostrarem uma alta capacidade de diferenciação em células produtoras de insulina, quando comparados a estudos utilizando células tronco de outras fontes, nenhum grupo demonstra obter diferenciação eficiente em células β funcionais.

1.4.2.2.2. Células-tronco mesenquimais (MSCs) e hematopoiéticas

As células-tronco mesenquimais foram primeiramente encontradas em medula óssea, apresentando características muito heterogêneas, apesar de sempre manterem sua morfologia semelhante à de fibroblastos, ausência de marcadores de membrana relacionados à origem hematopoiética (*CD34*, *CD45*, *CD14*) e presença de marcadores como: *CD105*, *CD90*, *CD29*, além de poderem apresentar marcadores de pluripotência, como: *NANOG* (*homeobox transcription factor Nanog*), *OCT4* (*POU transcription factor Octamer-4*) e *SSEA* (*stage-specific embryonic antigen*).

Dentre diversos tecidos analisados, MSCs identificadas em tecido adiposo, sangue de cordão umbilical, tecido placentário, dentre outras fontes, já foram induzidas à diferenciação em células β com diversos fatores, de forma muito semelhante aos protocolos utilizados para diferenciação de células-tronco embrionárias. Da mesma forma, a diferenciação foi apenas parcial, obtendo-se células ainda mais imaturas, incapazes de reverter o Diabetes em camundongos diabetizados (60-62).

Ferramentas moleculares também tem sido utilizadas para gerar células endócrinas, com a ajuda de vetores contendo genes relacionados à diferenciação pancreática, como aqueles que codificam *Pdx1* e proinsulina (63-65).

Outra forma de se utilizar as células-tronco mesenquimais como opção terapêutica explora sua capacidade imunomoduladora e angiogênica. Estudos em modelos murinos demonstram que o transplante singeneico de células mesenquimais juntamente com ilhotas alogênicas, prolonga a sobrevivência do enxerto (66). As células-tronco mesenquimais inibem a proliferação, citotoxicidade e ativação de células *natural killer* (NK), que são importantes na imunidade inata; a

diferenciação de monócitos a células dendríticas, que são importantes para apresentação de antígenos; e as células *CD4+*, *CD8+* e B, envolvidas na rejeição de células alogênicas (67, 68).

Levando em conta, ainda, que o Diabetes tipo 1 é uma doença autoimune, outra opção terapêutica busca a conservação das ilhotas ainda presentes em pacientes recém-diagnosticados. Da mesma forma que o transplante de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea tem sido aplicado na terapia em pacientes diagnosticados com leucemia mieloide crônica, após ablação da medula, esta mesma técnica pode ser aplicada em pacientes recém-diagnosticados com Diabetes tipo 1. Numa pesquisa pioneira, realizada no Brasil, células-tronco hematopoiéticas mobilizadas foram coletadas de pacientes recém-diagnosticados com DM1, e transplantadas após ablação total da medula óssea através de tratamento imunossupressor drástico. Após o tratamento, alguns pacientes passaram a produzir insulina, alguns ds quais passaram a alcançar a normoglicemia sem a necessidade de administração de insulina exógena. Porém, após um ano, todos apresentaram hiperglicemia, necessitando retornar à insulino terapia. Não se sabe exatamente o que ocorreu com as células transplantadas, mas acredita-se que o sucesso não tenha ocorrido devido à diferenciação destas células em células β -pancreáticas (69).

1.4.2.2.3. Células-tronco pluripotentes induzidas (*iPSCs*)

Apesar das *ESCs* apresentarem alto potencial proliferativo e de diferenciação em diversos tecidos, existe a possibilidade de rejeição dos enxertos, além dos aspectos éticos envolvendo o uso de embriões humanos. Por outro lado, as células-tronco adultas tem a vantagem de possibilitar o transplante autólogo, evitando a

imunorejeição, porém sua menor potencialidade faz com que sejam células com pouca plasticidade, dificultando ainda mais sua diferenciação.

Em vista destes problemas, Takahashi e Yamanaka (70) publicaram, em 2006, um protocolo de indução de pluripotência em fibroblastos murinos adultos, utilizando vetores retrovirais contendo os genes *Oct4*, *Sox2* (*SRY-Box 2*), *c-Myc* (*v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) e *Klf4* (*Kruppel-like factor 4*). As células resultantes, designadas *iPSCs* (*induced Pluripotent Stem Cells*), possuem características similares às células-tronco embrionárias. No ano seguinte, este mesmo grupo publicou um novo trabalho sobre a indução de fibroblastos humanos da derme em *iPSCs*, utilizando os mesmos genes como indutores e obtendo células similares às *ESCs* humanas quanto à morfologia, proliferação, antígenos de superfície, expressão gênica, características epigenéticas, atividade telomérica e capacidade de diferenciação em células originadas à partir dos três folhetos germinativos (71).

Da mesma forma em que as *ESCs* têm sido induzidas à diferenciação em células produtoras de insulina, as *iPSCs* também podem ser induzidas à diferenciação, obtendo-se resultados semelhantes. Apesar das *iPSCs* apresentarem a vantagem de possibilitar um transplante autólogo, sua maior desvantagem é a forma como estas células são geradas, envolvendo o uso de vetores virais que modificam o genoma da célula. Por isso, diversos estudos estão em andamento, na tentativa de se desenvolver protocolos através de outros métodos de indução de pluripotência, utilizando adenovírus (tipo viral que não integra seu DNA no genoma do hospedeiro), agentes químicos, proteínas com domínio de transdução (ilana), plasmídeos, RNA sintético, etc (72-76).

Um estudo recente demonstrou a capacidade das *iPSCs* participarem da formação do tecido pancreático em embriões de camundongos *Pdx1^{-/-}*, que seriam incapazes de se desenvolverem devido à ausência do desenvolvimento do pâncreas. Este estudo abre a possibilidade de utilizar *iPSCs* humanas em embriões de porcos geneticamente modificados superexpressando o gene *Hes1*, o qual inibe o desenvolvimento pancreático. Dessa forma seria possível desenvolver um pâncreas inteiramente humano no corpo de um porco doador (77).

Enquanto não existe a possibilidade de uso das *iPSCs* em terapias, alguns grupos têm utilizado esta técnica para gerar *iPSCs* de pacientes portadores de diversos tipos de enfermidades, incluindo pacientes diabéticos. A obtenção de *iPSCs* de pacientes diabéticos do tipo 1, permite diferenciá-las em células β -pancreáticas e células do sistema imune, as quais, de fato, contribuem para o desenvolvimento do Diabetes tipo 1. Desta forma, será possível compreender as causas primárias envolvidas no aparecimento da doença, e por fim, desenvolver novas estratégias terapêuticas mais efetivas (78).

1.4.2.2.4. Transdiferenciação e reprogramação direta

Outra forma de se obter células produtoras de insulina (*IPCs*) seria através da reprogramação direta de células adultas em *IPCs*. Da mesma forma que se pode induzir fibroblastos a um estágio de pluripotência, tem sido demonstrado, também, que apenas a expressão ectópica de *Pax4* é suficiente para converter uma célula α pancreática (produtora de glucagon) em uma célula β , enquanto para reprogramar uma célula exócrina pancreática, é necessário a expressão de três fatores (*MafA*, *Ngn3* e *Pdx1*) (79, 80).

Células hepáticas também são excelentes candidatas para transdiferenciação, visto que compartilham uma mesma progenitora endodérmica. *Ngn3*, *NeuroD*, *Pdx1* e *Pax4* já foram descritos como fatores importantes para a transdiferenciação de células hepáticas em células β (81, 82).

Outra possibilidade seria a desdiferenciação de uma célula adulta diferenciada para um estágio de maior potencialidade, associado à expressão de fatores como *MafA*, *Ngn3* e *Pdx1*, visando reprogramar diretamente um tipo celular numa célula produtora de insulina (83).

1.5. Problemática

Na última década, inúmeros avanços ocorreram na terapia do Diabetes mellitus, tanto do ponto de vista médico, com o desenvolvimento de novas formulações para administração eficiente da insulina, como na área de pesquisa translacional, com a transferência de conhecimentos adquiridos na pesquisa básica para a clínica. O transplante de ilhotas é um ótimo exemplo de tecnologia que tem sido aperfeiçoada visando à obtenção de maior quantidade de ilhotas com a melhor qualidade possível. A maior limitação do transplante de ilhotas é a quantidade de ilhotas necessária para reversão do DM1, exigindo de dois a quatro doadores para um paciente DM1 hiperlábil. O esforço tem sido direcionado para o aumento da massa de célula β *in vitro*, entretanto, a expansão destas células *in vitro* é limitada pela tendência à perda progressiva de sua funcionalidade (produção e secreção de insulina) durante as diferentes passagens em cultura. Neste panorama, surgiram as células-tronco, que apresentam a vantagem de rápida e até ilimitada expansão em cultura, como é o caso das *ESCs* e *IPSCs*. A perspectiva de se utilizar células que permitam um transplante autólogo, como no caso de células-tronco adultas

reprogramadas para um estado pluripotente (*iPSCs*), tornam o uso das células-tronco uma alternativa ainda mais atraente. Entretanto, independente do tipo de células-tronco, sua maior desvantagem é a dificuldade que se encontra para sua diferenciação *in vitro* em células maduras que possuam a capacidade de produzir altas doses de insulina e de responder de forma fisiológica à glicose. Em vista disto, é imperativa a existência de estudos que propiciem o aprimoramento de protocolos de diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina, e contribuam para melhor compreensão das diferentes etapas da organogênese pancreática, principalmente aquelas envolvendo a maturação da células β .

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

A primeira parte do trabalho visou estabelecer um protocolo de diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (*mESCs*) em células produtoras de insulina (*IPCs*) para o tratamento de Diabetes Tipo 1.

Já a segunda parte do trabalho baseou-se em resultados obtidos durante o Doutorado do Dr, Fernando H. Lojudice, em que foram comparados os perfis de expressão gênica de células tronco embrionárias murinas indiferenciadas e diferenciadas em células produtoras de insulina (84). Dentre os genes diferencialmente expressos que foram identificados neste trabalho como estando relacionados com a diferenciação de células β -pancreáticas, um gene foi escolhido para estudo funcional, o gene *Pcp4*.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Parte 1:

- a) Desenvolvimento de novos protocolos de diferenciação de *mESCs* em *IPCs*, baseando-se em protocolos descritos na literatura e dados de desenvolvimento embrionário do tecido pancreático.
- b) Avaliação do potencial *in vivo* das células diferenciadas em *IPCs* no tratamento de camundongos diabetizados.

2.2.2. Parte 2:

- a) Seleção de um gene relacionado à diferenciação pancreática, a partir de dados descritos na tese de Lojudice (84).
- b) Clonagem do transgene em vetor lentiviral.
- c) Análise do efeito da superexpressão ou da inibição do gene *Pcp4* nas células β (MIN-6).
- d) Análise do efeito da superexpressão ou da inibição do gene *Pcp4* na diferenciação das *mESCs* em *IPCs*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Lista de Reagentes (Procedência)

- Ácido Retinóico (Sigma-Aldrich)
- Activina A (R&D Systems)
- Agarose (Invitrogen)
- Alginato (Promova)
- Ampicilina (Sigma-Aldrich)
- Bovine Serum Albumin; BSA (Sigma-Aldrich)
- Brometo de etídeo (Invitrogen)
- Ciprofloxacina (Bayer)
- *DAPI* (Invitrogen)
- *DMEM:F12* (Gibco)
- DNase I (Fermentas)
- *dNTPs* (Fermentas)
- Dulbecco's Modified Eagle; DMEM (Gibco)
- Enzimas de Restrição (Fermentas)
- Estreptomicina (Sigma-Aldrich)
- Estreptozotocina (Sigma-Aldrich)
- Exendina-4 (Sigma-Aldrich)
- *Recombinant Fibroblast Growth Factor 2, FGF2* (doado pela Profa. Dra. Maria Leonor, Inst. Butantã)
- Glicose (Sigma-Aldrich)
- Implante subcutâneo de insulina (LinShin)
- ImProm II (Promega)
- Interferon-gamma; IFN- γ (Peprotech)
- Interleucina-1-beta; IL1- β (Peprotech)
- Isoflorano; Isoforine (Cristália)
- Kit RNAspin Mini RNA (GE Healthcare)
- Leukemia inhibitory factor; LIF (Chemicon)
- L-Glutamina (Ajinomoto)
- Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
- Matrigel (BD Biosciences)
- MEM-Non Essential Aminoacids (Gibco)
- Mitomicina (Sigma-Aldrich)
- Nicotinamida (Calbiochem)
- Oligo dT (Fermentas)
- Paraformaldeído (Sigma-Aldrich)
- pBlueScript (Stratagene)
- pcDNA4/TO (Invitrogen)
- pGEM-T (Promega)

- Polibreno (Sigma-Aldrich)
- Random Primer (Invitrogen)
- RNase H (Fermentas)
- RNase OUT (Invitrogen)
- RPMI-1460 (Gibco)
- Soro fetal bovino qualificado para o cultivo de células-tronco; SFB-ES (Gibco)
- Soro fetal bovino; SFB (Cultilab)
- Sulfato de condroitina (Kin Master)
- Suplemento B27 (Gibco)
- Suplemento N2 (Gibco)
- SyBR Green (Applied Biosystems)
- T4 ligase (Fermentas)
- Taq polimerase (Fermentas)
- Tripsina (Invitrogen)
- Triton x-100 (Sigma-Aldrich)
- Tumor necrosis factor-alpha; TNF- α (Peprotech)
- Vectashield (Vector Labs)
- β -Mercaptoetanol (Gibco)

3.2. Cultivo celular

Todas as células utilizadas neste trabalho foram cultivadas em frascos plásticos adequados para o cultivo celular, exceto quando especificado. O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Estoques celulares foram congelados em meio contendo 10% de dimetilsulfóxido e soro fetal bovino, e mantidos em reservatórios contendo nitrogênio líquido.

3.2.1. Fibroblastos embrionários de camundongos (*MEF - Mouse Embryonic Fibroblast*)

Embriões de camundongos *Swiss* foram coletados 13 dias pós-coito, lavados com *PBSA* e dissecados para retirar as vísceras e a cabeça. As carcaças dos embriões foram picotadas com o uso de um bisturi por 5 min, novamente picotadas em 2 mL de tripsina por 2 min, incubadas à 37°C por 10 min com a adição de 5 mL de tripsina. Os fibroblastos foram cultivados em meio *DMEM* suplementado com 10% *SFB* e 10 µg/mL ciprofloxacina, e congeladas até serem irradiadas. As *MEFs* foram expandidas até, no máximo, a quinta passagem, para serem, então, irradiadas com raios γ (45 greys), sendo denominados *iMEF (inactivated MEF)*. As células irradiadas foram contadas e aliquotadas em frascos contendo 10^5 , 5×10^5 ou 10^6 células e congeladas até uso. As *iMEF* foram então cultivadas em placas gelatinizadas com o mesmo meio de cultura utilizado para fibroblastos, até o descongelamento das *mESCs* (descrito no item seguinte, 3.2.2.).

3.2.2. Células-tronco embrionárias murinas (*mESCs*)

A linhagem de células-tronco embrionárias murinas (*mESCs*) *USP4* foi estabelecida a partir da massa interna de blastocistos obtido no dia 3,5 pós-coito de camundonga 129/Sv, e gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Lygia da Veiga Pereira do Instituto de Biociências, USP. Resumidamente, os embriões foram separados da zona pelúcida usando solução ácida de Tyrode. Os agregados embrionários foram transferidos para placas contendo uma camada de *iMEF* (descrito no item 3.2.1.), e cultivados em meio para células *mESCs*, contendo *DMEM* suplementado com 15% de *SFB-ES*, 2mM L-Glutamina (Ajinomoto), 1X *MEM-Non Essential Aminoacids*,

1×10^3 U/ml *LIF*; 0.1 mM β -Mercaptoetanol, 10ug/mL ciprofloxacina, incubadas à 37°C em 5% CO_2 . A *iMEF* foi sempre utilizada durante o cultivo das células-tronco embrionárias. As células eram tripsinizadas sempre que a placa atingisse 70-80% de sua confluência e o meio era trocado a cada 2-3 dias (85).

3.2.3. Diferenciação de *mESC* em células produtoras de insulina

Inicialmente, utilizamos a técnica de cultura em gotas suspensas para a formação de corpos embrióides contendo 400 a 600 células cada um (25uL de meio de proliferação de *mESCs* na ausência de *LIF*). Os corpos embrióides foram cultivados em placa revestida com 2ug/mL Matrigel. O protocolo desenvolvido foi reproduzido três vezes, e consistindo de seis etapas, utilizando-se meio *DMEM:F12* (1:1) suplementado de acordo com a Figura 7.

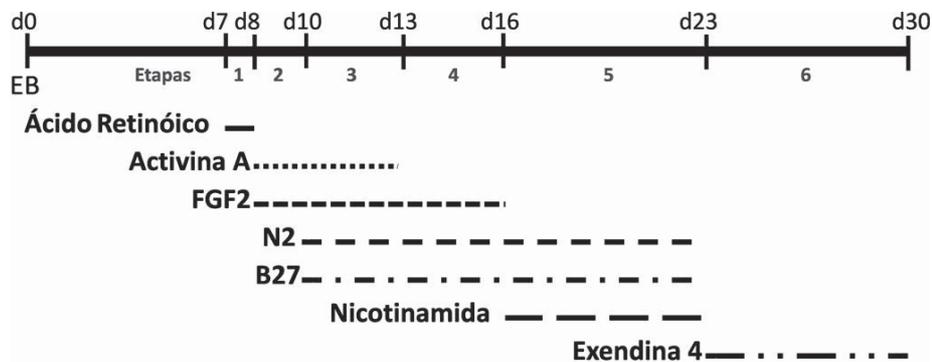


Figura 7: Protocolo de diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina. O protocolo consiste de seis etapas após a formação de corpos embrióides (mEBs): 1) Adesão em placa revestida por Matrigel contendo seguida de adição de 10^{-6} M Ácido Retinóico, 2) 2ng/mL Activina A e 10ng/mL FGF2, 3) 2ng/mL Activina A, 10ng/mL FGF2, 1X Suplemento N2 e 1X Suplemento B27, 4) 10ng/mL FGF2, 1X Suplemento N2 e 1X Suplemento B27, 5) 10mM Nicotinamida, 6) 10nM Exendina-4.

O protocolo desenvolvido por Lumelsky *et al* (26) foi utilizado como controle positivo na diferenciação de *mESCs* e no estudo funcional, e DMEM:F12 suplementado com 10% SFB-ES foi utilizado como controle de diferenciação espontânea.

3.2.4. Células de insulinoma de camundongo (MIN-6)

Como controle positivo de células beta, foram utilizadas: a linhagem celular MIN-6 (*mouse insulinoma 6*) de insulinoma de camundongo, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, do Instituto de Biologia da Unicamp (IB-Unicamp). Estas células foram cultivadas em RPMI-1460 suplementado com 10% SFB, 50 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de estreptomicina, incubadas à 37°C em 5% CO₂. A manutenção das células MIN-6 geneticamente modificadas foi realizada da mesma forma, como descrito acima.

3.2.5. Linhagem de células acinares de rato (AR42J)

Como controle positivo de células acinares, foi utilizada a linhagem celular AR42J, gentilmente cedida pela Dra. Elaine Bortoleti de Araújo do Depto de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP. Estas células foram cultivadas em RPMI-1460 suplementado com 20% SFB, 50 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de estreptomicina, e incubadas à 37°C em 5% CO₂.

3.3. Análise da expressão gênica

3.3.1. Extração e Purificação de RNA

Para extração e purificação do RNA, foi utilizado o *Kit RNAspin Mini RNA (GE Healthcare)*. As culturas celulares foram mantidas nas placas de culturas até o momento da extração, quando foram lavadas 2 vezes com *PBSA*. O *PBSA* foi removido e 350 μ l de solução de lise, contendo β -Mercaptoetanol foi adicionado à placa. O lisado foi então congelado ou submetido ao restante do protocolo de purificação de *RNA*, seguindo as instruções do fabricante. O *RNA* foi quantificado através da absorbância da amostra quando atingida por luz de comprimento de onda de 260nm (*Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop*). O grau de pureza foi determinado através da razão das medidas de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, adotando-se os valores entre 1,8 e 2,0 como sendo de grau adequado de pureza.

3.3.2. Síntese de cDNA

O *RNA* total, resultante do item 3.3.1., foi utilizado como molde para a síntese de *cDNA* em uma reação de transcrição reversa. Assim, foram preparadas as reações contendo 2 μ g de *RNA* total tratado com *DNase I*, 500 ng de Oligo dT, 100 ng de *Random Primer*, 10 μ mol de *dNTPs* em H_2O para um volume final de 12 μ l. As amostras foram incubadas à 75°C por 10 min e, em seguida, adicionou-se 14 μ l de uma solução contendo 2 μ l de DTT 0,1 M (Ditiotrietol), 1 μ l de *RNAse OUT* 40U/ μ l e 1 μ l de enzima *ImProm II* 200U/ μ l.

A reação foi incubada por 2h à 42°C e 2h à 50°C. Em seguida, para inativação da enzima, a amostra foi incubada à 75°C por 10 min. Visando degradar o *RNA*, foi adicionado 1µl de *RNase H* 5U/µl em cada tubo e os tubos foram incubados à 37°C por 30 min, e em seguida, à 75°C por 10 min para inativação da *RNase H*. Posteriormente, as amostras foram diluídas em H₂O Milli-Q.

3.3.2.1.1. Controle de qualidade do *cDNA*

Para confirmar a qualidade do *cDNA* sintetizado, foram realizadas reações de *PCR* controle com amplificação do transcrito de *Hprt* (hypoxanthina-guanine phosphoribosyltransferase), um gene *housekeeping* de expressão ubíqua. A reação foi montada de forma a apresentar uma concentração final de 1X para o tampão de reação, 2,0mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 0,2µM de cada um dos *primers* (*Forward* e *Reverse*), enzima Taq polimerase e 1µl de *template*.

Nas reações de *PCR*, foi utilizado um programa de: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 25 seg e 72°C por 1 min e, em seguida, a extensão à 72°C por 5 min. Os produtos das reações de *PCR* foram posteriormente analisados em um gel de agarose 1% em TBE 1X, contendo brometo de etídeo.

3.3.3. *RT-PCR* quantitativo em tempo real (*qRT-PCR*)

O *qRT-PCR* foi realizado pela técnica de *SyBR Green Dye*, utilizando-se o equipamento *ABI 7300 Real Time PCR (Applied Biosystems)* e os resultados foram calculados utilizando-se o método $\Delta\Delta Ct$, sendo o gene *Hprt*, o controle endógeno.

3.4. Imunofluorescência Indireta

As células foram fixadas e permeabilizadas em 4% paraformaldeído/Triton X-100 durante 1 hora à 4°C. Após a fixação, as células foram incubadas por 1h à temperatura ambiente ou *overnight* à 4°C, em solução de bloqueio (2% BSA em PBSA), para bloqueio dos sítios inespecíficos.

O anticorpo primário, diluído em solução de PBSA, foi incubado *overnight*, à 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas com PBSA três vezes, 30 minutos cada, e incubadas por 1h, à 37°C, com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo e com DAPI para visualização dos núcleos. As lâminas foram lavadas mais três vezes em PBSA, 30 minutos cada, e montadas em Vectashield.

A marcação fluorescente foi observada utilizando um microscópio Nikon (Eclipse TE300) equipado com objetiva de 60x, com imersão em óleo. Para captura das imagens utilizou-se uma câmara CCD de alta resolução (Princeton Instruments).

3.4.1. Anticorpos

- Anticorpo policlonal anti-CXCR4 (IgG de coelho), diluição 1:100 (Abcam, ab2074)
- Anticorpo policlonal anti-GLUT2 (IgG de coelho), diluição 1:600 (Millipore, 07-1402)
- Anticorpo policlonal anti-NGN3 (IgG de coelho), diluição 1:500 (Chemicon, AB5684)
- Anticorpo policlonal anti-PAX4 (IgG de coelho), diluição 1:100 (Abcam, ab4250)
- Anticorpo policlonal anti-PDX1 (IgG de coelho), diluição 1:600 (Abcam, ab4767)
- Anticorpo monoclonal anti-Proinsulina (IgG de camundongo), diluição 1:50 (R&D Systems, clone # 253627)

- Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Texas Red, diluição:
1:2.000

- Anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488, diluição:
1:2.000

3.5. Ensaaios *in vivo*

Todos os procedimentos em animais foram realizados conforme protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Química da USP (Anexo A).

3.5.1. Microencapsulamento de *IPCs*

No primeiro experimento, as células *mESCs* indiferenciadas (controle) ou diferenciadas em *IPCs* foram soltas das placas utilizando-se 4 mg/mL de dispase (mantendo os agregados celulares), lavadas 2 vezes e então misturadas com o biomaterial Biodritina[®], contendo 1,2% alginato e sulfato de condroitina na proporção 4:1. A mistura do biomaterial com células foi submetido a gotejamento em solução 20 mM BaCl₂, conforme descrito anteriormente por nosso grupo (86).

Já no segundo experimento, as células diferenciadas em *IPCs* foram submetidas ao tratamento com 10 µg/mL de mitomicina por 3 horas. Após o período de incubação, as células foram lavadas e soltas utilizando-se 4mg/mL de dispase por 4 minutos (mantendo os agregados celulares), lavadas 2 vezes e misturadas com o biomaterial *Bioprotect*[®], contendo contendo 1,2% alginato e sulfato de

condroitina na proporção 4:1, e 10 mg/mL de laminina, como descrito anteriormente por nosso grupo (87). Cápsulas vazias foram utilizadas nos animais controle.

3.5.2. Diabetização de camundongos

Camundongos *Swiss* ou *Balb/c* de 8 semanas foram submetidas a jejum de 6h e então diabetizados quimicamente através de administração intraperitoneal de solução de estreptozotocina 250 mg/Kg em tampão citrato, pH 4,5. Após injetar a solução de estreptozotocina intraperitonealmente, a ração foi disponibilizada novamente após 2h de jejum e a água foi substituída por solução com sacarose (mantida até o dia seguinte). Os camundongos só foram considerados diabéticos após alcançarem glicemia acima de 300 mg/dL, em 3 medidas consecutivas.

3.5.3. Monitoramento da glicemia

A glicemia foi mensurada por fotometria (Accu-Chek Performa, Roche), retirando-se uma microgota de sangue (3 a 5 microlitros) da ponta da cauda do animal e aplicando-se ao glicosímetro.

3.5.4. Transplante das células microencapsuladas

3.5.4.1. Uso de *IPCs* no tratamento de camundongos diabetizados

As *mESCs* indiferenciadas ou diferenciadas em *IPCs* microencapsuladas em Biodritina[®] foram transplantadas intraperitonealmente em camundongos diabetizados. Os camundongos *Swiss* foram submetidos à anestesia inalatória com

isofluorano e as microcápsulas foram injetadas por uma incisão ventral. A glicemia dos animais foi mantida pelas primeiras 2-3 semanas após transplante utilizando-se implante subcutâneo de insulina. Cápsulas contendo *mESC*s indiferenciadas foram utilizadas nos animais controle.

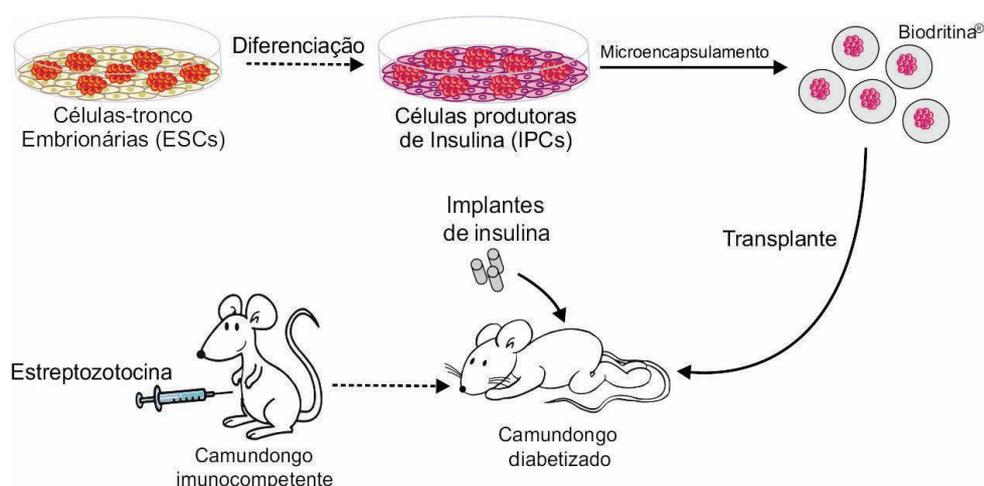


Figura 8: Esquema do primeiro experimento *in vivo*. As *mESC*s foram diferenciadas *in vitro*, microencapsuladas e transplantadas em camundongos diabéticos por estreptozotocina. Inicialmente, a glicemia dos animais foi mantida por implantes subcutâneos contendo insulina.

3.5.4.2. Diferenciação final de *IPCs in vivo*

Primeiramente, as células microencapsuladas em *Bioprotect*[®] foram transplantadas intraperitonealmente em camundongos Balb/c normais de 8 semanas. Para tanto, os procedimentos realizados foram os mesmos descritos anteriormente no item 3.5.4.1. Após 60 dias de maturação *in vivo*, as cápsulas foram retiradas por lavagem intraperitoneal, e retransplantadas em camundongos Balb/c diabéticos com estreptozotocina, da mesma forma como descrito anteriormente. Cápsulas vazias foram utilizadas nos animais controles.

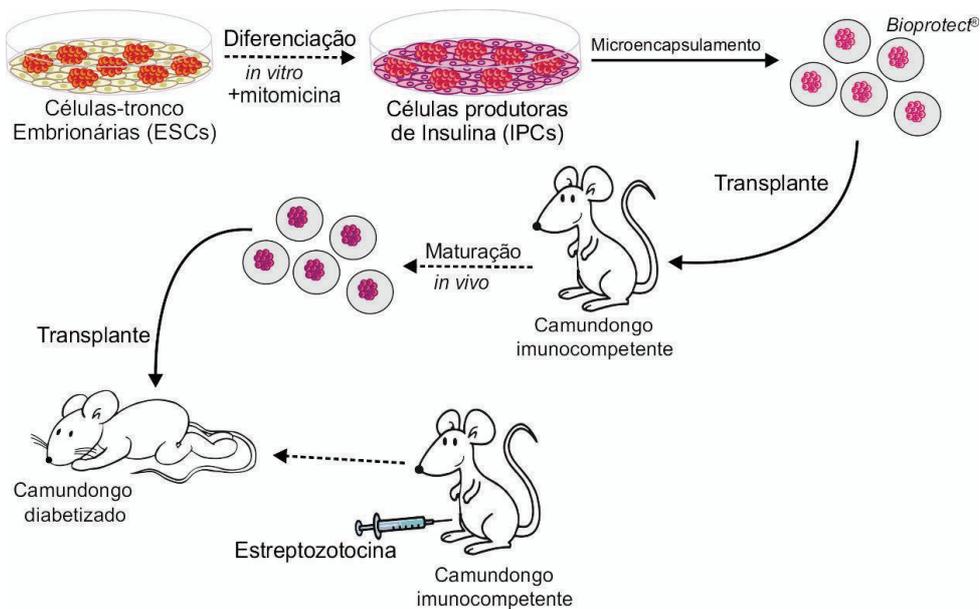


Figura 9: Esquema do segundo experimento *in vivo*. As *mESC*s foram diferenciadas *in vitro*, microencapsuladas e transplantadas em camundongos normais para diferenciação final *in vivo*. Após 60 dias, as células foram retiradas e retransplantadas em camundongos diabéticos.

3.5.5. Teste oral de tolerância à glicose (OGTT)

O teste oral de tolerância à glicose (*oral glucose tolerance test, OGTT*) foi realizado seis semanas após o transplante. Os animais foram inicialmente submetidos a jejum (tempo zero) e, então, tratados com solução com glicose (4g/kg de massa corpórea por gavagem). Os níveis de glicemia foram então mensurados a cada 15 minutos até 190 minutos.

3.6. Estudo funcional do gene *Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)*

Durante a tese de Doutorado do Dr. Fernando Lojudice (84), foi analisada a expressão diferencial de genes em células-tronco embrionárias murinas que foram submetidas à diferenciação em células produtoras de insulina, segundo o protocolo

publicado por Lumelsky *et al* (26). Utilizando lâminas CodeLink Mouse Whole Genome Bioarray (contendo 34.967 oligonucleotídeos derivados de genes depositados no *GenBank*, *RefSeq* e *Unigene* até o mês de abril/2004) e uma série de softwares para análise dos resultados (*GenePix 4000B*, *CodeLink System Software*, *GenePix Pro*, *Support Vector Machine (SVR)*), mais de 1000 genes foram identificados como sendo regulados positivamente (superexpressos). Pesquisamos referências dos 20 genes mais expressos, utilizando-se de Bancos de Dados do *NCBI*, como *OMIM* e *Unigene*, além de publicações que pudessem dar indícios de que esses genes pudessem estar relacionados à embriogênese pancreática.

3.6.1. Superexpressão do gene *Pcp4*

3.6.1.1. Construção do vetor de expressão

O vetor pCMVTO/SV40p/*neo* foi construído a partir do vetor-molde pLV-EF1a/GFP, uma modificação do vetor lentiviral p156RRLsinPPTCMVIns3IRESPRE (substituição de um promotor *CMV* por um promotor EF1-alfa). Este vetor foi montado a partir da restrição do vetor pLV-EF1a/GFP (BamHI/Sall), sendo, em seguida, realizada a clonagem de um cassete para expressão do gene *neo* (que confere resistência ao antibiótico geneticina) sob o controle do promotor *SV40*. Após obtenção desta construção, denominada pLV-EF1a/SV40p/*neo*, a mesma foi submetida à nova restrição (ClaI/XbaI) para remoção do promotor EF1-alfa e posterior clonagem do promotor CMVTO, o qual foi amplificado a partir do vetor pcDNA4/TO (Invitrogen) e digerido com as enzimas ClaI e XbaI. Esta construção resultante foi denominada pCMVTO/SV40p/*neo*.

O vetor pCMVTO/SV40p/*neo* permite a clonagem de um gene de interesse em um cassete de expressão sob o controle de um promotor induzível, o promotor CMVTO. Este vetor foi construído a fim de permitir a expressão de modo induzível do gene de interesse, em conjunto com o vetor pLV-EF1a/TetR/IRES/*DsRed2*, de expressão constitutiva do gene *TetR* (repressor do operon *lac*), o qual inibe a expressão de cassetes de expressão contendo o promotor CMVTO (promotor CMV fusionado a um operador *Tet*), o qual contém o gene de interesse. Apesar deste sistema não ter sido utilizado neste trabalho, permite a utilização do sistema em trabalhos futuros, permitindo induzir a expressão do transgene de interesse em momentos diferentes da diferenciação.

3.6.1.2. Clonagem da região codificadora do gene *Pcp4*

Os seguintes oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar a região do cDNA referente à sequência codificadora do gene *Pcp4* de células MIN-6: 5'taacgcgtctgcggagtcaggccaacat 3' e 5'ttaccggggcagcttcaccactaggactgtg 3'. Após a PCR, o fragmento foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T utilizando-se T4 ligase. O inserto obtido foi clonado no vetor pGEM-T e seqüenciado, para estabelecer a orientação e confirmar a ausência de mutações. A partir da construção pGEM-*Pcp4*, retirou-se o inserto utilizando-se a enzima de restrição EcoRI. Este inserto foi transferido para o vetor *pBlueScript* e, digerido com as enzimas BamHI e NheI para permitir a subclonagem do gene *Pcp4* no vetor pCMVTO/SV40p/*neo* (BamHI/NheI), sendo denominado pLV-CMVTO/*Pcp4* (Figura 10).

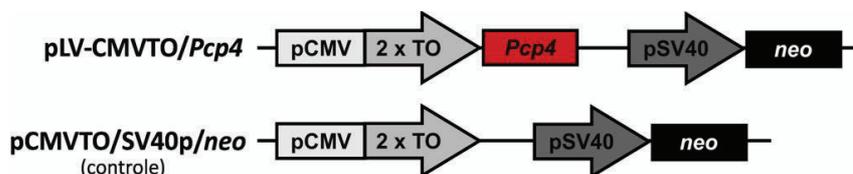


Figura 10: Esquema dos cassetes de expressão dos vetores pLV-CMVTO/*Pcp4* e pCMVTO/SV40p/*neo* (vetor controle) utilizados no estudo de superexpressão do gene *Pcp4*.

3.6.2. Knockdown do gene *Pcp4*

A diminuição da expressão do gene *Pcp4* (NM_008791) foi realizada pela técnica de *shRNA*, com o uso de vetores pLKO.1 (que confere resistência ao antibiótico puromicina) com sequências específicas para diminuir a expressão do gene utilizando-se da técnica de RNA de interferência (*MISSION shRNA lentiviral plasmids*, Sigma-Aldrich). Analisamos cinco sequências diferentes em células MIN-6 e escolhemos as sequências de maior eficiência de inibição, denominadas shRNA1 (TRCN0000177109; NM_008791.1-100s1c1; 5' CCGGGAATTTGATATCG ACATGGATCTCGAGATCCATGTCGATATCAAATTCTTTTTTG 3') e shRNA2 (TRCN0000177390; NM_008791.1-97s1c1; 5' CCGGGAAGAATTTGATATCGACAT GCTCGAGCATGTCGATATCAAATTCTTTTTTG 3'). O vetor pLKO.1 vazio foi utilizado como controle (Figura 11).

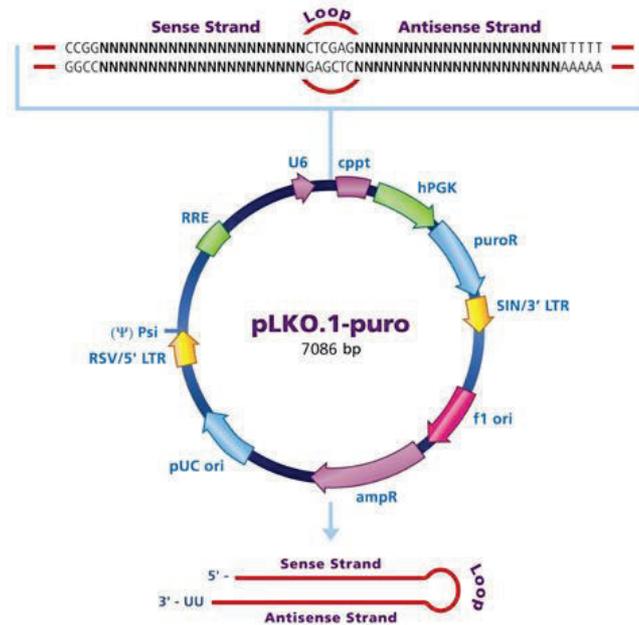


Figura 11: Mapa do vetor pLKO.1-puro utilizado no estudo de inibição da expressão do gene *Pcp4* (88).

3.6.3. Produção de partículas lentivirais

Células 293T foram plaqueadas em placa de seis poços na presença de 10% SFB-ES em *DMEM*, 16 a 24h antes da transfecção. A mistura dos DNAs plasmídeos para a produção de partículas lentivirais foi feita na proporção indicada por Tiscornia *et al.* (89), junto com o reagente de lipofecção (Lipofectamine 2000), segundo as instruções do fabricante. As coletas de sobrenadante contendo partículas lentivirais foram realizadas após 24, 48 e 72h. Os sobrenadantes de cada coleta foram centrifugados a 10.000 x g por 5 min à temperatura ambiente para eliminar restos celulares e, em seguida, aliquotados e congelados à -70°C.

3.6.4. Transdução lentiviral

Para a transdução das células MIN-6, cerca de 4×10^4 células em suspensão em meio *DMEM* contendo 10% SFB foram transduzidas com 100 μ l do meio condicionado contendo as partículas virais, na presença de polibreno na concentração final de 10 μ g/ml. Baseado em produções anteriores, estima-se que o título seja da ordem de 10^7 UFC/ml. Considerando-se este título, a *MOI* (*Multiplicity of Infection*) para a condição empregada seria de aproximadamente 20. Após a adição dos volumes de meio condicionado contendo as partículas virais, as células foram semeadas em placas de 24 poços.

A transdução de *mESCs* foi realizada utilizando-se o mesmo método descrito anteriormente, porém partindo-se de 1×10^3 células por poço, utilizando 500 μ l de meio condicionado contendo partículas virais (*MOI* de aproximadamente 100) em meio de proliferação para *mESCs*.

Após 72h de transdução, as células (MIN-6 ou *mESCs*) foram selecionadas por 7 dias com o uso de geneticina (G418; 100 μ g/mL ou 700 μ g/mL, respectivamente), no caso do vetor de expressão, ou puromicina (3 μ g/ml), no caso do vetor de *shRNA*.

3.6.5. Curva de crescimento

As células MIN-6 parentais ou geneticamente modificadas foram semeadas na densidade de $2,5 \times 10^4$ células/cm², em placas de 12 poços. Foram realizadas coletas, em triplicata, nos dias 2, 3, 4 e 5 após o plaqueamento, utilizando-se de tripsina para remover as células da superfície. Para a contagem de células, utilizou-se a câmara de Neubauer.

3.6.6. Ensaio de apoptose

As células MIN-6 parentais ou geneticamente modificadas foram semeadas na densidade de 10^5 células/cm² em placas de 6 poços. Após adesão, as células foram submetidas à carenciamento de soro por 24h, em meio *RPMI-1460* contendo 0,1% SFB. Após adição de um coquetel de citocinas contendo 4 ng/mL *TNF- α* , 2 ng/mL *IFN- γ* e 0,4 ng/mL *IL1- β* , as células foram coletadas 24h após tratamento, utilizando-se solução de Versene por 30 min em agitação à 4°C. Para análise da apoptose, utilizou-se a técnica de fragmentação de *DNA*, em que as células foram incubadas em solução desnaturante de Iodeto de Propídeo (*PI*) e submetidas à análise por citometria de fluxo em um citômetro FACSAria I/II (BD Bioscience). A análise e processamento dos resultados foram realizados utilizando-se o programa FlowJo 7.6.3 (Tree Star Inc.).

3.7. Análise estatística

Todos os dados numéricos obtidos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa *Prism v4.02* (GraphPad). Para análise da diferença de expressão de cada gene, entre as amostras analisadas, foi utilizada uma análise de variância unidirecional (*one-way ANOVA*) seguida de um teste de Tukey, que realiza uma comparação dois a dois das médias dos valores de níveis de expressão. No caso em que apenas havia apenas dois grupos experimentais a serem comparados foi utilizado o teste t não pareado.

4. RESULTADOS

4.1. Diferenciação de células tronco embrionárias murinas (*mESCs*) em células produtoras de insulina (*IPCs*)

4.1.1. Diferenciação *in vitro*

Com base na estratégia de mimetizar a embriogênese pancreática, foi utilizado ácido retinóico e activina A no início da diferenciação a fim de se obter células precursoras da endoderme (90). Nestas etapas, pode-se notar o surgimento de células com aparência epitelial a partir dos corpos embrióides. Estas células precursoras proliferaram durante as etapas seguintes, sendo capazes de formar novos agrupamentos de células, as quais, juntamente com os agrupamentos anteriores, formaram estruturas semelhantes a ilhotas. Nas placas submetidas ao protocolo de diferenciação desenvolvido, foi possível observar uma alta taxa de células coradas por ditizona (corante específico para o Zn^{2+} presente nos grânulos de insulina), quando comparadas às mesmas células submetidas à diferenciação espontânea (Figura 12).

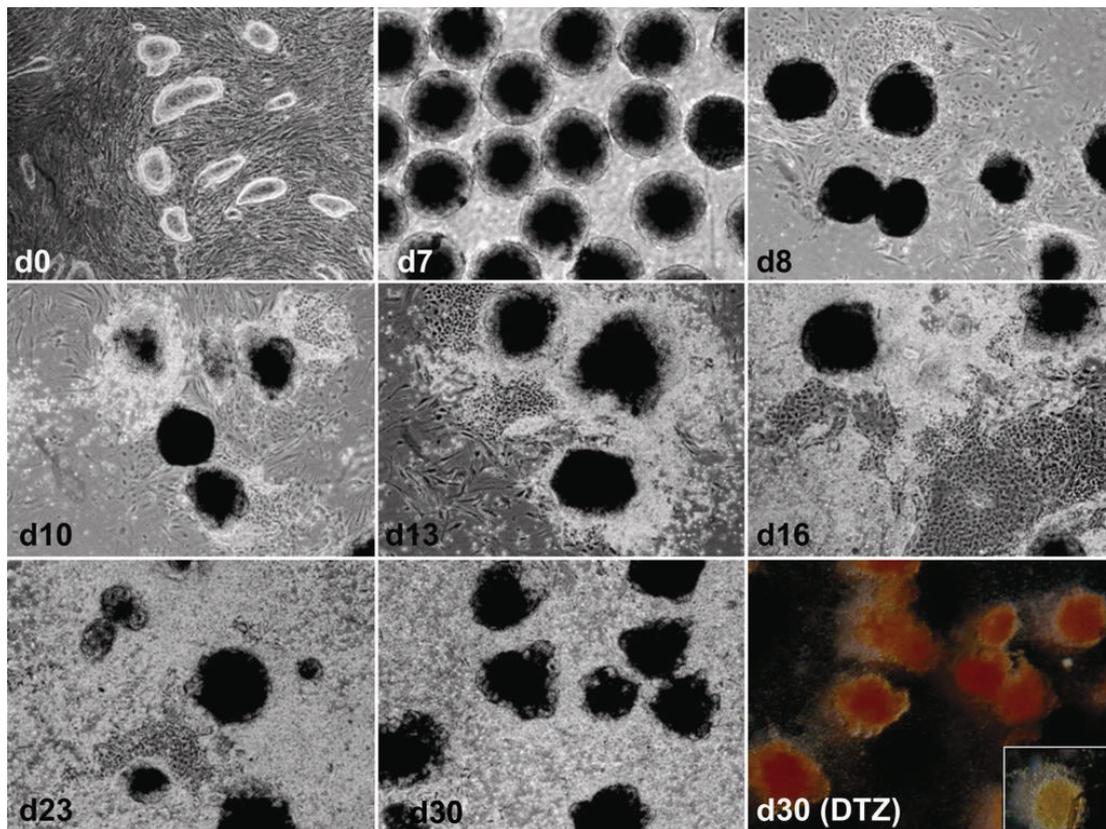


Figura 12: Morfologia de mESCs submetidas à diferenciação em IPCs por microscopia de fase (aumento 40X), nas diferentes etapas no dias 0, 7, 8, 10, 13, 16, 23 e 30. DTZ: Coloração por ditizona; células diferenciadas espontaneamente no quadro inferior direito.

Apesar da coloração por ditizona não ser tão intensa quanto em ilhotas pancreáticas coradas, ao final da indução, foi possível observar a expressão dos transcritos de *Ins2*, *Pdx1*, *Isl1*, *Ngn3* e *Glut2*. Também analisou-se a expressão destes genes durante a primeira parte da indução de precursores (d10), verificando que já existe expressão de *Ins2*, *Ngn3*, *Isl1*, *Pdx1*, *Glut2* e *MafA* (Figura 13). Em 10 dias de indução da diferenciação já foi possível observar a presença da proteína *CXCR4* com marcação citoplasmática/membranar, além da presença de *PDX1* citoplasmático e baixos níveis de Proinsulina em algumas células (Figura 14). A marcação por *PDX1* permanece até o final do protocolo, apresentando localização nuclear em algumas células no dia 30 de indução.

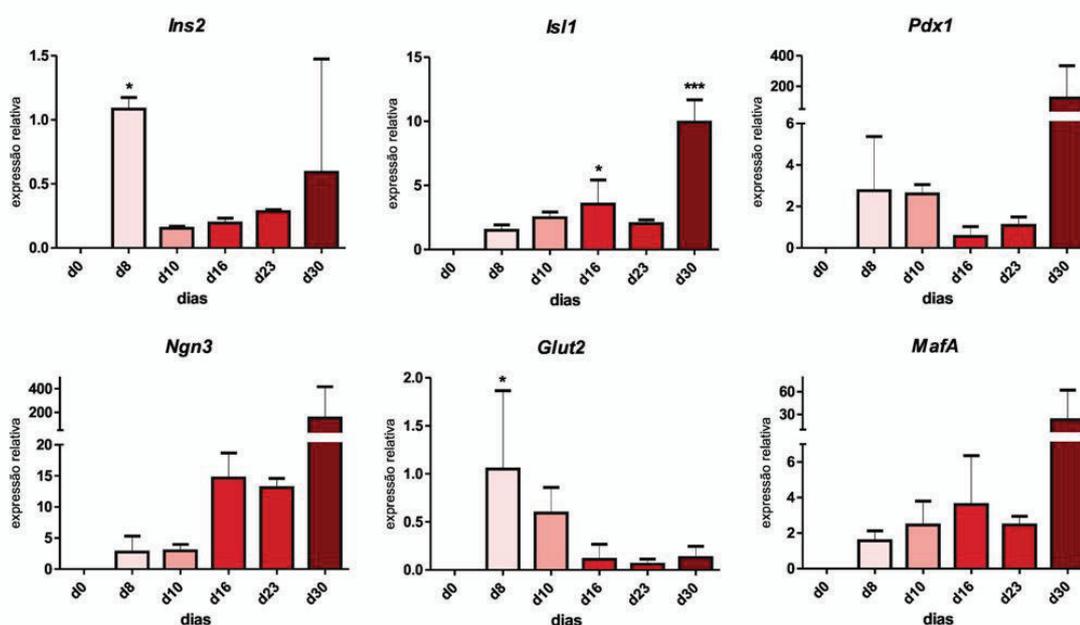


Figura 13: Expressão dos genes *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA* de mESCs submetidas à diferenciação em IPCs nos diferentes dias, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; *p<0,05, ***p<0,001, versus d0).

Após a formação de corpos embrióides (oito dias de indução da diferenciação), já era possível detectar a expressão de todos os genes analisados, sendo que, no decorrer da diferenciação, os perfis de expressão de *Ins2* e *Pdx1* apresentaram dois picos de expressão, enquanto os perfis dos genes *Isl1*, *Ngn3* e *MafA* apresentaram um aumento gradativo até o final da diferenciação, ao contrário do gene *Glut2*, que apresentou um pico de expressão durante as primeiras etapas, mantendo uma menor expressão até o final da diferenciação (Figura 13).

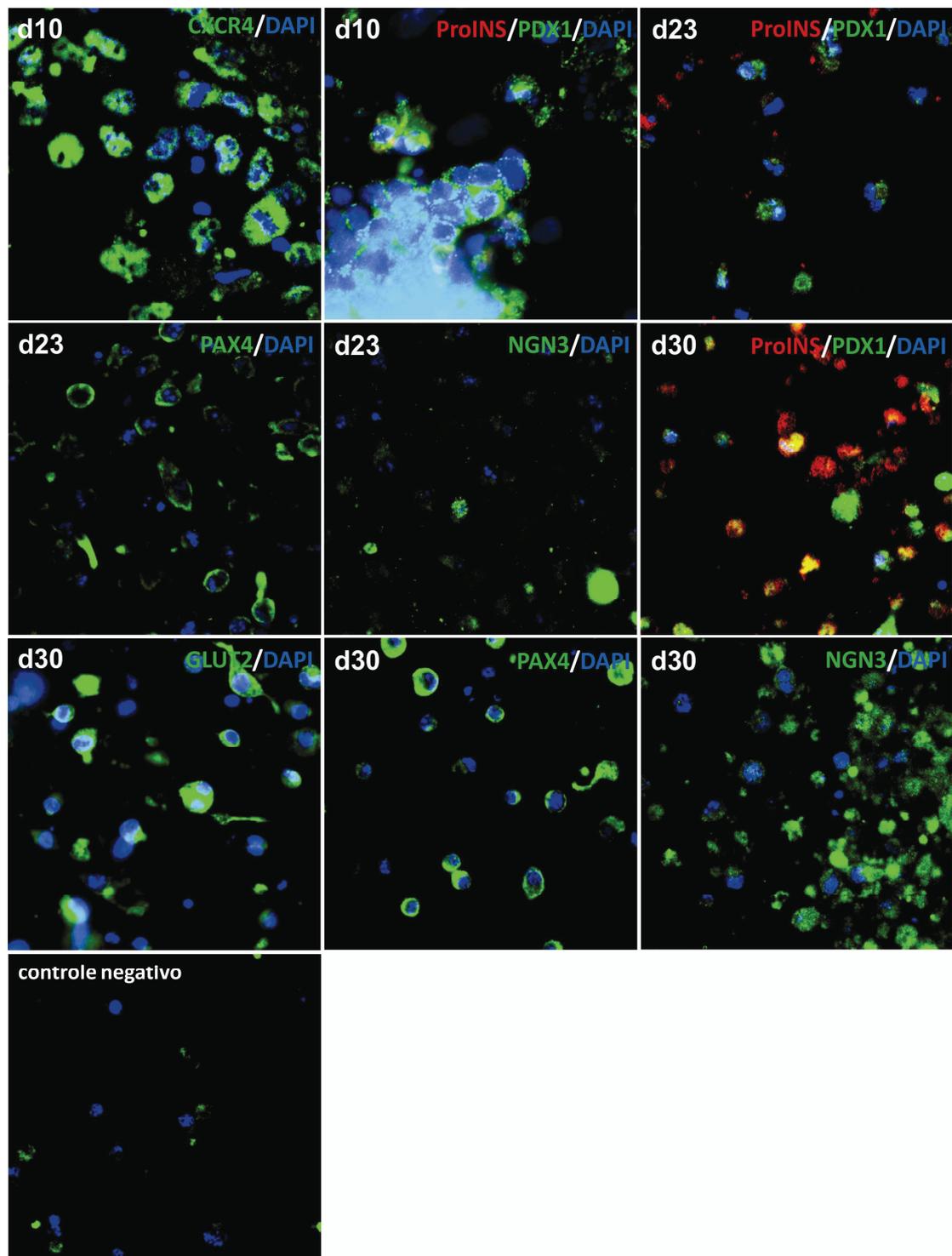


Figura 14: Imunofluorescência das proteínas *CXCR4*, Proinsulina, *PDX1*, *GLUT2*, *NGN3* e *PAX4* em *mESCs* submetidas à diferenciação em *IPCs* nos dias 10, 23 e 30 (aumento: 600X; núcleos corados por *DAPI*).

Após 23 dias de indução da diferenciação, já foi possível observar a presença de baixos níveis citoplasmáticos de *NGN3* em algumas células, e da proteína *PAX4* citoplasmática, ainda em baixa marcação (Figura 14). Ao final do protocolo de diferenciação, os agrupamentos denominados *islet-like* coraram positivamente com ditizona e expressavam os genes *Ins2*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Isl1*, *Glut2* e *MafA* (Figura 13), além disso, foi possível observar a presença das proteínas *Proinsulina* e *PDX1*, sendo expressas juntamente por algumas células, forte marcação dos marcadores *GLUT2* e *PAX4*, e baixa marcação de *NGN3* em algumas células.

4.1.2. Utilização das *IPCs* no tratamento de camundongos diabetizados

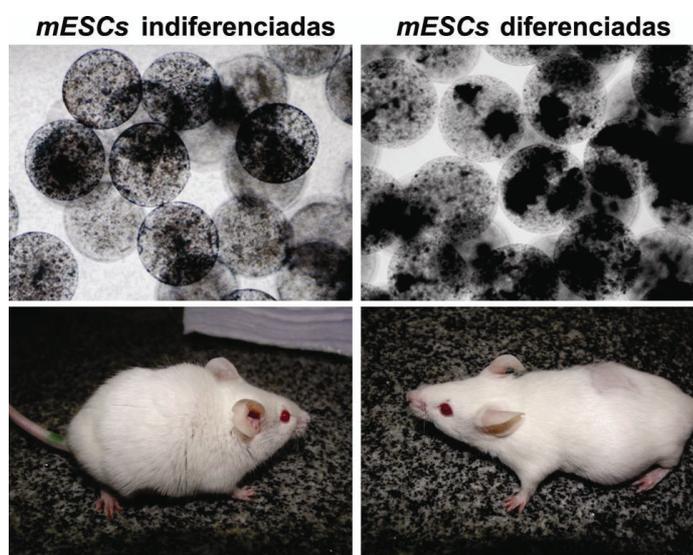


Figura 15: Células microencapsuladas (*IPCs* ou *mESCs* indiferenciadas) por microscopia de fase (aumento: 40X), e aparência da pelagens de animais tratados com *mESCs* indiferenciadas (controle) ou *IPCs*.

Para avaliar o potencial destas células diferenciadas *in vitro* em células produtoras de insulina na reversão do Diabetes, *IPCs* foram microencapsuladas e transplantadas em camundongos diabetizados. Observamos a manutenção da normoglicemia por cerca de 24 dias nos camundongos que receberam as células diferenciadas, enquanto os camundongos do grupo controle mantiveram a glicemia por apenas 14 dias. Apesar dos níveis de produção de insulina não serem suficientes para a manutenção da glicemia após 24 dias, os animais tratados com células diferenciadas, apresentaram melhor controle glicêmico, principalmente demonstrado pelo teste oral de tolerância à glicose (*OGTT*), apresentando uma curva resposta com pico semelhante àquele observado nos animais controle não-diabéticos. Além disso, também apresentaram melhor ganho de massa corpórea e aparência da pelagem saudável, na ausência de apatia, que caracteriza um animal diabetizado (Figura 15 e 16).

Após aproximadamente 40 dias de transplante, os animais controle, tratados com *mESCs* indiferenciadas, desenvolveram ascite, sendo a possível causa de óbito 55 dias após o transplante. Por volta do dia 70 após o transplante, também se observou o desenvolvimento de ascite nos animais tratados com células diferenciadas, e apesar da ausência de apatia, os animais foram sacrificados e as células foram recuperadas para serem analisadas. Foi observado um aumento de 10 vezes no volume de células recuperadas da cavidade intraperitoneal. As células implantadas foram capazes de ultrapassar o biomaterial das microcápsulas e crescer em sua periferia, ou em forma de agregados semelhantes a ilhotas, sendo ambas estruturas coradas positivamente por ditizona. Estas células foram analisadas quanto à expressão gênica, demonstrando diminuição da expressão de *Is1* e aumento da expressão de *Glut2*, após o período do transplante (Figura 17).

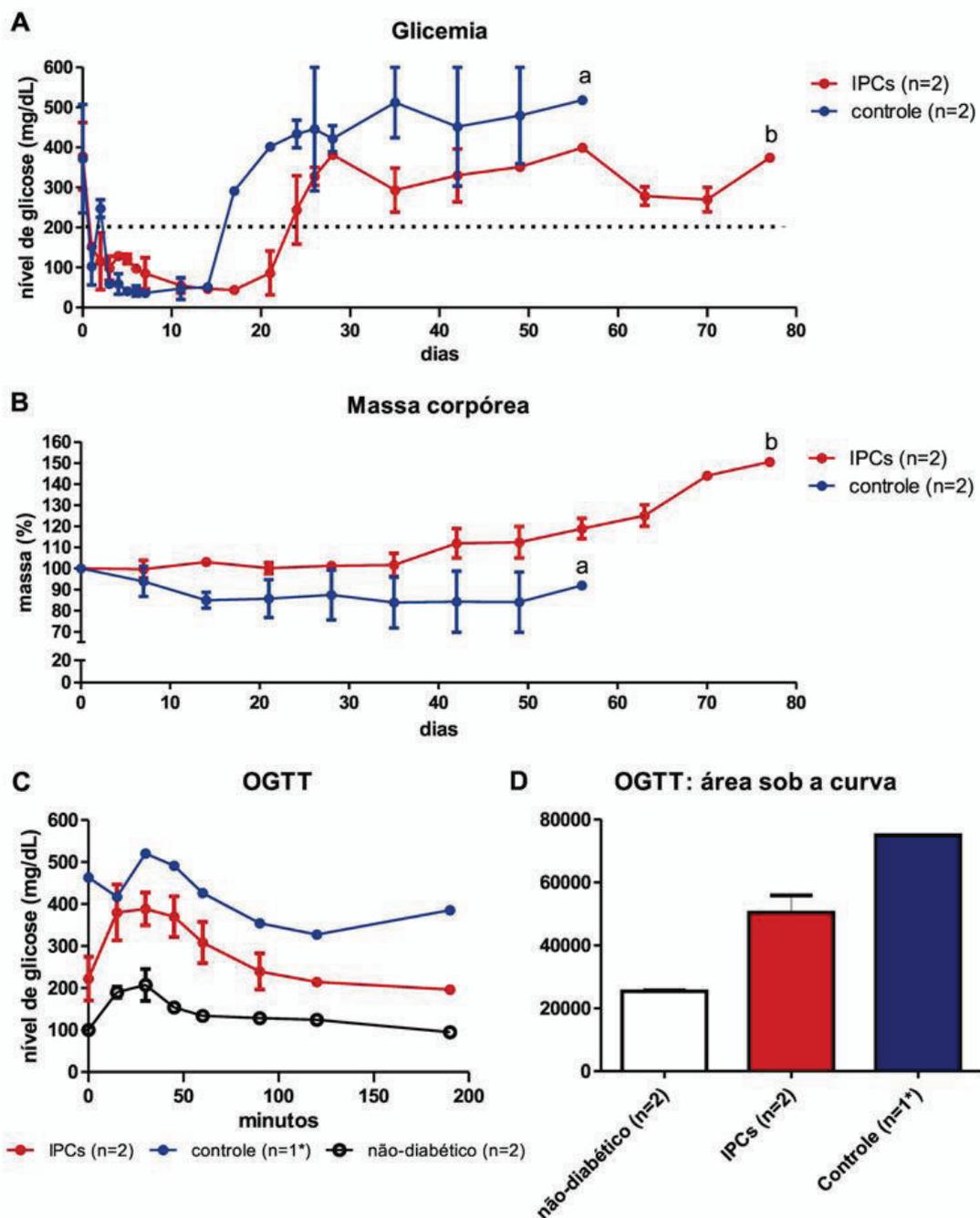


Figura 16: A) Monitoramento da glicemia nos animais tratados com *mESCs* indiferenciadas (controle) ou *IPCs*. B) Monitoramento da massa corpórea. C) Teste oral de tolerância à glicose (OGTT), 6 semanas após o transplante. D) Área sob as curvas de OGTT. (a=morte; b=eutanásia). * um dos animais controle apresentou glicemia acima de 600mg/dL no início do teste, impossibilitando sua análise.

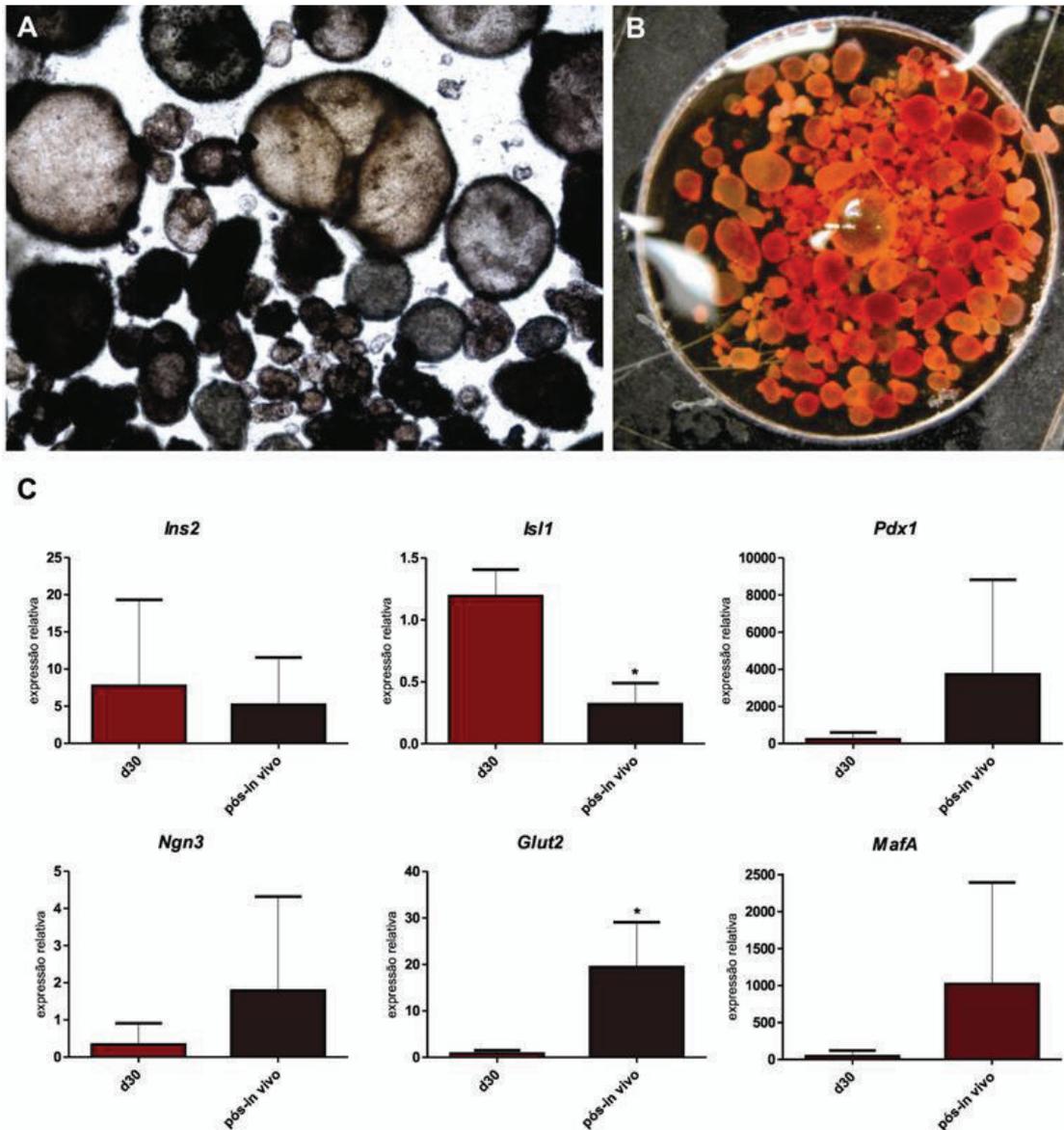


Figura 17: **A)** Células produtoras de insulina (*IPCs*) que cresceram na periferia das cápsulas ou agrupamentos de células semelhantes a ilhotas, recuperados dos animais tratados (microscopia de fase, aumento: 40X). **B)** Estruturas coradas por ditizona (estereomicroscópio de luz, aumento: 3,5X). **C)** Expressão dos genes *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA* de *IPCs* recuperadas dos animais transplantados, analisados por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; d30: n=3 e pós-*in vivo*: n=2; * $p < 0,05$).

4.1.3. Maturação final de *IPCs in vivo*

Com o objetivo de maturar as *IPCs* diferenciadas *in vitro*, inicialmente, foi realizado o transplante destas células tratadas com Mitomicina C e encapsuladas com *Bioprotect*[®] em camundongos normais. Após 60 dias de maturação *in vivo*, estas células não foram capazes de induzir teratomas ou transpassar o biomaterial como relatado no caso anterior, apresentando coloração positiva para ditizona e expressão dos genes *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA* muito elevada em relação às células transplantadas inicialmente (Figura 18).

Os camundongos normais que receberam estas células mantiveram níveis normais de glicemia, sem alteração alguma de comportamento durante os 60 dias. Para avaliar o potencial destas células diferenciadas *in vivo* na reversão do Diabetes, estas células foram transplantadas em camundongos diabetizados. Observou-se uma redução da glicemia logo nos primeiros dias após o transplante, alcançando a manutenção da normoglicemia por até 50 dias nos camundongos que receberam as células diferenciadas, enquanto camundongos do grupo controle, que receberam cápsulas vazias, e camundongos diabéticos mantiveram a hiperglicemia (experimento em andamento). Além disso, um dos camundongos do grupo controle foi sacrificado devido ao aparecimento de forte apatia. Logo na primeira semana após o transplante, foi realizado o *OGTT* e pode-se observar que, os camundongos tratados com *IPCs*, respondiam de forma similar aos animais normais, inclusive reestabelecendo a normoglicemia após 120 minutos (Figura 19)

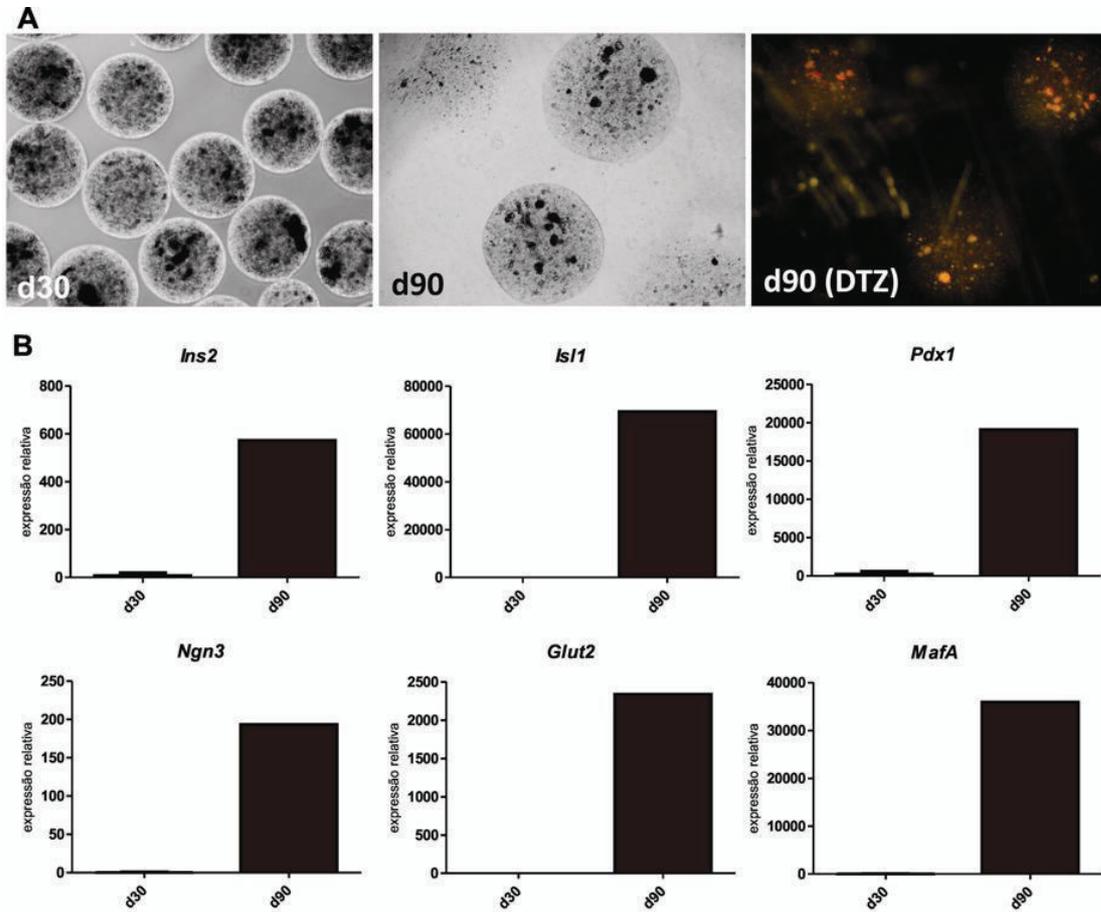


Figura 18: A) À esquerda, *IPC*s encapsuladas após 30 dias de diferenciação *in vitro*. No centro, *IPC*s após 30 dias de diferenciação *in vitro* e 60 dias de maturação *in vivo* (microscopia de fase, aumento: 40X) e, à direita, coradas com ditizona (esteromicroscópio de luz, aumento: 3,5X). **B)** Expressão dos genes *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA* de *IPC*s recuperadas após 60 dias de diferenciação *in vivo*, analisados por qRT-PCR (controle endógeno: *Hprt*; d30: n=3 e d90: n=1).

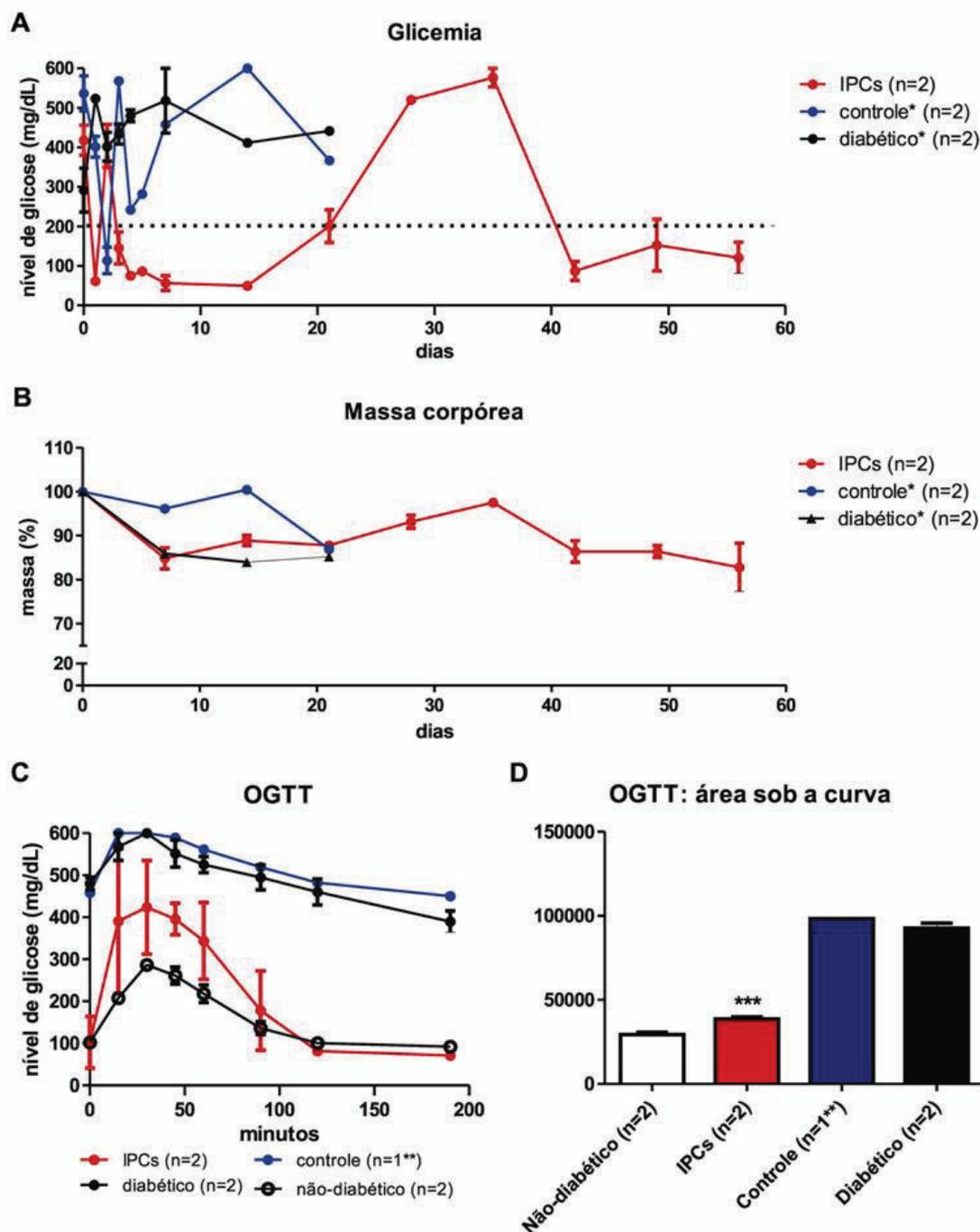


Figura 19: A) Monitoramento da glicemia nos animais tratados com IPCs encapsuladas ou cápsulas vazias (controle). B) Monitoramento da massa corpórea. D) Teste oral de tolerância à glicose (OGTT), 7 dias após o transplante. E) Área sob as curvas de OGTT. * experimento em andamento; ** um dos animais controle foi sacrificado antes do teste (*** $p < 0,001$, em relação aos animais diabéticos).

4.2. Estudo funcional do gene *Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)*

4.2.1. Escolha do gene *Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)*

Durante o trabalho de Doutorado do Dr. Fernando Lojudice (84), foi analisada a expressão diferencial de genes em células-tronco embrionárias murinas que foram submetidas à diferenciação em células produtoras de insulina, segundo o protocolo publicado por Lumelsky *et al* (26). Mais de 1000 genes foram identificados como sendo regulados positivamente em *IPCs* quando comparadas a *mESCs* indiferenciadas.

Para escolher o gene a ser estudado, pesquisou-se referências dos 20 genes mais expressos utilizando-se de dados depositados em Bancos de Dados do *NCBI* (até junho/2010), como *OMIM* e *Unigene*, além de publicações que pudessem dar indícios de que os genes pudessem estar relacionados à organogênese pancreática (Tabela 1).

Após pesquisa referente aos 20 genes mais expressos, três genes foram selecionados para serem confirmados por *qRT-PCR*: *Pcp4* (*Purkinje Cell Protein 4*), *Nnat* (*neuronatin*) e *Igfbp5* (*insulin-like growth factor binding protein 5*). A expressão diferencial destes três genes pelas células induzidas à diferenciação β -pancreática foi confirmada (Figura 20A).

Tabela 1: Lista dos 20 genes mais expressos estudados e informações coletadas em bancos de dados até junho/2010.

Descrição	Informações relevantes
<i>decorin (Dcn)</i>	Já analisado por Lojudice (91).
<i>Purkinje cell protein 4 (Pcp4)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Cromossomo 21: relacionado com características de síndrome de Down. <u>Pubmed</u> : Em modelo de heterozigoto para <i>Pax6</i> , é regulado negativamente.
<i>OSF-1</i>	<u>Unigene</u> : Não expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Induz formação de osteoclasto e absorção óssea. <u>Pubmed</u> : Nenhuma informação relacionada ao pâncreas.
<i>procollagen, type III, alpha 1 (Col3a1)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Colágeno fetal e de vasos sanguíneos <u>Pubmed</u> : Nenhuma informação relacionada ao pâncreas.
<i>secretogranin III (Scg3)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Localizada nas células pancreáticas endócrinas. Envolvido na secreção. <u>Pubmed</u> : Várias publicações sobre grânulos de secreção.
<i>sialyltransferase 8 B (Siat8b)</i>	<u>Unigene</u> : Não expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Glicosiltransferase <u>Pubmed</u> : Nenhuma informação relacionada ao pâncreas.
<i>insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) mRNA</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Superexpressão aumenta mortalidade neonatal, reduz fertilidade, inibe crescimento e desenvolvimento. <u>Pubmed</u> : <i>Knock-out</i> (3, 4 e 5): Maior número de células beta, com maior secreção de insulina.
<i>complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide (C1qb)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Deficiência relacionada à glomerulonefrite. <u>Pubmed</u> : Pancreatite aguda associada com níveis alterados de inibidor de C1.
<i>fatty acid binding protein 7 (Fabp7)</i>	<u>Unigene</u> : Não expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Relacionado ao metabolismo de ácidos graxos. <u>Pubmed</u> : Nenhuma informação relacionada ao pâncreas.
<i>complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide (C1qa)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Ligação com fibronectina. <u>Pubmed</u> : Pancreatite aguda associada com níveis alterados de inibidor de C1.
<i>SPARC-like 1 (Sparcl1)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Localizado em citoplasma de células endoteliais. Proteína secretada. <u>Pubmed</u> : Adenocarcinoma ductal e other neoplasias pancreáticas possuem aumento de SPARCL1.
<i>UI-M-FW0-cbz-l-11-0-Ulr1 NIH_BMAP_FW0 cDNA clone IMAGE: 6816636 5'</i>	<u>EST</u> : Descrito em cérebro.
<i>double cortin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase-like 1 (Dcamk1)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Microtúbulo que se auto fosforila. Expresso em cérebro. <u>Pubmed</u> : Nenhuma informação relacionada ao pâncreas.
<i>astrotactin 1 (Astr1)</i>	<u>Unigene</u> : Não expresso em pâncreas <u>OMIM</u> : Molécula de adesão neuronal, envolvido em migração de glias. <u>Pubmed</u> : Nenhuma informação relacionada ao pâncreas.
<i>gastrokine 2 (Gkn2)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas <u>OMIM</u> : Peptídeo secretado por células da mucosa gástrica. <u>Pubmed</u> : Nenhuma informação relacionada ao pâncreas.
<i>gastrokine 1 (Gkn1)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas <u>OMIM</u> : Peptídeo secretado por células da mucosa gástrica. <u>Pubmed</u> : Nenhuma informação relacionada ao pâncreas.
<i>neuronatin (Nnat)</i>	<u>Unigene</u> : Expresso em pâncreas. <u>OMIM</u> : Envolvido em desenvolvimento do cérebro. <u>Pubmed</u> : Expresso em células beta. Aumento na expressão aumenta secreção de insulina. Relacionado à modulação de canal de transporte de íons. <i>Knock-down</i> : capacidade reduzida de resposta à glicose.
<i>UI-M-BZ1-bec-h-03-0-Uls1 NIH_BMAP_MHI2_S1 cDNA clone UI-M-BZ1-bec-h-03-0-UI 3'</i>	<u>EST</u> : Encontrado no hipocampo.
<i>Tetranectin (Tna)</i>	<u>Unigene</u> : Sem informações. <u>OMIM</u> : Envolvido na fase de mineralização da osteogênese. Localizado no plasma. <u>Pubmed</u> : Localizada em ilhotas, pode estar relacionada com sobrevivência das ilhotas e via secretória.
<i>DSD-1-proteoglycan</i>	<u>Unigene</u> : Sem informações. <u>OMIM</u> : Sem informações. <u>Pubmed</u> : Desenvolvimento e regeneração de tecidos neurais

Foi selecionado o gene *Pcp4* por apresentar baixa expressão nas células indiferenciadas e alta expressão na linhagem MIN-6, com níveis de expressão 220 vezes maior do que o controle nos *microarrays* e 3.700 vezes mais, segundo os dados de qRT-PCR (Figura 20A). Além disso, sua expressão aumenta exponencialmente durante as etapas de diferenciação do protocolo de Lumelsky *et al* (26) e do protocolo descrito neste trabalho (Figura 20B).

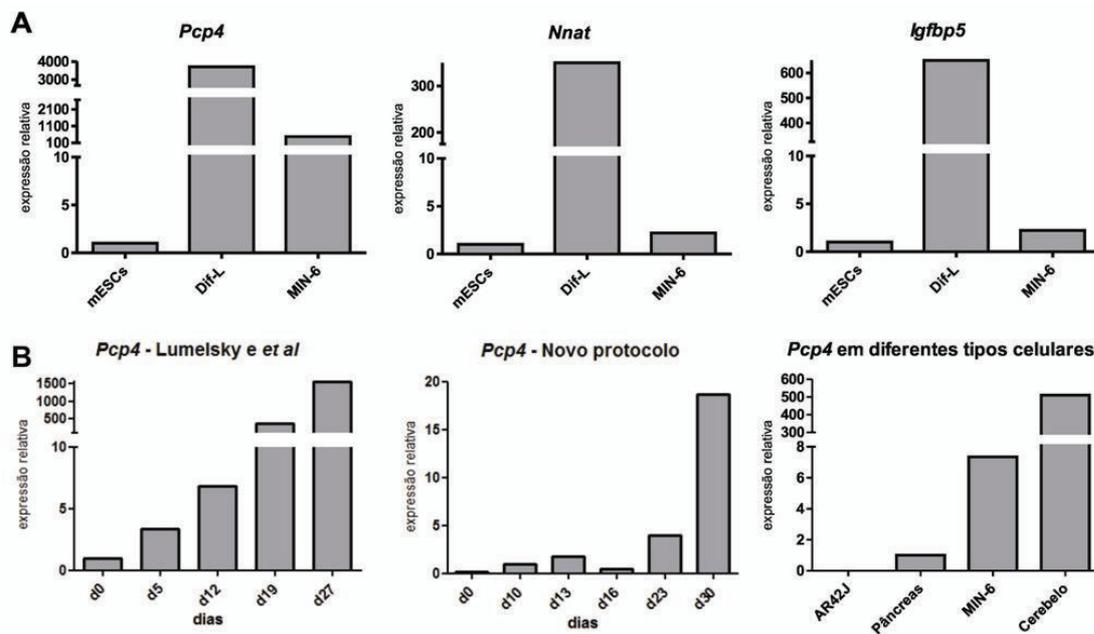


Figura 20: A) Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Nnat* e *Igfbp5*, avaliado por qRT-PCR (controle endógeno: *Hprt*, $n=1$). mESCs: células tronco embrionárias murinas indiferenciadas; Dif-L: *mESCs* diferenciadas segundo o protocolo de Lumelsky e cols. **B)** Expressão de *Pcp4* durante a diferenciação de *mESCs* pelo protocolo de Lumelsky e cols, pelo novo protocolo descrito neste trabalho e em diferentes células e tecidos, avaliado por qRT-PCR (controle endógeno: *Hprt*, $n=1$). AR42J: linhagem de células acinares murinas imortalizada; Pâncreas: tecido pancreático total murino; Cerebelo: tecido de cerebelo murino.

A expressão deste gene foi analisada, também, no tecido pancreático obtendo-se uma expressão de cerca de 600 vezes menor, ao nível de RNA, quando comparada à expressão apresentada pelo cerebelo, tecido no qual o gene foi

primeiramente descrito. Foi possível notar, também, a ausência de expressão deste gene por células AR42J, que são células acinares tumorigênicas murinas (Figura 20B).

4.2.2. Estudo do funcional do gene *Pcp4* em células β -pancreáticas murinas

Para inferir a função do gene *Pcp4* em células β -pancreáticas, células MIN-6 foram geneticamente modificadas, a fim de superexpressar ou inibir a expressão deste gene. Em nenhum dos casos houve modificação na morfologia das células geneticamente modificadas (Figura 21).

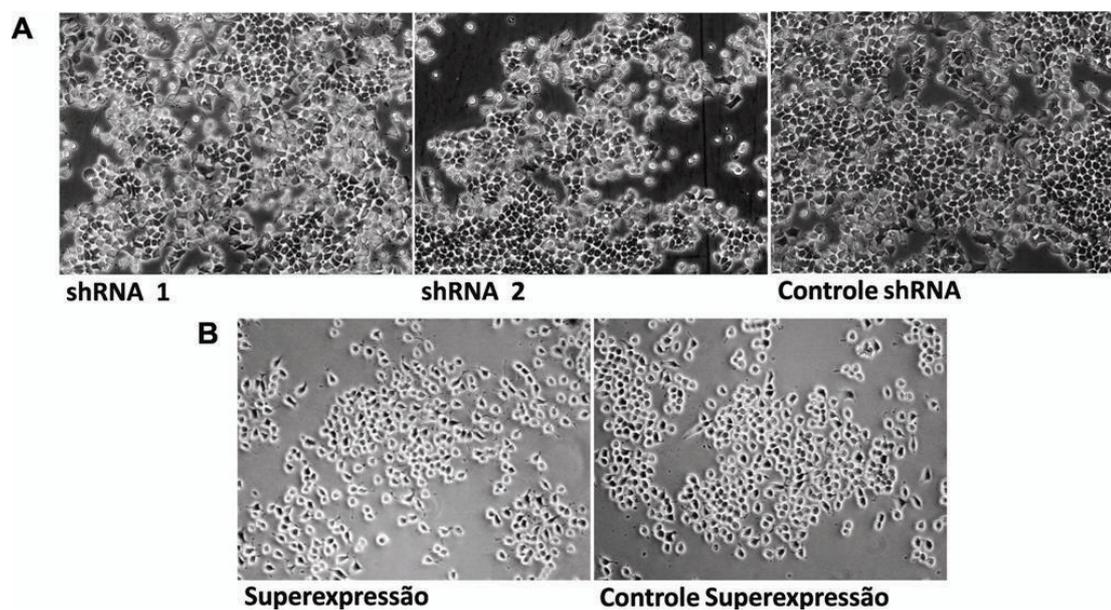


Figura 21: Morfologia das células MIN-6 modificadas para o estudo funcional do gene *Pcp4*, por microscopia de fase (aumento 40X). Nenhuma mudança morfológica foi observada. **A)** Células inibindo a expressão de *Pcp4* (Controle: vetor pLKO.1). **B)** Células superexpressando o gene *Pcp4* (Controle: vetor pCMVTO/SV40p/neo).

Ao superexpressar o gene *Pcp4* em células MIN-6, pode-se notar que há uma tendência à diminuição da expressão dos genes *Pdx1* e *Glut2*. Porém, quando a expressão do gene foi inibida, não houve alteração significativa nos genes analisados (Figuras 22 e 23).

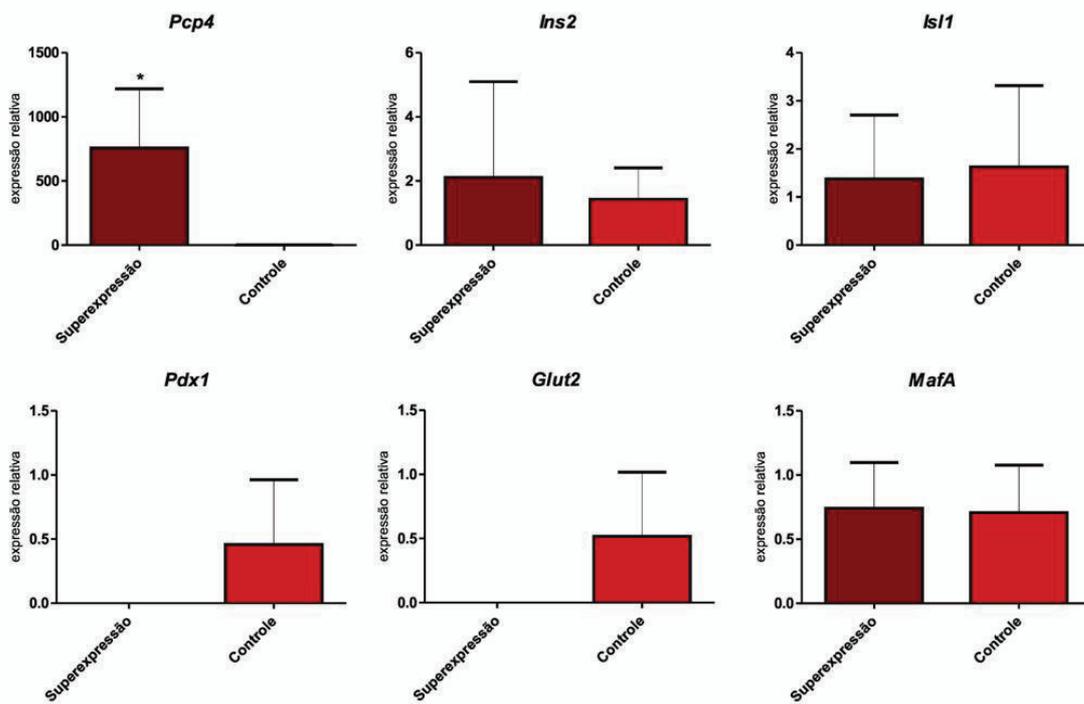


Figura 22: Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Glut2* e *MafA* em células MIN-6 modificadas, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; *p<0,05). Superexpressão: vetor pLV-CMVTO/*Pcp4*; Controle: vetor pCMVTO/SV40p/neo (vazio).

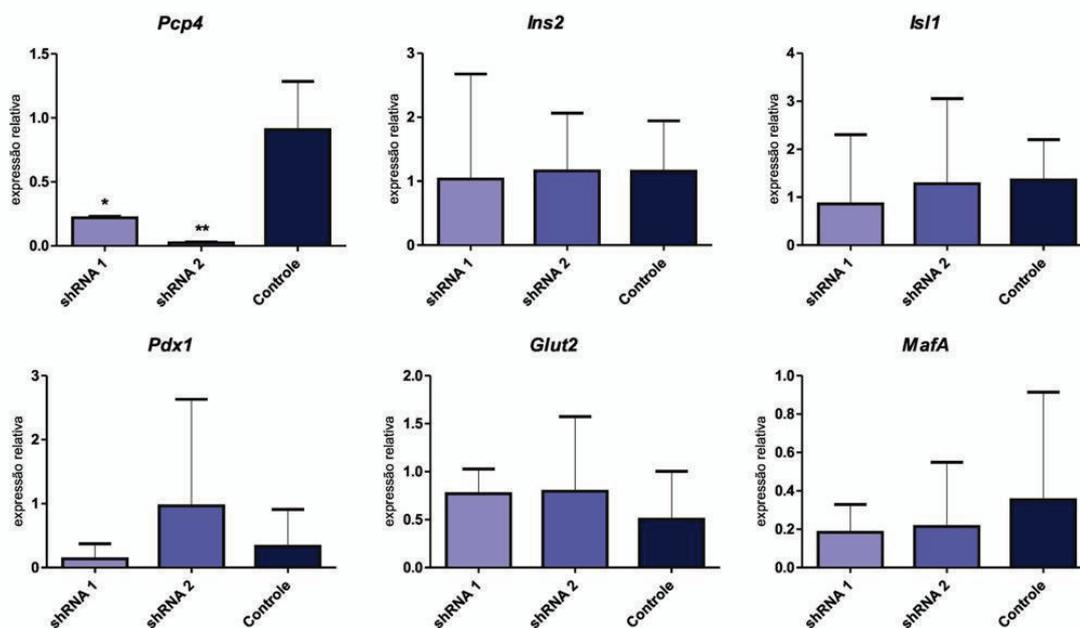


Figura 23: Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Glut2* e *MafA* em células MIN-6 modificadas geneticamente, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; *p<0,05, **p<0,01). Controle: vetor pLKO.1 (vazio).

A inibição da expressão do gene *Pcp4* em células MIN-6 não interferiu de forma expressiva na expressão dos genes analisados, entretanto, modificou o perfil da curva de crescimento desta célula, aumentando o seu tempo de dobramento de forma significativa (Figura 24A e B). Além disso, quando submetidas ao tratamento com citocinas, houve diminuição da viabilidade celular nas linhagens de células em que a expressão do gene *Pcp4* estava diminuída (Figura 24C).

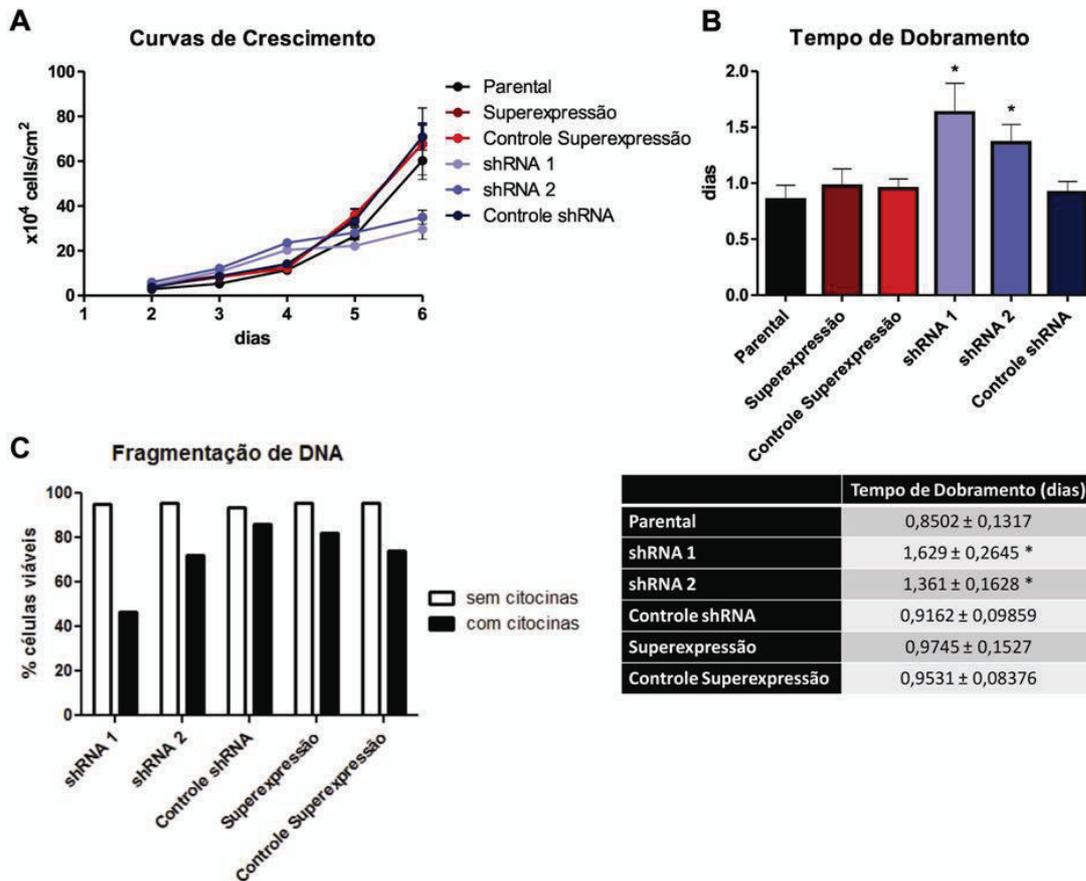


Figura 24: **A)** Curvas de crescimento de células MIN-6 modificadas geneticamente (n=3). **B)** Tempo de dobramento das células MIN-6 geneticamente modificadas. **C)** Ensaio de fragmentação de DNA em células MIN-6 modificadas submetidas à ação de citocinas (n=1). * $p < 0,05$, em relação ao respectivo controle.

4.2.3. Estudo funcional do gene *Pcp4* em células-tronco embrionárias murinas (*mESCs*)

Assim como nas células MIN-6 de insulinooma murino, as modificações genéticas realizadas não foram capazes de causar mudança morfológica nas *mESCs* à curto prazo (Figura 25). Após a seleção através de tratamento com antibióticos, as células geneticamente modificadas para o estudo do efeito da inibição do gene *Pcp4* foram mantidas sobre *iMEF*, sem alteração de sua morfologia.

Já as células que superexpressavam o gene, foram mantidas apenas por uma semana para seleção e então submetidas à diferenciação evitando o aparecimento de mudanças morfológicas significativas.

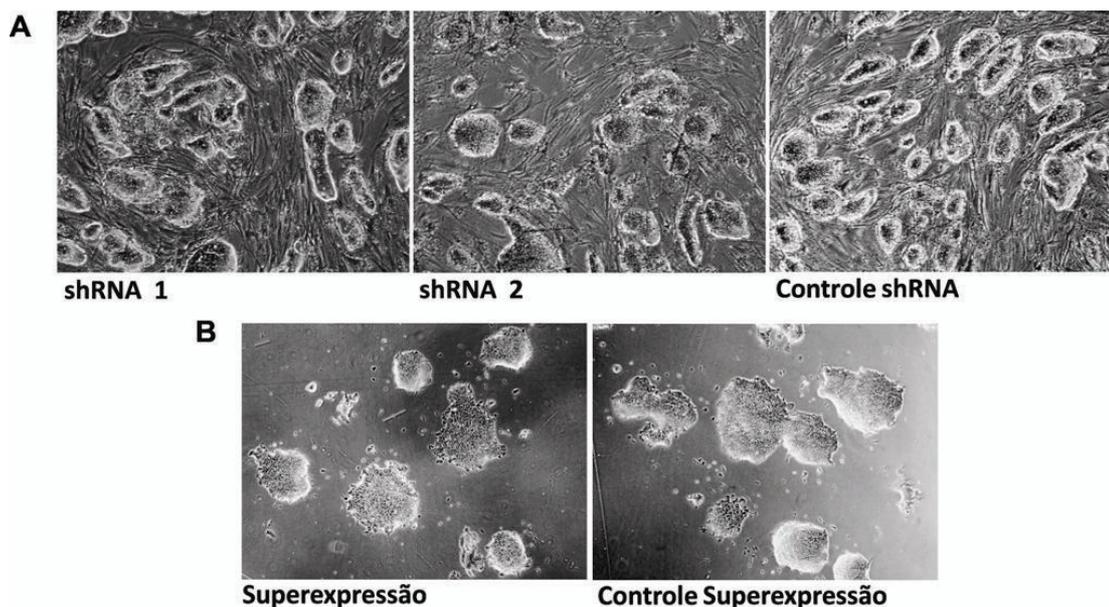


Figura 25: Morfologia das *mESCs* modificadas para o estudo funcional do gene *Pcp4* após seleção com respectivo antibiótico, por microscopia de fase (aumento 40X). Nenhuma mudança morfológica foi observada. **A)** Células inibindo a expressão de *Pcp4* sobre *iMEF* (Controle: vetor pLKO.1). **B)** Células superexpressando o gene *Pcp4* na ausência de *iMEF* (Controle: vetor pCMVTO/SV40p/*neo*).

Porém, quando as células diferenciadas foram analisadas, notou-se um discreto aumento na formação de agrupamentos celulares, também chamados *islet-like clusters* em células que superexpressam *Pcp4* (Figura 26). Além disso, houve uma discreta diminuição na formação destes agregados em células que tiveram o nível de expressão do gene *Pcp4* diminuído (Figura 27).

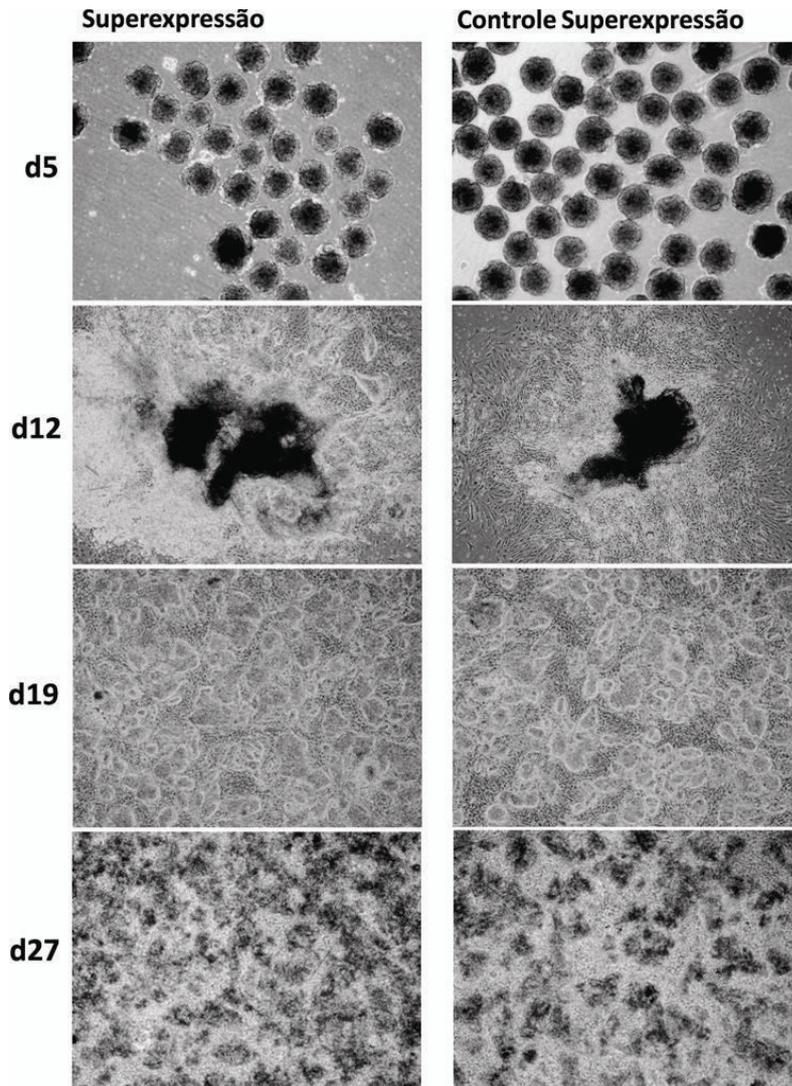


Figura 26: Morfologia das *mESCs* geneticamente modificadas para superexpressarem o gene *Pcp4* submetidas à diferenciação em *IPCs*, por microscopia de fase (aumento: 40X). É possível notar um discreto aumento na formação de agrupamentos celulares em células que superexpressam *Pcp4*.

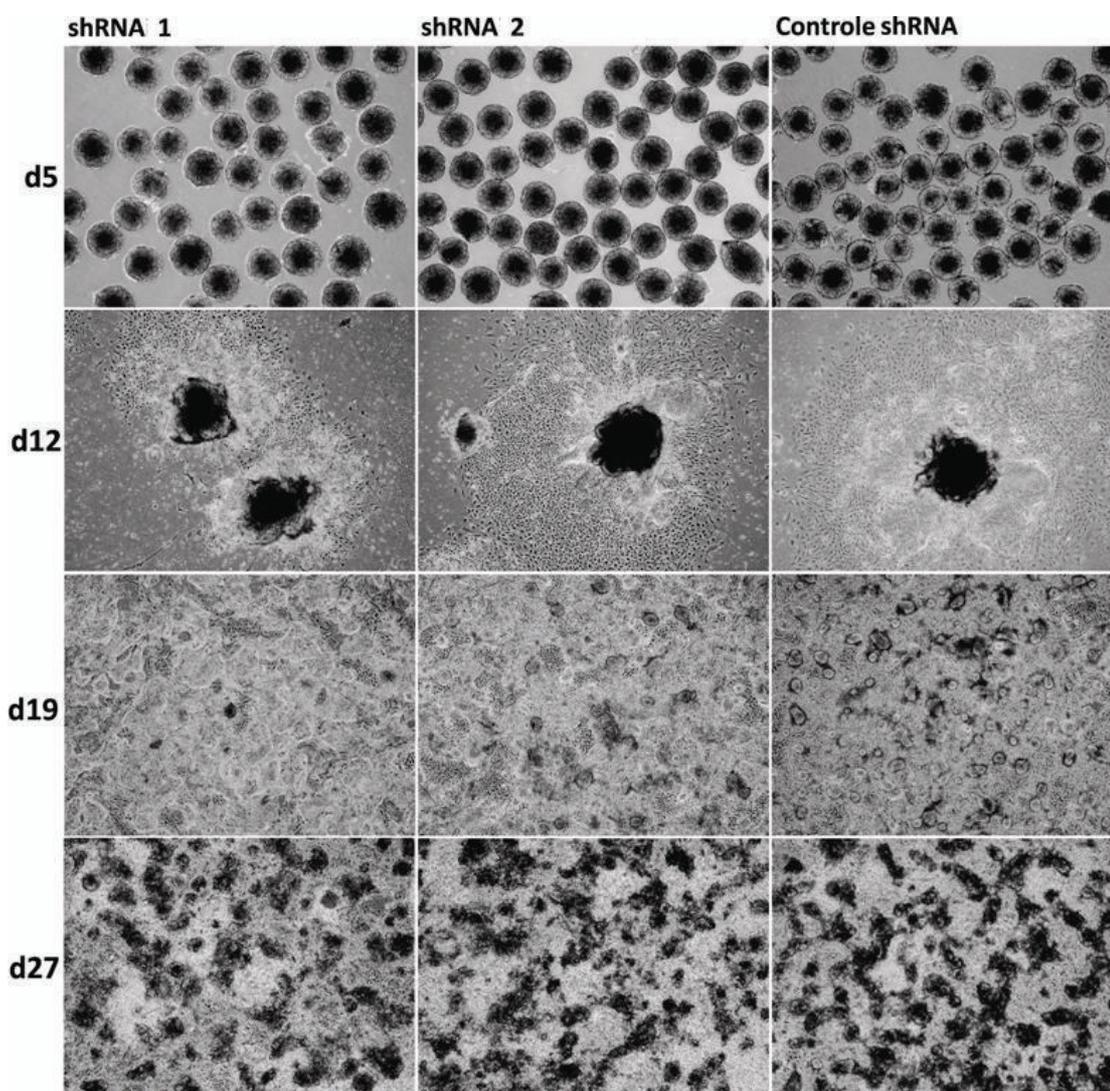


Figura 27: Morfologia das *mESCs* geneticamente modificadas para inibir a expressão do gene *Pcp4* submetidas à diferenciação em *IPCs*, por microscopia de fase (aumento: 40X). Verificou-se uma discreta diminuição na formação de agrupamentos celulares em células nas quais a expressão de *Pcp4* foi inibida.

A superexpressão do gene *Pcp4* tende a aumentar a expressão dos genes *Ins1*, *Ins2* e *MafA* e diminuir a expressão de *Glut2* durante a diferenciação (Figura 28). Já com a inibição do gene, há uma diminuição significativa da expressão de *Is11* e uma tendência a aumentar a expressão de *Ins1* e *Ins2* (Figura 29).

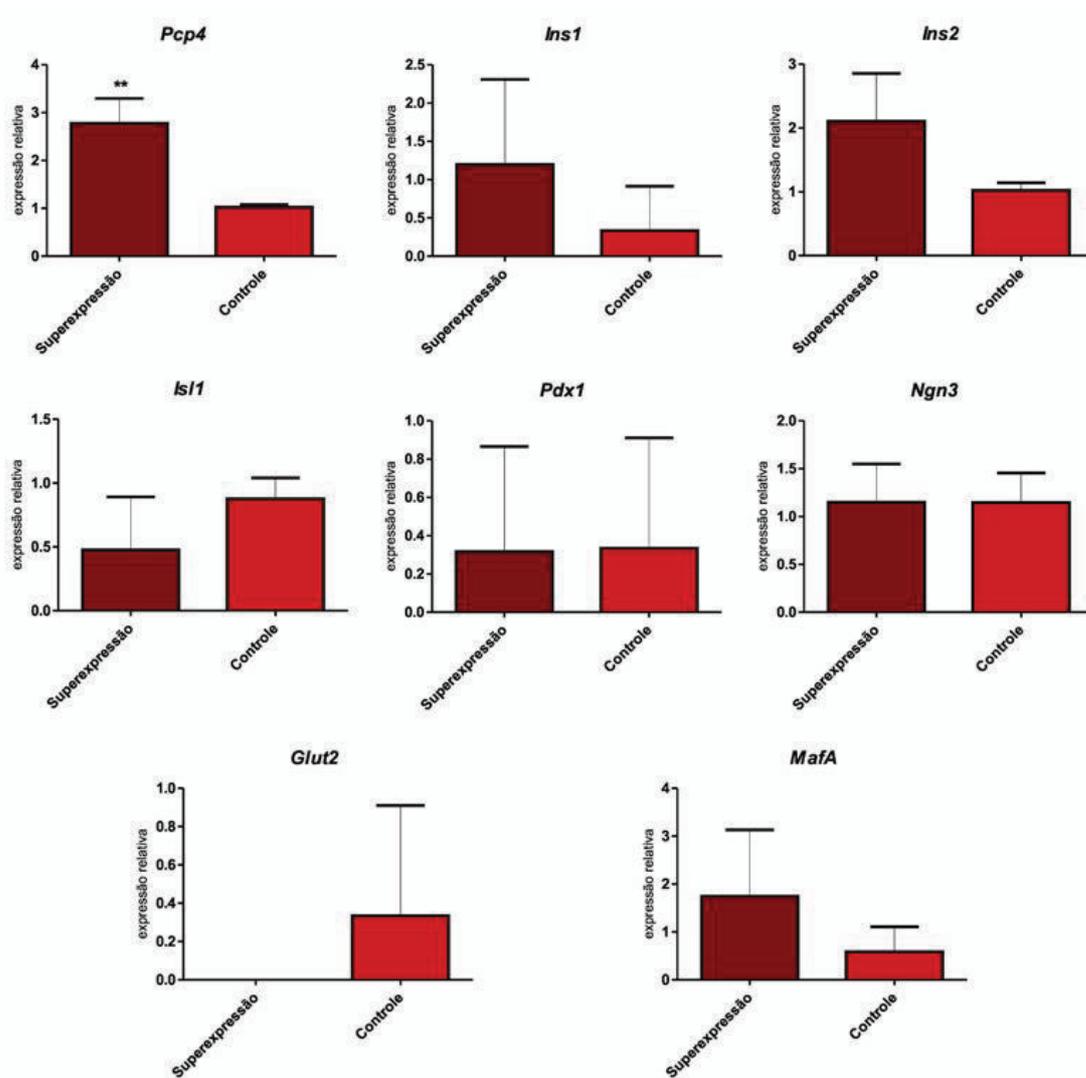


Figura 28: Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Ins1*, *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Glut2* e *MafA* em células *mESCs* superexpressando *Pcp4* e submetidas à diferenciação segundo protocolos descrito por Lumelsky e cols, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; **p<0,01). Superexpressão: vetor pLV-CMVTO/PCP4; Controle: vetor pCMVTO/SV40p/*neo* (vazio).

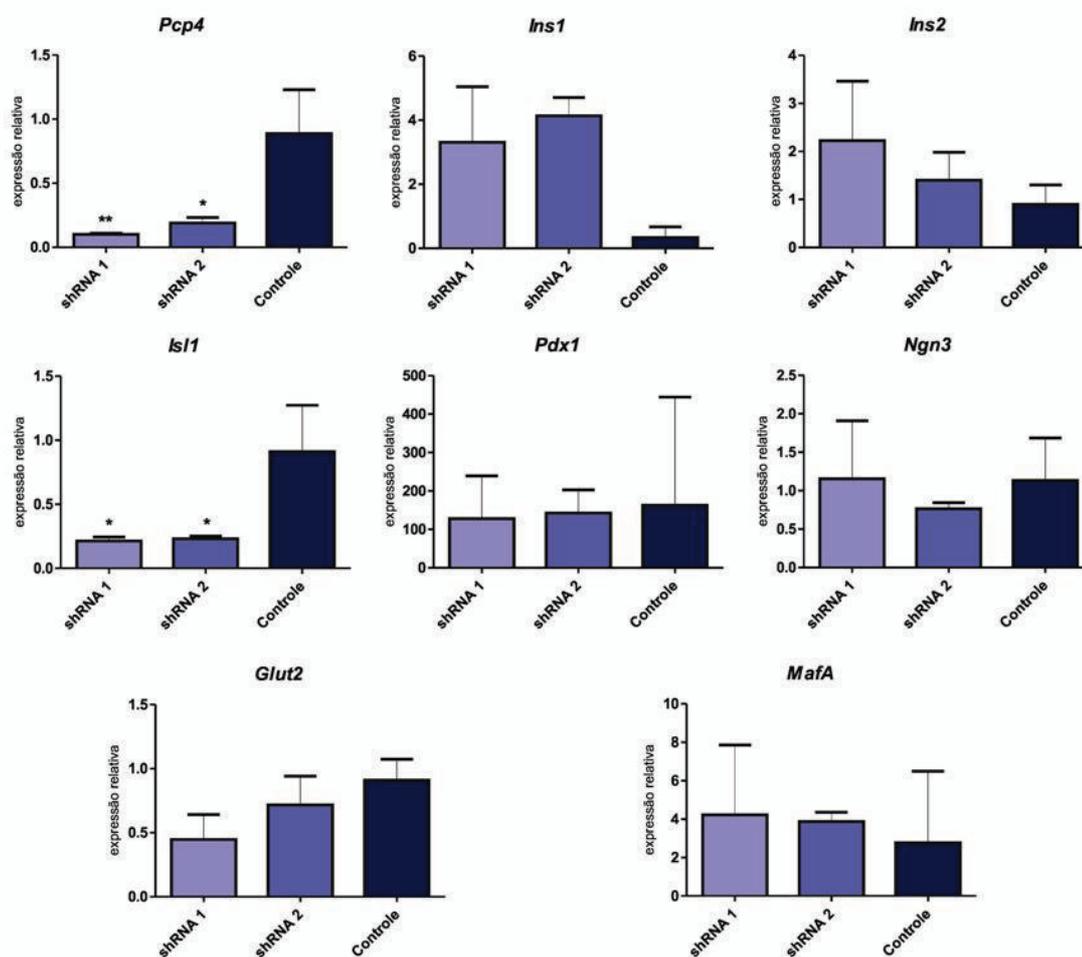


Figura 29: Análise do nível de expressão dos genes *Pcp4*, *Ins1*, *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA* em células *mESCs* com expressão de *Pcp4* inibida e submetidas à diferenciação segundo protocolos descrito por Lumelsky e cols, avaliado por *qRT-PCR* (controle endógeno: *Hprt*; n=3; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Controle: vetor pLKO.1 (vazio).

5. DISCUSSÃO

5.1. Diferenciação de células tronco embrionárias murinas (*mESCs*) em células produtoras de insulina (*IPCs*)

As *ESCs* são células com potencial de diferenciação em qualquer tipo celular presente em um organismo, havendo, portanto, menor dificuldade em diferenciá-las *in vitro*, quando comparadas a células adultas, que apresentam potencial restrito de diferenciação. Em vista disso, primeiramente optou-se por desenvolver um protocolo de diferenciação de células-tronco embrionárias murinas em *IPCs*. Existem muitas variações de protocolos de diferenciação descritos na literatura, sendo que, inicialmente, muitos se baseavam na seleção de células nestina-positivas, devido à publicação do protocolo descrito por Lumelsky *et al* (26). Porém surgiram muitas críticas devido à dúvida se o conteúdo de insulina detectado nas células diferenciadas era realmente produzido *de novo* pelas células ou captadas do meio de cultura, o qual possui a insulina em sua composição. Assim como outros pesquisadores, optamos por desenvolver nosso protocolo com base nas etapas da organogênese pancreática, na tentativa de mimetizar o que ocorre *in vivo* durante a organogênese pancreática, além de evitar o uso de insulina na última etapa de diferenciação. Ao contrário da maioria dos protocolos descritos na literatura, a técnica de formação de corpos embrióides foi utilizada como primeira etapa de diferenciação, pois acredita-se que a conformação espacial em que as células se encontram e o contato célula-célula seja muito importante na diferenciação da célula β -pancreática, visto que a ilhota é uma estrutura tridimensional.

Durante a aplicação do protocolo de diferenciação, notou-se uma intensa modificação da morfologia destas células, demonstrando uma diferenciação inicial

para possíveis precursoras, evidenciado pela expressão dos transcritos dos genes *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA*, e marcação positiva para proteína *PDX1* e *CXCR4* a partir do dia 10 de indução (90).

A expressão de *Pdx1*, *Isl1* e *Ngn3* mostra o comprometimento das células na linhagem pancreática, visto que estes fatores de transcrição são expressos durante a embriogênese por precursoras epiteliais (10). Assim como na embriogênese pancreática, a expressão de *Pdx1* pelas células em diferenciação apresentou um perfil de expressão bimodal (com dois picos), referentes, respectivamente, ao momento da determinação da célula em precursora pancreática e, posteriormente, em célula β . Já a expressão de *Ins2* confirma a capacidade destas células de produzirem insulina 2, a qual, em roedores, corresponde à insulina presente em humanos, sendo responsável pela regulação da glicemia em resposta à glicose. A expressão de *Glut2* e *MafA* mostra a maturidade destas células, visto que o *GLUT2* é o transportador de glicose presente exclusivamente em células β maduras e *MAFA* tem uma grande importância nas etapas de maturação final da célula β e regulação da expressão e secreção da insulina (92). A diminuição da expressão, ao nível de RNA, de *Glut2* pode ser explicada pelo fato de ser um transportador, não havendo a necessidade de expressão constante do RNA uma vez que a proteína já está presente, o que é evidenciado pela marcação positiva de *GLUT2* nas etapas finais da diferenciação.

Apesar de ser observada de maneira consistente a mudança morfológica e coloração por ditizona das células todas as vezes em que o protocolo foi reproduzido, e, também, a expressão dos genes envolvidos na diferenciação β -pancreática, vale ressaltar que os níveis de expressão dos genes analisados, ao nível de RNA, apresentou variação significativa. É possível que a etapa inicial de

formação de corpos embrióides seja crucial para a determinação do potencial final destas células em se diferenciarem em células produtoras de insulina. Sabe-se que dependendo do tamanho do corpo embrióide, há uma maior chance de se obter precursoras de tipos celulares diferentes, mostrando que esta etapa é crucial para o decorrer do experimento (93).

É importante destacar que a presença de altos níveis de expressão de *Ngn3*, tanto ao nível de *RNA* como de proteína ao final do protocolo, indica a presença de células precursoras endócrinas, já que este marcador não está presente em células β maduras. A detecção deste marcador pode demonstrar a imaturidade destas células, indicando a presença de células poli-hormonais, que podem inclusive, expressar insulina, porém juntamente com glucagon e/ou somatostatina. Já se sabe que a presença destas células imaturas poli-hormonais não-responsivas ao estímulo por glicose é o maior problema da grande maioria dos protocolos descritos na literatura (94). Por este motivo, muitos grupos de pesquisa tem empregado a maturação *in vivo* após a diferenciação *in vitro*. Esta estratégia é baseada no fato de que a maturação final das células endócrinas ocorre apenas após o nascimento. Apesar dos fatores específicos que podem influenciar nesta maturação final ainda serem desconhecidos, é possível que o nicho *in vivo* e eventos metabólicos possam ter uma grande importância na maturação da célula β -pancreática (25).

Para verificar o comportamento das *IPCs in vivo*, estas células foram transplantadas em camundongos diabetizados com estreptozotocina. Inicialmente, estas células foram microencapsuladas utilizando um biomaterial chamado Biodritina[®], que já havia sido anteriormente testado no transplante de ilhotas pancreáticas por nosso grupo (86). Este biomaterial foi desenvolvido com o objetivo de proteger as células do sistema imunológico enquanto permite a entrada de

nutrientes e oxigênio, e saída de metabólitos produzidos pelas células, como a insulina (95). Assim como já tem sido descrito na literatura, foi induzida a diferenciação final das células *in vivo* em camundongos diabéticos, porém submetidos ao tratamento com insulina para que o ambiente hiperglicêmico não prejudicasse as células transplantadas. Dessa forma, durante as primeiras semanas, observou-se a manutenção da glicemia devido ao implante de insulina, com posterior retorno à hiperglicemia em todos os animais tratados. Apesar dos animais terem retornado ao estado diabético, os animais tratados com *IPCs* foram capazes de manter a normoglicemia por uma semana adicional, demonstrando melhor controle glicêmico e tolerância à glicose, além de um ganho de massa corpórea, em ausência de apatia. O não-estabelecimento da normoglicemia provavelmente ocorreu devido à alta taxa de proliferação apresentada pelas células transplantadas, que, inclusive, tiveram a capacidade de ultrapassar o biomaterial. Dados da literatura demonstram que ocorre um balanço entre proliferação e diferenciação em células-tronco, sendo que altas taxas de proliferação podem indicar baixas taxas de diferenciação. Embora as *IPCs* não tenham sido capazes de reverter o diabetes, após a retirada das células, observamos que houve um grande aumento na expressão de *Pdx1*, *Ngn3*, *Glut2* e *MafA*, mostrando que o ambiente *in vivo* influenciou positivamente na maturação destas células apesar de ainda haver a presença de progenitoras, evidenciado pela alta expressão de *Ngn3*.

Embora as microcápsulas de Biodritina[®] tivessem sido testadas com ilhotas, e terem sido descritas como mecanicamente estáveis tanto *in vitro* quanto *in vivo* (86), as *IPCs* foram capazes de ultrapassar o biomaterial e continuar a crescer na periferia das cápsulas e formar estruturas semelhantes a ilhotas. Este fenômeno ocorreu, pois quando diferencia-se células-tronco embrionárias em qualquer tipo de

célula, sempre há a possibilidade de restarem algumas células parcialmente diferenciadas ou indiferenciadas, que ainda possuem um alto poder proliferativo, sendo capazes, inclusive, de induzir formação de teratomas (96, 97). Por esta razão, no protocolo reproduzido posteriormente, adicionamos mitomicina ao final do protocolo para induzir a diminuição da proliferação celular, podendo inclusive contribuir para a maturação das células. Além disso, ao invés de Biodritina[®] utilizamos o *Bioprotect*[®] para microencapsular as células, já que este biomaterial possui laminina que é uma proteína de matriz extracelular presente em ilhotas, podendo mimetizar a ambiente pancreático e contribuir para maturação celular e aumento de expressão da insulina (13).

Após o período de maturação *in vivo* (d90), foi possível observar que as células se mantiveram no interior das cápsulas e que a expressão dos genes característicos de células β , expressos nas células diferenciadas, sofreu um aumento de milhares de vezes, mostrando a influência positiva do ambiente *in vivo* do camundongo normoglicêmico. Isso foi comprovado quando transplantamos estas células em camundongos diabetizados, nos quais a normoglicemia foi restabelecida, sendo capazes de responder ao teste de tolerância à glicose (*OGTT*) de forma muito semelhante àquela de animais não-diabéticos.

5.2. Estudo funcional do gene *Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)*

A pesquisa de funções e referências dos genes pré-analisados por Lojudice *et al* (91) revelou que a maior parte dos genes está relacionada com desenvolvimento dos sistemas nervoso e cardíaco. Este resultado pode ser devido ao tipo de protocolo de diferenciação utilizado, em que cardiomiócitos e células neuronais estão presentes após a primeira etapa de diferenciação. A presença destes tipos

celulares tem uma influência positiva, pois contribuem com um efeito parácrino, secretando fatores importantes que auxiliam na diferenciação de células precursoras pancreáticas em células produtoras de insulina. Por outro lado, há uma contaminação da cultura celular final, que estaria diferenciada apenas em células pancreáticas, com outros tipos celulares diferentes. Por isso, resolvemos estabelecer alguns critérios para escolha do gene, para assegurar que os genes escolhidos fossem expressos em células β -pancreáticas e não em outros tipos celulares. É possível que existam genes que não são expressos por células β , mas, sim, por suas células vizinhas, podendo influenciar, também, sua diferenciação, já que células da notocorda e da mesoderme cardíaca exercem grande influência no estabelecimento da linhagem pancreática. Por isso, em estudos posteriores, seria aconselhável que os outros genes fossem analisados mais a fundo, porém com a utilização do meio condicionado de células que expressam o gene escolhido, ao invés de diferenciar as células modificadas para super-expressá-lo (estratégia adotada neste trabalho). Os genes *CXCL12*, *CXCR4*, *Pbx1*, *Noggin*, *Nrp1*, *Aldh1a2* e *Kitl* foram recentemente descritos como envolvidos na organogênese pancreática, mostrando a importância deste estudo como uma triagem inicial (98-103).

Apesar de escolhermos apenas o gene *Pcp4* para ser estudado, é importante ressaltar que há muitos candidatos interessantes dentre os 20 genes mais expressos, os quais poderão ser utilizados para estudos posteriores. Dentre estes, o gene *DCAMKL-1* foi descrito como possível marcador de células precursoras pancreáticas e o gene *Nnat* como sendo importante na fisiologia da célula β -pancreática (58, 104).

O gene escolhido, *Pcp4*, está relacionado com a diferenciação neuronal, sendo regulado negativamente em modelo murino heterozigoto para *Pax6* (105). De

acordo com os dados do *Unigene* (NCBI), este gene também é expresso no pâncreas adulto, o que confirmamos em células MIN-6.

Inicialmente, superexpressamos e inibimos a expressão do gene em células MIN-6 para avaliar possíveis funções do gene na célula β -pancreática. Ao contrário do esperado, a superexpressão deste gene parece interferir de forma negativa nas funções da célula β , já que diminui a expressão de genes importantes na produção e secreção de insulina. A inibição do gene interfere de forma muito oscilante em cada passagem das células, demonstrando a ausência de uma interferência direta nos genes analisados. Porém, quando analisamos a curva de crescimento desta linhagem, que possui baixa expressão do gene *Pcp4*, esta apresentou crescimento desacelerado, com aumento do tempo de dobramento. É possível que haja relação com o efeito maior nos níveis de apoptose, visto que há uma tendência à diminuição da viabilidade celular, demonstrado pelo aparecimento de núcleos sub-diplóides em linhagens submetidas à inibição do gene.

Ao contrário do que foi analisado anteriormente em células MIN-6, a superexpressão do gene *Pcp4* em células embrionárias indiferenciadas e submetidas à diferenciação β -pancreática parece interferir de forma positiva, já que aumenta a densidade de agrupamentos celulares e a expressão de *Ins2* e *MafA*, genes importantes para função e maturação da célula beta. Já na inibição da inibição deste gene por *shRNA*, houve diminuição na formação dos agregados celulares, com uma diminuição drástica na expressão de *Isl1*, gene importante para a formação das células progenitoras endócrinas.

A proteína *PCP4* foi primeiramente descrita como *PEP-19* em cerebelo de ratos (106), sendo, posteriormente, confirmada sua presença em células de Purkinje (107). Em células neuronais, participa da transdução de sinal mediada por cálcio e

possui estrutura desordenada podendo ligar-se à apo- e Ca^{2+} -calmodulina (108). Devido ao seu papel relacionado à regulação da homeostase do cálcio, esta proteína poderia estar relacionada à proliferação da célula β -pancreática, visto que a concentração de cálcio citoplasmático influencia diretamente na proliferação celular (109). Da mesma forma, existe a possibilidade de estar relacionado com a função da célula β , pois é o aumento da concentração de cálcio que estimula a secreção e a produção da insulina (110). Apesar de haver pouca informação sobre este gene, sabe-se que sua superexpressão pode influenciar positivamente na diferenciação neuronal e osteoblástica (111-114), corroborando os dados obtidos na diferenciação de *mESCs* em *IPCs in vitro*. Além disso, a proteína *PCP4* foi descrita como sendo neuroprotetora podendo diminuir os índices de apoptose em células neuronais, o que confirma os resultados obtidos com a curva de crescimento e indução de apoptose em células de insulinoma murino (115).

6. CONCLUSÕES

Apesar dos avanços na área de diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina, ainda há muito a ser descoberto, já que a maioria dos trabalhos publicados não apresentou resultados satisfatórios até o momento. Geralmente, os autores obtêm células não-responsivas à glicose, sendo incapazes de secretar insulina *in vitro* e *in vivo* em níveis suficientes para permitir a reversão do diabetes em animais diabetizados.

No presente trabalho, desenvolvemos um novo protocolo que mostrou-se eficaz e reprodutivo, que se mostrou capaz de induzir a diferenciação de *mESCs* em células produtoras de insulina. Além disso, quando as *IPCs* foram submetidas à maturação *in vivo*, os níveis de expressão dos genes relacionados às células β aumentaram significativamente, e quando transplantadas em animais diabéticos, estas *IPCs* foram capazes de restabelecer a normoglicemia, assim como responder corretamente ao estímulo de glicose *in vivo*.

Na segunda parte do trabalho, foi possível descrever, pela primeira vez, o gene *Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)* como sendo expresso em células β -pancreáticas. Além disso, pudemos observar a importância desta proteína na viabilidade celular, uma vez que variação dos níveis de expressão desta proteína pode interferir na expressão de outros genes. Já na diferenciação β -pancreática, a superexpressão deste gene teve influência positiva, visto que houve uma tendência ao aumento da expressão de genes importantes na maturação da célula β .

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas da primeira parte do trabalho, primeiramente iremos dar continuidade ao experimento *in vivo* que está em andamento, para verificar o período em que os animais tratados serão capazes de manter a normoglicemia. Após a finalização do experimento, analisaremos as células quanto à expressão gênica, tanto ao nível de RNA (*qRT-PCR*) quanto de proteína (imunofluorescência). Conjuntamente, repetiremos o experimento com um número amostral maior para validação dos resultados obtidos. Além disso, estamos estabelecendo linhagens de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (*hiPSCs*) em nosso laboratório, e, assim que a caracterização destas linhagens estiver concluída, poderemos aplicar o mesmo protocolo nestas células, e verificar se as *hiPSCs* comportam-se da mesma forma que observamos em *mESCs*.

Para a segunda parte do trabalho, induziremos a superexpressão do gene *Pcp4* nas diferentes etapas da diferenciação utilizando o sistema *Tet-On*. Dessa forma poderemos verificar em qual etapa da diferenciação a expressão do gene pode contribuir de fato para a diferenciação β -pancreática. No presente trabalho, realizamos o estudo funcional do gene *Pcp4* apenas na diferenciação segundo o protocolo já descrito de Lumelsky e cols, porém seria interessante induzir a expressão deste gene juntamente com a indução da diferenciação de acordo com o protocolo desenvolvido na primeira parte do trabalho para verificar se há alguma contribuição para a maturação da célula produtora de insulina.

Quanto ao estudo do gene *Pcp4* em células β -pancreáticas, realizaremos novos ensaios de indução de apoptose nas células geneticamente modificadas para validar a participação deste gene neste processo. Para isso, realizaremos o ensaio

de fragmentação de DNA novamente, e conjuntamente a análise da externalização de fosfatidilserina, possibilitando analisar a presença de células necróticas, além da análise da expressão de genes pró e anti-apoptóticos (como *Bax* e *Bcl-xl*). Também verificaremos se a expressão do gene *Pcp4* pode interferir na secreção de insulina frente ao desafio por glicose. Por fim, devido aos resultados oscilantes de expressão de RNA dos genes analisados, analisaremos o nível de expressão proteica das proteínas respectivas em células MIN-6 geneticamente modificadas (Western Blotting e imunofluorescência).

Para de fato avaliar a participação do *Pcp4* na organogênese pancreática, seria interessante realizar a detecção do transcrito ou proteína durante a embriogênese, desde a formação do broto pancreático até o pâncreas adulto. Já, para verificar a importância da expressão desta proteína durante a embriogênese, podemos avaliar as modificações presentes em pâncreas de animais modificados geneticamente que não expressam o gene *Pcp4*, especificamente no tecido pancreático ou em ilhotas pancreáticas, além de verificar a glicemia dos animais realizando testes de tolerância à glicose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schwitzgebel VM. Programming of the pancreas. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Dec 20;185(1-2):99-108.
2. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit.* 2006 Jul;12(7):RA130-47.
3. McCracken KW, Wells JM. Molecular pathways controlling pancreas induction. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Aug;23(6):656-62.
4. Wilson ME, Scheel D, German MS. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev.* 2003 Jan;120(1):65-80.
5. Kim SK, MacDonald RJ. Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Oct;12(5):540-7.
6. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development.* 2002 May;129(10):2447-57.
7. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet.* 2002 Sep;32(1):128-34.
8. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature.* 1999 Aug 26;400(6747):877-81.
9. Elghazi L, Cras-Meneur C, Czernichow P, Scharfmann R. Role for FGFR2IIIb-mediated signals in controlling pancreatic endocrine progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):3884-9.
10. Ackermann AM, Gannon M. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol.* 2007 Feb;38(1-2):193-206.
11. Rieck S, Bankaitis ED, Wright CV. Lineage determinants in early endocrine development. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Aug;23(6):673-84.
12. Lojudice FHK, P.M.; Sogayar, M.C. Pancreatic Stem Cells. In: Goldenberg RCSC, A.C.C., editor. *Resident Stem Cells and Regenerative Therapy.* MA, USA: Elsevier; 2012. p. 33-42.
13. Labriola L, Montor WR, Krogh K, Lojudice FH, Genzini T, Goldberg AC, et al. Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Jan 15;263(1-2):120-33.
14. Cerf ME. Transcription factors regulating beta-cell function. *Eur J Endocrinol.* 2006 Nov;155(5):671-9.
15. Labriola L, Ferreira GB, Montor WR, Demasi MA, Pimenta DC, Lojudice FH, et al. Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Jan 29;264(1-2):16-27.
16. Xu X, D'Hoker J, Stange G, Bonne S, De Leu N, Xiao X, et al. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell.* 2008 Jan 25;132(2):197-207.
17. Eliaschewitz FG, Aita CA, Genzini T, Noronha IL, Lojudice FH, Labriola L, et al. First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc.* 2004 May;36(4):1117-8.
18. Shapiro AM. State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression. *Curr Diab Rep.* 2011 Oct;11(5):345-54.
19. Lee YC, Nielsen JH. Regulation of beta cell replication. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Jan 15;297(1-2):18-27.
20. Mantovani Mda C, da Conceicao MM, Ferreira AJ, Labriola L, dos Santos PB, Tonso A, et al. Immobilization of primary cultures of insulin-releasing human pancreatic cells. *Islets.* 2009 Nov-Dec;1(3):224-31.
21. Ouziel-Yahalom L, Zalzman M, Anker-Kitai L, Knoller S, Bar Y, Glandt M, et al. Expansion and redifferentiation of adult human pancreatic islet cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 10;341(2):291-8.
22. Godfrey KJ, Mathew B, Bulman JC, Shah O, Clement S, Gallicano GI. Stem cell-based treatments for Type 1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells. *Diabet Med.* 2012 Jan;29(1):14-23.
23. Blyszczuk P, Wobus AM. Stem cells and pancreatic differentiation in vitro. *J Biotechnol.* 2004 Sep 30;113(1-3):3-13.

24. Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, et al. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res.* 2007 Apr;17(4):333-44.
25. Rezania A, Bruin JE, Riedel MJ, Mojibian M, Asadi A, Xu J, et al. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes.* 2012 Aug;61(8):2016-29.
26. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001 May 18;292(5520):1389-94.
27. Kania G, Blyszczuk P, Wobus AM. The generation of insulin-producing cells from embryonic stem cells--a discussion of controversial findings. *Int J Dev Biol.* 2004 Dec;48(10):1061-4.
28. Blyszczuk P, Asbrand C, Rozzo A, Kania G, St-Onge L, Rupnik M, et al. Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. *Int J Dev Biol.* 2004 Dec;48(10):1095-104.
29. Raikwar SP, Zavazava N. Insulin producing cells derived from embryonic stem cells: are we there yet? *J Cell Physiol.* 2009 Feb;218(2):256-63.
30. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):16105-10.
31. Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J. Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes.* 2003 May;52(5):1163-8.
32. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells.* 2004;22(3):265-74.
33. Baharvand H, Jafary H, Massumi M, Ashtiani SK. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. *Dev Growth Differ.* 2006 Jun;48(5):323-32.
34. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2006 Nov;24(11):1392-401.
35. Ku HT, Chai J, Kim YJ, White P, Purohit-Ghelani S, Kaestner KH, et al. Insulin-expressing colonies developed from murine embryonic stem cell-derived progenitors. *Diabetes.* 2007 Apr;56(4):921-9.
36. Schroeder IS, Rolletschek A, Blyszczuk P, Kania G, Wobus AM. Differentiation of mouse embryonic stem cells to insulin-producing cells. *Nat Protoc.* 2006;1(2):495-507.
37. Vaca P, Martin F, Vegara-Meseguer JM, Rovira JM, Berna G, Soria B. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells.* 2006 Feb;24(2):258-65.
38. Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G, et al. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2007 Aug;25(8):1940-53.
39. Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, Oh CH, McKay R, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia.* 2007 Jun;50(6):1228-38.
40. Cho YM, Lim JM, Yoo DH, Kim JH, Chung SS, Park SG, et al. Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic beta-cell differentiation in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Feb 1;366(1):129-34.
41. Eshpeter A, Jiang J, Au M, Rajotte RV, Lu K, Lebkowski JS, et al. In vivo characterization of transplanted human embryonic stem cell-derived pancreatic endocrine islet cells. *Cell Prolif.* 2008 Dec;41(6):843-58.
42. Jafary H, Larijani B, Farrokhi A, Pirouz M, Mollamohammadi S, Baharvand H. Differential effect of activin on mouse embryonic stem cell differentiation in insulin-secreting cells under nestin-positive selection and spontaneous differentiation protocols. *Cell Biol Int.* 2008 Feb;32(2):278-86.
43. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol.* 2008 Apr;26(4):443-52.
44. Vaca P, Berna G, Araujo R, Carneiro EM, Bedoya FJ, Soria B, et al. Nicotinamide induces differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells. *Exp Cell Res.* 2008 Mar 10;314(5):969-74.
45. Johannesson M, Stahlberg A, Ameri J, Sand FW, Norman K, Semb H. FGF4 and retinoic acid direct differentiation of hESCs into PDX1-expressing foregut endoderm in a time- and concentration-dependent manner. *PLoS One.* 2009;4(3):e4794.
46. Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res.* 2009 Apr;19(4):429-38.

47. Cai J, Yu C, Liu Y, Chen S, Guo Y, Yong J, et al. Generation of homogeneous PDX1(+) pancreatic progenitors from human ES cell-derived endoderm cells. *J Mol Cell Biol.* 2010 Feb;2(1):50-60.
48. Ren M, Yan L, Shang CZ, Cao J, Lu LH, Min J, et al. Effects of sodium butyrate on the differentiation of pancreatic and hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem.* 2010 Jan 1;109(1):236-44.
49. Lojudice FH, Kossugue, P.M., Fortuna, V.A., Sogayar, M.C. Unique Genes Identified During Insulin-Producing Cells Differentiation of Murine Embryonic Stem Cell Line. in prep.
50. Chen C, Chai J, Singh L, Kuo CY, Jin L, Feng T, et al. Characterization of an in vitro differentiation assay for pancreatic-like cell development from murine embryonic stem cells: detailed gene expression analysis. *Assay Drug Dev Technol.* 2011 Aug;9(4):403-19.
51. Guz Y, Nasir I, Teitelman G. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology.* 2001 Nov;142(11):4956-68.
52. Kim SY, Lee SH, Kim BM, Kim EH, Min BH, Bendayan M, et al. Activation of nestin-positive duct stem (NPDS) cells in pancreas upon neogenic motivation and possible cytodifferentiation into insulin-secreting cells from NPDS cells. *Dev Dyn.* 2004 May;230(1):1-11.
53. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med.* 2000 Mar;6(3):278-82.
54. Maria-Engler SS, Correa-Giannella ML, Labriola L, Krogh K, Colin C, Lojudice FH, et al. Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures. *J Endocrinol.* 2004 Dec;183(3):455-67.
55. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes.* 2001 Mar;50(3):521-33.
56. Lechner A, Habener JF. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Feb;284(2):E259-66.
57. Yashpal NK, Li J, Wang R. Characterization of c-Kit and nestin expression during islet cell development in the prenatal and postnatal rat pancreas. *Dev Dyn.* 2004 Apr;229(4):813-25.
58. May R, Sureban SM, Lightfoot SA, Hoskins AB, Brackett DJ, Postier RG, et al. Identification of a novel putative pancreatic stem/progenitor cell marker DCAMKL-1 in normal mouse pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Aug;299(2):G303-10.
59. McKnight KD, Wang P, Kim SK. Deconstructing pancreas development to reconstruct human islets from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010 Apr 2;6(4):300-8.
60. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 24;341(4):1135-40.
61. Sun B, Roh KH, Lee SR, Lee YS, Kang KS. Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Mar 23;354(4):919-23.
62. Chang CM, Kao CL, Chang YL, Yang MJ, Chen YC, Sung BL, et al. Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 1;357(2):414-20.
63. Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells.* 2007 Nov;25(11):2837-44.
64. Li Y, Zhang R, Qiao H, Zhang H, Wang Y, Yuan H, et al. Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007 Apr;211(1):36-44.
65. Kim JH, Park SN, Suh H. Generation of insulin-producing human mesenchymal stem cells using recombinant adeno-associated virus. *Yonsei Med J.* 2007 Feb 28;48(1):109-19.
66. Bassi EJ, Moraes-Vieira PM, Moreira-Sa CS, Almeida DC, Vieira LM, Cunha CS, et al. Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. *Diabetes.* 2012 Oct;61(10):2534-45.
67. Atoui R, Chiu RC. Concise review: immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: update, controversies, and unknowns. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Mar;1(3):200-5.
68. Bassi EJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, Camara NO. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* 2012 Jun;8(2):329-42.

69. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2007 Apr 11;297(14):1568-76.
70. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
71. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
72. Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell*. 2010 Dec 3;7(6):651-5.
73. Zhang H, Ma Y, Gu J, Liao B, Li J, Wong J, et al. Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biomaterials*. 2012 Jul;33(20):5047-55.
74. Gabanyi I, Lojudice FH, Kossugue PM, Rebelato E, Demasi MA, Sogayar MC. VP22 herpes simplex virus protein can transduce proteins into stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2013 Feb 1:0.
75. Doweiy SN, Huang X, Chou BK, Ye Z, Cheng L. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. *Nat Protoc*. 2012 Nov;7(11):2013-21.
76. Warren L, Manos PD, Anfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010 Nov 5;7(5):618-30.
77. Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 19;110(12):4557-62.
78. Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Golland R, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 15;106(37):15768-73.
79. Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell*. 2009 Aug 7;138(3):449-62.
80. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008 Oct 2;455(7213):627-32.
81. Yoon S. Co-expressing Pdx1 and Ngn3 induces few beta-like cells in the liver of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct 12;362(1):101-6.
82. Song YD, Lee EJ, Yashar P, Pfaff LE, Kim SY, Jameson JL. Islet cell differentiation in liver by combinatorial expression of transcription factors neurogenin-3, BETA2, and RIPE3b1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 9;354(2):334-9.
83. Kordowich S, Mansouri A, Collombat P. Reprogramming into pancreatic endocrine cells based on developmental cues. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Jul 8;323(1):62-9.
84. Lojudice FH. Identificação de genes diferencialmente expressos durante diferenciação de células-tronco e caracterização de células progenitoras mesenquimais [Tese de Doutorado]. São Paulo, SP, Brasil: Instituto de Química, USP; 2008.
85. Sukoyan MA, Kerkis AY, Mello MR, Kerkis IE, Visintin JA, Pereira LV. Establishment of new murine embryonic stem cell lines for the generation of mouse models of human genetic diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2002 May;35(5):535-42.
86. Campos-Lisboa AC, Mares-Guia TR, Grazioli G, Goldberg AC, Sogayar MC. Biodritin microencapsulated human islets of Langerhans and their potential for type 1 diabetes mellitus therapy. *Transplant Proc*. 2008 Mar;40(2):433-5.
87. Campanha-Rodrigues AL. Imunoproteção de ilhotas pancreáticas microencapsuladas em biomateriais inovadores e seu potencial terapêutico no Diabetes Mellitus Tipo 1 [Tese de Doutorado]. São Paulo, SP, Brasil: Instituto de Química, USP; 2012.
88. <http://www.sigmaldrich.com>. Mapa do vetor pLKO.1-puro 2013.
89. Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc*. 2006;1(1):241-5.
90. Sherwood RI, Chen TY, Melton DA. Transcriptional dynamics of endodermal organ formation. *Dev Dyn*. 2009 Jan;238(1):29-42.
91. Lojudice FHK, P.M.; Fortuna, V.A.; Sogayar, M.C. Unique genes identified during insulin-producing cells differentiation of murine embryonic stem cell line. in prep.
92. Kaneto H, Miyatsuka T, Kawamori D, Yamamoto K, Kato K, Shiraiwa T, et al. PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function. *Endocr J*. 2008 May;55(2):235-52.

93. Bratt-Leal AM, Carpenedo RL, McDevitt TC. Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol Prog.* 2009 Jan-Feb;25(1):43-51.
94. Pokrywczynska M, Krzyzanowska S, Jundzill A, Adamowicz J, Drewa T. Differentiation of stem cells into insulin-producing cells: current status and challenges. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013 Apr;61(2):149-58.
95. Maria-Engler SS, Mares-Guia M, Correa ML, Oliveira EM, Aita CA, Krogh K, et al. Microencapsulation and tissue engineering as an alternative treatment of diabetes. *Braz J Med Biol Res.* 2001 Jun;34(6):691-7.
96. Fong CY, Gauthaman K, Bongso A. Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *J Cell Biochem.* 2010 Nov 1;111(4):769-81.
97. Fujikawa T, Oh SH, Pi L, Hatch HM, Shupe T, Petersen BE. Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am J Pathol.* 2005 Jun;166(6):1781-91.
98. Mfopou JK, Chen B, Mateizel I, Sermon K, Bouwens L. Noggin, retinoids, and fibroblast growth factor regulate hepatic or pancreatic fate of human embryonic stem cells. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(7):2233-45, 45 e1-14.
99. Yano T, Liu Z, Donovan J, Thomas MK, Habener JF. Stromal cell derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 attenuates diabetes in mice and promotes pancreatic beta-cell survival by activation of the prosurvival kinase Akt. *Diabetes.* 2007 Dec;56(12):2946-57.
100. Hasan NM, Kendrick MA, Druckenbrod NR, Huelsmeyer MK, Warner TF, MacDonald MJ. Genetic association of the neuropilin-1 gene with type 1 diabetes in children: Neuropilin-1 expression in pancreatic islets. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Mar;87(3):e29-32.
101. Liu T, Branch DR, Jin T. Pbx1 is a co-factor for Cdx-2 in regulating proglucagon gene expression in pancreatic A cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 Apr 25;249(1-2):140-9.
102. Alexa K, Choe SK, Hirsch N, Etheridge L, Laver E, Sagerstrom CG. Maternal and zygotic *aldh1a2* activity is required for pancreas development in zebrafish. *PLoS One.* 2009;4(12):e8261.
103. Rachdi L, El Ghazi L, Bernex F, Panthier JJ, Czernichow P, Scharfmann R. Expression of the receptor tyrosine kinase KIT in mature beta-cells and in the pancreas in development. *Diabetes.* 2001 Sep;50(9):2021-8.
104. Chu K, Tsai MJ. Neuronatin, a downstream target of BETA2/NeuroD1 in the pancreas, is involved in glucose-mediated insulin secretion. *Diabetes.* 2005 Apr;54(4):1064-73.
105. Chauhan BK, Zhang W, Cveklova K, Kantorow M, Cvekl A. Identification of differentially expressed genes in mouse Pax6 heterozygous lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Jun;43(6):1884-90.
106. Ziai R, Pan YC, Hulmes JD, Sangameswaran L, Morgan JI. Isolation, sequence, and developmental profile of a brain-specific polypeptide, PEP-19. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Nov;83(21):8420-3.
107. Mugnaini E, Berrebi AS, Dahl AL, Morgan JI. The polypeptide PEP-19 is a marker for Purkinje neurons in cerebellar cortex and cartwheel neurons in the dorsal cochlear nucleus. *Arch Ital Biol.* 1987 Dec;126(1):41-67.
108. Kleerekoper QK, Putkey JA. PEP-19, an intrinsically disordered regulator of calmodulin signaling. *J Biol Chem.* 2009 Mar 20;284(12):7455-64.
109. Shawl AI, Park KH, Kim UH. Insulin receptor signaling for the proliferation of pancreatic beta-cells: involvement of Ca²⁺ second messengers, IP₃, NAADP and cADPR. *Islets.* 2009 Nov-Dec;1(3):216-23.
110. Henquin JC. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in beta-cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Aug;93 Suppl 1:S27-31.
111. Mouton-Liger F, Thomas S, Rattenbach R, Magnol L, Larigaldie V, Ledru A, et al. PCP4 (PEP19) overexpression induces premature neuronal differentiation associated with Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase II-delta activation in mouse models of Down syndrome. *J Comp Neurol.* 2011 Oct 1;519(14):2779-802.
112. Harashima S, Wang Y, Horiuchi T, Seino Y, Inagaki N. Purkinje cell protein 4 positively regulates neurite outgrowth and neurotransmitter release. *J Neurosci Res.* 2011 Oct;89(10):1519-30.
113. Wei P, Blundon JA, Rong Y, Zakharenko SS, Morgan JI. Impaired locomotor learning and altered cerebellar synaptic plasticity in pep-19/PCP4-null mice. *Mol Cell Biol.* 2011 Jul;31(14):2838-44.
114. Xiao J, Wu Y, Chen R, Lin Y, Wu L, Tian W, et al. Expression of Pcp4 gene during osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Cell Biochem.* 2008 Feb;309(1-2):143-50.

115. Erhardt JA, Legos JJ, Johanson RA, Slemmon JR, Wang X. Expression of PEP-19 inhibits apoptosis in PC12 cells. *Neuroreport*. 2000 Nov 27;11(17):3719-23.

9. LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Aprovação dos protocolos pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto de Química da USP.

Anexo B - Capítulo de Livro. Lojudice FHK, P.M.; Sogayar, M.C. Pancreatic Stem Cells. In: Goldenberg RCSC, A.C.C., editor. Resident Stem Cells and Regenerative Therapy. MA, USA: Elsevier; 2012. p. 33-42.

Anexo C - Certificado de Melhor Trabalho Científico apresentado em forma de Poster; Expression of genes related to differentiation of stem cells into beta-like cells. 2011.

Anexo D - Certificado de *Honor Mention for the Oral Presentation, with the abstract: Embryonic stem cell (ESC) differentiation into beta-like cells: role of Purkinje Cell Protein 4 (PCP4)*. 2012.

Anexo F - Súmula curricular do autor.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

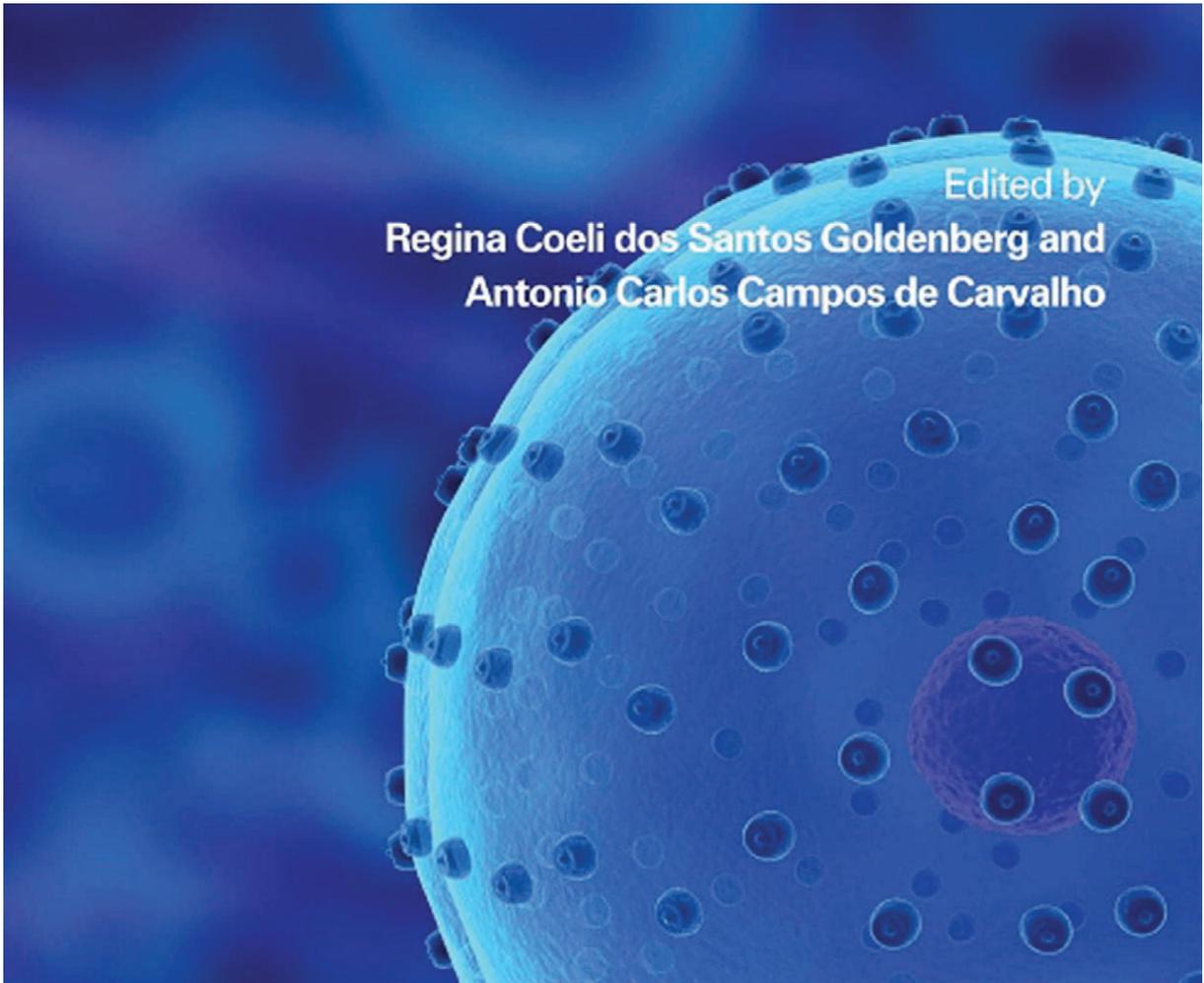
CERTIFICADO Nº 12/2012

Certifico que o Projeto “**Estudo de genes relacionados à diferenciação beta-pancreática e diferenciação de células tronco em células produtoras de insulina**”, desenvolvido sob responsabilidade da **Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), do IQ-USP, em 24/08/2012.

We attest that the project entitled “**Estudo de genes relacionados à diferenciação beta-pancreática e diferenciação de células tronco em células produtoras de insulina**”, developed under the responsibility of **Dra. Mari Cleide Sogayar**, in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 8/24/2012.

São Paulo, 24 de agosto de 2012.

Prof. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto
Coordenadora CEUA

A microscopic view of a cell, likely a stem cell, showing its surface covered with numerous small, dark, spherical receptors. The cell is rendered in shades of blue and purple, with a glowing, ethereal quality. The background is a soft, out-of-focus blue.

Edited by
**Regina Coeli dos Santos Goldenberg and
Antonio Carlos Campos de Carvalho**

Resident **Stem Cells** and Regenerative Therapy





Pancreatic Stem Cells

Fernando H. Lojudice*, Patrícia M. Kossugue*,
Mari C. Sogayar[†]

* *Chemistry Institute, Biochemistry Department, Cell and Molecular
Therapy Center (NUCEL), University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

[†] *Instituto de Química, São Paulo, Brazil*

Introduction

The main metabolic source of energy used by most human tissues is glucose, an essential metabolite for some cell types, such as neurons and erythrocytes. Maintenance of normoglycemia is crucial for correct metabolic function, and is regulated by several physiologic processes, including hormonal mechanisms, mainly orchestrated by the pancreas.

Two different tissues constitute the pancreas: the exocrine pancreas, which secretes digestive enzymes into the intestine, and the endocrine pancreas, which secretes hormones into the bloodstream. The endocrine cells are clustered, forming the islets of Langerhans, which are basically formed by four cell types: beta cells, which secrete insulin, C-peptide, and amylin; alpha cells, which secrete glucagon; delta cells, which secrete somatostatin; and PP cells, which secrete the pancreatic polypeptide.

Embryogenesis and Organogenesis

After gastrulation, all three germ layers are developed: endoderm, mesoderm, and ectoderm. The primitive gut develops from the endoderm, and, depending on the

signal that each part of this primitive gut receives, it gives rise to different organs, such as the liver, pancreas, or intestine.

In the mouse, the pancreatic development starts at embryonic day 8.5 (E8.5), with the expression of Pdx1 (*pancreas-duodenum homeobox*) and repression of Shh (*sonic hedgehog*) expression in a region located at the posterior foregut. Later on, two buds arise from this region, the ventral and dorsal buds. Some factors, such as Ptf1a (*pancreas transcription factor*), are necessary for ventral pancreas development, whereas others, such as Hlxb9 (*homeobox gene Hb9*), are necessary for dorsal pancreas formation.

The ventral bud fuses to the dorsal bud, and some evaginations arise from the epithelium. Cells residing at the “tips” of the branching epithelium adopt an acinar fate, whereas cells in the core or “trunk” become restricted to a ductal or endocrine fate [1,2], followed by formation of other cell types. The progenitor cells express Hes1 (*hairy and enhancer of split homolog*), which promotes the undifferentiated state, whereas FGFs (*fibroblast growth factors*) stimulate cell proliferation. The differentiation of endocrine versus exocrine cells is accomplished by lateral inhibition within the ductal epithelium, mediated by the Notch pathway [3,4]. Ngn3 induces the expression of Notch ligands, activating the Notch pathway in adjacent cells [5]. Downstream targets of the Notch pathway (e.g., hairy/enhancer-of-split 1, Hes1) repress Ngn3 expression, thereby inhibiting endocrine differentiation. Additionally, Hes1 represses the p57 cell cycle inhibitor, thus maintaining a proliferative pool of pancreatic progenitor cells within the embryonic ductal epithelium [6]. Therefore, cells in which the Notch signaling pathway is activated maintain their proliferative capacity, whereas cells in which this signaling is not activated express Ngn3, exit the cell cycle, and differentiate into endocrine cells—alpha, beta, delta, and PP cells—which produce glucagon, insulin, somatostatin, and pancreatic polypeptide, respectively. Subsequently, development of the endocrine pancreas is controlled by transcription factors such as PDX-1, Neurogenin 3, PAX-4 e PAX-6, ISL-1, BETA2-NEUROD1, MAF, NKX2.2, and NKX6.1. These transcription factors regulate migration and proliferation during pancreas development. The endocrine tissue is located in small aggregates known as *islets of Langerhans*, which can be isolated from cadaveric donors and used in islet cell transplantation (Fig. 2.1).

EXPANSION VERSUS NEOGENESIS

After organogenesis, new beta cells may be originated, which is evidenced by islet cell mass increase after birth and the discovery of islet cells and precursors near the pancreatic ductal structures. It is also known that a significant regeneration of pancreatic tissue, including beta-cell mass increase, occurs in rats subsequent to a 90% pancreatectomy. Two main theories have been postulated: the expansion and the neogenesis theories. In the former, new beta cells are originated via replication of

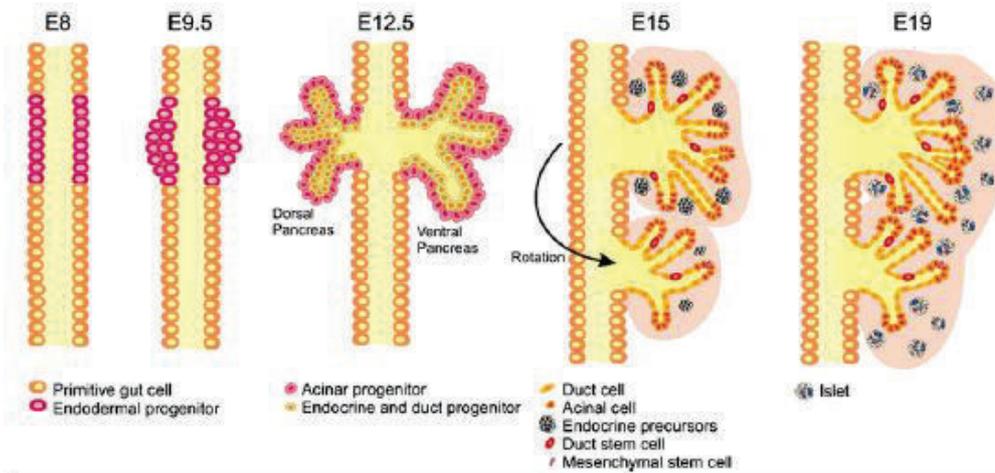


Figure 2.1 Embryonic development of the mouse pancreas. The pancreas organogenesis begins around embryonic day 9.5 (E9.5), when a small group of cells in the primitive gut initiate their differentiation. From E12.5 two buds arise: the ventral and the dorsal pancreas. On E15, the dorsal bud rotates and fuses with the ventral bud. From E19, the endocrine progenitors initiate their final differentiation in the islets of Langerhans.

preexisting beta cells and in the latter, new beta cells are differentiated from pancreatic precursor stem (progenitor) cells. The absence of Ngn3 expression in the adult pancreas supports the expansion theory, whereas the presence of small beta cell clusters or solitary beta cells adjacent to ducts are often interpreted as products of neogenesis.

The mechanism postulated to replace lost beta cells in adult individuals depends mainly on the expansion of preexisting beta cells rather than differentiation of stem cell precursors. Many growth factors and hormones have been tested in the search for inducers of pancreatic beta cells growth [7]. Also, it is well known that when the pancreatic duct is ligated, neogenesis occurs [8], because Ngn3⁺ precursor cells arise from the ducts and differentiate into new beta cells.

PANCREATIC STEM CELLS

Pancreatic stem cells have been studied for many years because of their advantageous characteristics, namely their high proliferation rate and natural commitment to the endocrine lineage. Utilization of these cells would be a better strategy to obtain beta cells when compared to other stem cell sources, because they may be stimulated to induce compensatory growth *in vivo* [9].

At least two different stem cell populations have been described in the pancreas (Fig. 2.2). The first group consists of ductal and acinar cells, which have been suggested to reside in the ductal pancreatic epithelium and to express the CK-19 and Pdx1 ductal markers [10]. These cells can proliferate and differentiate into endocrine

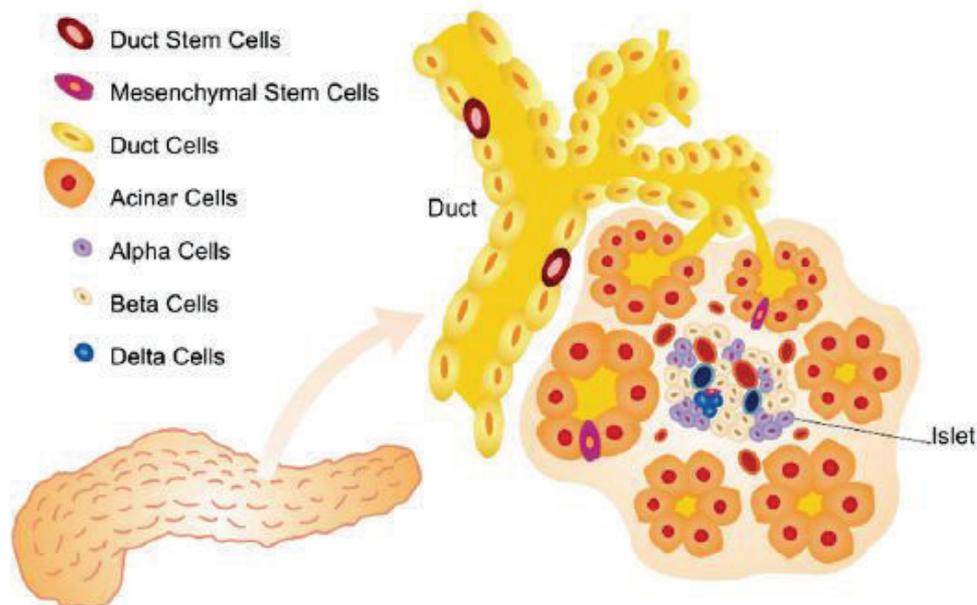


Figure 2.2 Different cell types and putative stem cell populations residing inside the pancreatic tissue. See Plate 3.

cells [11]. The second group consists of a population derived from the islets. Some reports show insulin-positive cells arising inside islets after total destruction of beta cells [9]. In a previous study, our group reported the existence of islet-progenitor/islet-stem cells arising from the islet itself [12] (Fig. 2.3).

For many years, nestin-positive cells were considered to be stem cells derived from pancreatic islets [13]. Nestin-positive cells express the ATP-binding cassette transporter (a stem cell marker) [14], display a high proliferative rate *in vivo*, and may differentiate *in vitro* into cells with characteristic phenotypes of hepatic, exocrine, ductal, and endocrine pancreatic cells [13]. Nestin+ cells are present not only in the pancreas but also in the ducts and display beta cell precursor characteristics, such as high Pdx1 levels [10, 15]. Some reports showed that nestin is only expressed in cells that are marked not to turn into beta cells [16-18]. However, other reports suggest that there are different populations of nestin+ cells in the pancreas and that nestin seems to be a functional protein that may be expressed not only in beta cell precursors but also in other cell types [19]. Therefore, it is important to study the role of nestin+ cells in precursor beta cells because nestin expression may play an essential function during precursor maturation.

Another pancreatic cell subpopulation expresses the HGF receptor (HGFR/c-Met). It has been suggested that HGF is important for regulating the function, proliferation, and differentiation of pancreatic beta cells [14]. In neonate mice pancreas, c-Met+ cells are present in the acinar tissue, but not in the islets. Some of

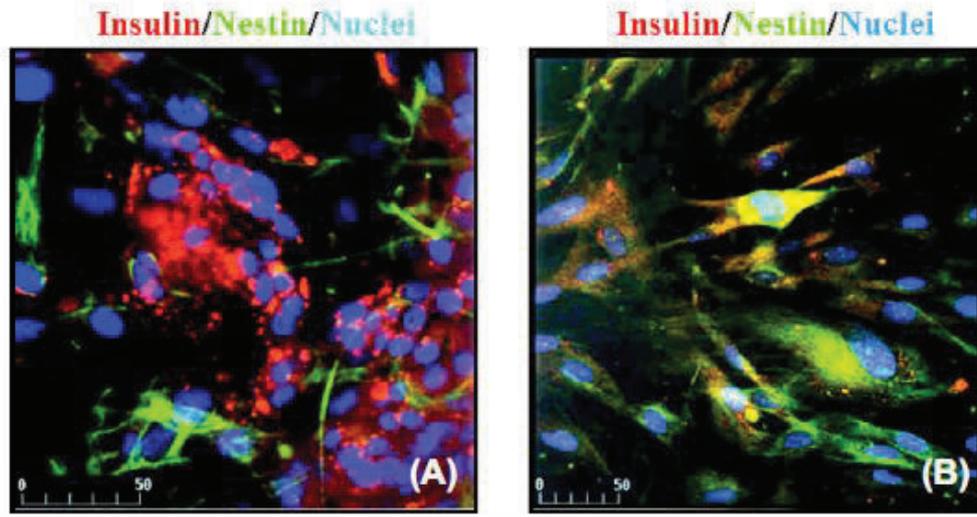


Figure 2.3 Confocal microscopy of triple-labeled immunofluorescence for insulin (red), nestin (green), and DAPI for nuclei (blue). Human pancreatic islet cell cultures were maintained for 24 (A) and 60 (B) days on uncoated plastic. Whereas the insulin signal tended to decrease with time, nestin-positive cells constitute the great majority of cells in long-term culture and co-localization of insulin and nestin is observed (B). Scale bars in μm . (From [12].) See Plate 4.

these cells are also present in ducts, but they do not assume acinar or endocrine phenotypes. In the adult pancreas, c-Met is mainly expressed in and adjacent to the pancreatic ducts and vascular endothelium, and adjacent to acinar tissue [20]. In addition, cells expressing endocrine markers are observed in clusters derived from c-Met⁺ cells, which can differentiate into endocrine cells in vivo.

Yet another pancreatic cell subpopulation is represented by the c-Kit-positive cells. The c-Kit is an universal stem cell marker. Binding of stem cell factor (SCF) to c-Kit results in cell proliferation, survival, and chemotaxis. The c-Kit receptor is expressed in the pancreas before and after birth. Co-localization studies have shown that c-Kit is expressed adjacent to islets, co-localizing with glucagon-positive cells [21]. Although the role of c-Kit in beta cell development is still unknown, some reports indicate that c-Kit⁺ stem cells display similar characteristics to endocrine precursor cells, being present in islets.

DCAMKL-1 is also a putative marker for pancreatic stem cells because cells expressing this marker were observed in the newborn and in adult mouse pancreatic epithelial cells and islets, but not within acinar cells. Co-expression was observed with somatostatin, NGN3, and nestin, but not with glucagon or insulin. Isolated DCAMKL-1-positive cells form spheroids in suspension culture and induce nodule formation in isotransplantation assays. Analysis of nodules demonstrated PDX-1, CK-14, and Ep-CAM markers, and islet-like structures (somatostatin and secretin positive) [22].

Studies using purified native cardiomyocyte and hematopoietic progenitor/stem cell lineages have contributed new data to generate these cells from other stem cells. For this reason, several groups are trying to understand the different phenotypes, gene expression profiles, and cell surface markers of native pancreatic cells, aiming at obtaining better results in the pancreatic cells differentiation field. Unfortunately, not much is known about the developing and postnatal mouse pancreas, and most of the available data focus on whole pancreas, islets, or immortalized cell lines. Moreover, some reports may have been based on cells obtained from “contaminated” cultures, a mix of different cell types [23].

There are some evidence that, purified progenitor cell cultures obtained by FACS sorting, may contribute to obtain large amounts of insulin-producing cells, almost without other cell types. Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), which is already known as a definitive endoderm-specific marker, has been used to select for definitive endoderm progenitors (CXCR4-positive cells). When these definitive endoderm progenitors are subjected to differentiation, 95% of the cells turn into PDX-1-positive cells, compared to less than 10% in the CXCR4-negative population [24].

Although several reports describe the isolation of pancreatic stem cells, and these cells seem to have a higher capacity to differentiate into insulin-producing cells when compared to other stem cells, none of the reports show their efficient differentiation into functional cells.

TRANSDIFFERENTIATION AND DIFFERENTIATION

The differentiation of a cell that is terminally differentiated into another unrelated cell lineage is possible, in theory, occurring through the process of transdifferentiation or by dedifferentiation followed by differentiation. Dedifferentiation is characterized as a multistep process that involves the loss of specific cell characteristics and reentrance into the cell cycle. For this reason, other pancreatic cells, which do not belong to the endocrine lineage, are possible sources of new beta cells [25-27], as both endocrine and exocrine cells have the same embryonic origin [4,28,29]. In vitro, endocrine, and exocrine cells dedifferentiate and express the same ductal marker, namely CK-19, indicating the same pattern of dedifferentiation.

It is important to mention that insular stem cells have yet to be fully characterized. In vitro co-localization experiments indicate that the ductal epithelium, exocrine tissue, and beta cell replication contribute to produce new insulin-positive cells [8,30,31].

It has also been shown that extrapancreatic tissue may be modified to express insulin, including the hepatic tissue [32], bone marrow [10,33], and monocytes [34]. The liver has an endodermic origin, as does the pancreas, with some reports indicating that oval hepatic cells can be manipulated to simultaneously co-express insulin and

glucagon [35]. Another alternative is the use of bone marrow stem cells to repopulate the pancreas. However, the mechanisms involved seem to be more related to neof ormation of pancreatic vasculature than transdifferentiation of bone marrow stem cells [36].

Stem cells from several sources, including embryonic stem cells, have been subjected to differentiation protocols hoping to achieve insulin-producing cells. Some reports, including from our own group [37-41], show that murine embryonic stem cells (mESCs) are able to form islet-like structures, but their insulin production levels are insufficient to render diabetic mice normoglycaemic.

Another strategy to obtain beta cells is based on cellular reprogramming by overexpression of defined factors in an adult organ. By reexpressing key developmental regulators (Ngn3, Pdx1, and Mafa) *in vivo*, it has been shown that it is possible to reprogram differentiated pancreatic exocrine cells into cells that closely resemble the beta cells [42].

As a result of important ethical and technical issues, the use of embryonic stem cells (ESCs) and molecular manipulation of these and other stem cells are still far from being applicable to patients, but ESCs have greatly contributed to elucidate some molecular aspects of pancreatic organogenesis and pancreatic islet biology.

ISLET CELL TRANSPLANTATION AS AN ATTRACTIVE TREATMENT FOR TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Although studies related to stem cells and other alternative cell sources for pancreatic beta cells are only beginning, isolated pancreatic islets have been exhaustively studied for many years. Islet cell transplantation has been performed worldwide since the early 2000s, but it was introduced in Brazil by our group in 2002 [43]. Human islets may be isolated from pancreas obtained from cadaveric donors by enzymatic (collagenase) digestion, purified by density gradient, and implanted into the liver of hyperlabile type 1 diabetic patients (Fig. 2.4). Even though this procedure is much less invasive than total pancreas transplantation, it is still necessary to administer immunosuppressors to the patient in order to prevent immune rejection of the islet tissue. For that reason, some groups, including ours, have developed a technique in which islets are encapsulated with alginate or other biopolymers, such as the one developed by our group (patent pending [44]), showing that these encapsulated islets are able to revert type 1 diabetes induced in Balb/c mice by streptozotocin injection and protect these cells from the immune system, without interfering with the islet function [45]. This encapsulation technique may also be useful to protect other cell types from the immune rejection in other cell therapy protocols. We are aiming at encapsulation of insulin-producing cells, obtained by differentiation of ESCs or of adult progenitor cells, or by prolactin-induced beta cell mass increase [7] as a means to overcome the problems of organ shortage for islet isolation and the dramatic increase in the incidence of diabetes mellitus worldwide.

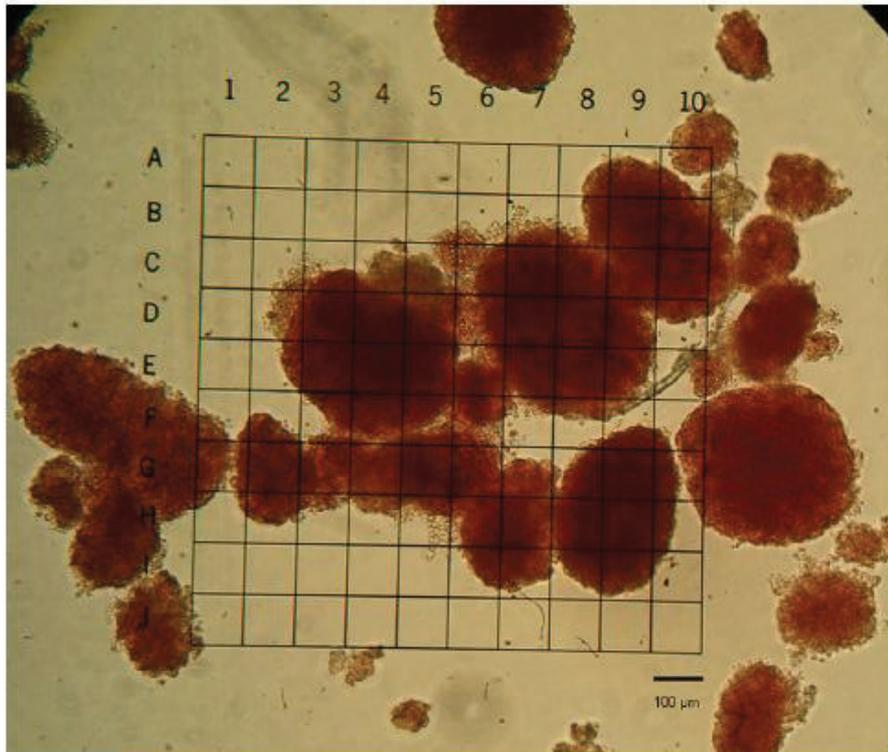


Figure 2.4 Purified human pancreatic islet. Human pancreas are harvested from cadaveric donors and digested through mechanic and enzymatic action, and the islets are purified in a continuous Ficoll density gradient, yielding extremely pure and viable islets, which are identified by staining with the zinc-chelating dithizone. See Plate 5.

References

- [1] Solar M, et al. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell* 2009;17(6):849–60.
- [2] Zhou Q, et al. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 2007; 13(1):103–14.
- [3] Jensen J, et al. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 2000;49(2):163–76.
- [4] Apelqvist A, et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 1999; 400(6747):877–81.
- [5] Heremans Y, et al. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol* 2002;159(2):303–12.
- [6] Georgia S, et al. p57 and Hes1 coordinate cell cycle exit with self-renewal of pancreatic progenitors. *Dev Biol* 2006;298(1):22–31.
- [7] Labriola L, et al. Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 2007;263(1-2):120–33.

BAHIA • 2011

VI
Congresso Brasileiro de CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR

Certificado

Certificamos que
PATRICIA MAYUMI KOSSUGUE

participou do VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular realizado no período de 28 de setembro a 01 de outubro de 2011, em Salvador - Bahia e recebeu o prêmio de **Melhor Trabalho Científico – Apresentação Poster**, intitulado **"EXPRESSION OF GENES RELATED TO DIFFERENTIATION OF STEM CELLS INTO BETA-LIKE CELLS"**.

Salvador 01 de outubro de 2011

232

Ricardo Ribeiro dos Santos

Ricardo Ribeiro dos Santos
 Presidente do VI Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular

Rosalina Mendez Otero

Rosalina Mendez-Otero
 Presidente da ABICel

MONICION / REALIZAÇÃO



ABICel - Associação Brasileira de Terapia Celular

APOIO:



**7TH CB
CT
TC**



BRAZILIAN CONGRESS ON STEM CELLS AND CELL THERAPY

October 3 - 6, 2012 - São Paulo - Brazil

Certificate

The Associação Brasileira de Terapia Celular (ABTCEL) and International Society for Stem Cell Research (ISSCR), certify that

Kossugue PM, Grazioli G, Lojudice FH, Sogayar MC

have participated on the 7th CBCTTC Brazilian Congress on Stem Cells and Cell Therapy, October 3rd to 6th, held in São Paulo, Brazil, as the Honor Mention for the Oral Presentation, with the abstract: EMBRYONIC STEM CELL (ESC) DIFFERENTIATION INTO BETA-LIKE CELLS: ROLE OF PURKINJE CELL PROTEIN 4 (PCP4)

São Paulo, October 6th, 2012.

Lygia da Veiga Pereira
President

Valéria Bezerra de Carvalho
Vice-President

Rosália Mendez-Otero
ABTCEL President



ABTCEL ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA
DE TERAPIA CELULAR

ISSCR
International Society for Stem Cell Research

Patrícia Mayumi Kossugue
Curriculum Vitae

Abril/2013

Patrícia Mayumi Kossugue

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Patrícia Mayumi Kossugue
Filiação Rafael Hiroyoshi Kossugue e Adélia Toshiko Kodama Kossugue
Nascimento 30/06/1982 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade 294382136 ssp - SP - 16/10/1999
CPF 224.131.828-02

Endereço residencial Rua Carlos Weber, 1376, ap 51 B
Vila Hamburguesa - São Paulo
05303904, SP - Brasil
Telefone: 11 3832-8283

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica
Av. Prof. Lineu Prestes, 748 / Bl. 9
Cidade Universitária - São Paulo
05508900, SP - Brasil
Telefone: 11 3091-9049

Endereço eletrônico

E-mail para contato : pmkossugue@usp.br
e-mail alternativo : pmkossugue@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2007** Doutorado em Bioquímica.
Instituto de Química - Universidade de São Paulo, IQ-USP, Brasil
Título: Diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (*mESCs*) em células produtoras de insulina (*IPCs*) e caracterização funcional do gene *Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)* neste processo
Orientador: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar
- 2001 - 2004** Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2001 - 2004** Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Estudos Moleculares no gene *RYS1* em pacientes com Miopatia de Central Core
Orientador: Profa. Dra. Mariz Vainzof
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
-

Atuação profissional

1. Instituto de Química - Universidade de São Paulo - IQ-USP

Vínculo institucional

2007 - Atual Vínculo: Aluna , Enquadramento funcional: Doutoranda, Regime: Dedicção exclusiva

2006 - 2007 Vínculo: Treinamento técnico industrial , Enquadramento funcional: Treinamento técnico industrial, Regime: Dedicção exclusiva

2. Centro de Estudos do Genoma Humano / Instituto de Biociências

Vínculo institucional

2003 - 2006 Vínculo: estagiário , Enquadramento funcional: iniciação científica, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

01/2005 - 12/2005 Outra atividade técnico-científica, Universidade de São Paulo - USP, Centro de Estudos do Genoma Humano - CEGH

Especificação:

Responsável pelo diagnóstico molecular de Sarcoglicanopatias pelas técnicas de PCR-SSCP multiplex e seqüenciamento automático

01/2005 - 12/2005 Outra atividade técnico-científica, Universidade de São Paulo - USP, Centro de Estudos do Genoma Humano - CEGH

Especificação:

Responsável pelo estabelecimento de culturas primárias de mioblastos e fibroblastos de biópsias de pacientes do Centro

Projetos

2007 - Atual Diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (*mESCs*) em células produtoras de insulina (*IPCs*) e caracterização funcional do gene *Purkinje Cell Protein 4 (Pcp4)* neste processo

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Patrícia Mayumi Kossugue (Responsável);

2006 - Atual Caracterização e estudo da diferenciação de células-tronco de polpa dentária humana

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Patrícia Mayumi Kossugue (Responsável);

Prêmios e títulos

2012 *Honor Mention for the Oral Presentation, with the abstract: Embryonic stem cell (ESC) differentiation into beta-like cells: role of Purkinje Cell Protein 4 (PCP4), ABTCel*

2011 Melhor Trabalho Científico apresentado em forma de Poster; *Expression of genes related to differentiation of stem cells into beta-like cells, ABTCel*

2004 Menção Honrosa pelo trabalho apresentado: Mutações na região terminal do gene RYR1 são freqüentes em pacientes brasileiros com miopatia de central core (CCD), SIICUSP

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Gouveia, T. L. F., **KOSSUGUE, P. M.**, Paim, J. F. O., Zatz, M., Anderson, L. V. B., NIGRO, V., VAINZOF, M.

A new evidence for the maintenance of the sarcoglycan complex in muscle sarcolemma in spite of the primary absence of δ -SG protein. Journal of Molecular Medicine. , v., p. - , 2007.

2. **KOSSUGUE, P. M.**, Paim, J. F. O., Navarro, M., Silva, H. C., Pavanello, R. C. M., Gurgel-Giannetti, J., Zatz, M., VAINZOF, M.

Central Core disease due to recessive mutations in RYR1 gene: is it more common than described?. Muscle & Nerve (Print). , v.35, p.670 - 674, 2007.

Artigos aceitos para publicação

1. GABANYI, I., LOJUDICE, F., **KOSSUGUE, P. M.**, REBELATO, E., DEMASI, M., SOGAYAR, M. C.

VP22 Herpes Simplex Virus protein as a tool to transduce proteins into stem cells. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. , 2013.

Capítulos de livros publicados

1. LOJUDICE, F., **KOSSUGUE, P. M.**, SOGAYAR, M. C.

Pancreatic Stem Cells In: *Resident Stem Cells and Regenerative Therapy*.1 ed.Waltham, MA, USA : Elsevier, 2012, v.1, p. 33-42.

2. VAINZOF, M., **KOSSUGUE, P. M.**

Estudos genéticas na Hipertermia Maligna e Miopatia de Central Core In: *Hipertermia Maligna*.1 ed. : Atheneu, 2008, v.1, p. 1-.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. GABANYI, I., LOJUDICE, F., **KOSSUGUE, P. M.**, REBELATO, E., DEMASI, M., SOGAYAR, M. C.

USO DA PROTEÍNA VP22 COMO FERRAMENTA PARA INTERNALIZAR PROTEÍNAS EM CÉLULAS TRONCO VISANDO SUA DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA In: XX Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli, 2011, São Paulo.

ANAIS DA XX SEMANA CIENTÍFICA "BENJAMIN EURICO MALUCELLI". , 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. VAINZOF, M., Yamamoto, L. U., Ayub, D., **KOSSUGUE, P. M.**, Morris, G.

Utrophin in the dystrophic muscle: evaluation of the contribution of connective tissue In: 11th International Congress of the World Muscle Society, 2006, Bruges.

Neuromuscular Disorders. , 2006.

2. Silva, H. C., MUNIZ, V. P., **KOSSUGUE, P. M.**, Tsanaclis, A. M., Schimdt, B., Oliveira, A. S. B., Gabai, A. A., Amaral, J. L> G.

Brazilian MH group: results of IVCT, pathological and genetic investigation In: 10th Internacional Congress of the World Muscle Society, Cataratas do Iguaçu.

Neuromuscular Disorders. Pergamon, 2005. v.15.

3. Silva, H. C., MUNIZ, V. P., **KOSSUGUE, P. M.**, VAINZOF, M., Tsanaclis, A. M., Schimdt, B., Oliveira, A. S. B., Gabai, A. A., Amaral, J. L > G.

Brazilian MH group: results of IVCT, pathological and genetic investigation In: 10th International Congress of the World-Muscle-Society, 2005, Cataratas do Iguaçu.

NEUROMUSCULAR DISORDERS. KIDLINGTON: PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD, 2005. v.15. p.680 - 680

4. **KOSSUGUE, P. M.**, MUNIZ, V. P., Pavanello, R. C. M., Silva, H. C., Gurgel-Giannetti, J., Paim, J. F. O., Zatz, M., VAINZOF, M.

Screening for mutations in the C-terminal region of RYR1 gene identify high frequency of recessive form of Central Core Disease (CCD) in Brazil In: 10th International Congress of the World Muscle Society, Cataratas do Iguaçu.

Neuromuscular Disorders. Pergamon, 2005. v.15. p.680 -

5. Yamamoto, L. U., Velloso, F. J., **KOSSUGUE, P. M.**, Fogaça, L. L. Q., Vajsar, J, Paim, J. F. O., Zatz, M., VAINZOF, M.

Spectrum of mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) in patients referred as congenital muscular dystrophies In: 10th Internacional Congress of the World Muscle Society, Cataratas do Iguaçu.

Neuromuscular Disorders. Pergamon, 2005. v.15. p.706 -

6. Fogaça, L. L. Q., Gouveia, T. L. F., **KOSSUGUE, P. M.**, AMBROSIO, C. E., Miglino, M. A., Zatz, M., Nguyen, T. M., Morris, G., VAINZOF, M.

Utrophin expression and localization in the canine Golden Retriever muscular dystrophy model In: 10th Internacional Congress of the World Muscle Society, Cataratas do Iguaçu.

Neuromuscular Disorders. Pergamon, 2005. v.15. p.685 -

7. VAINZOF, M., **KOSSUGUE, P. M.**, Yamamoto, L. U., Gouveia, T. L. F., Santos, B. G. C., Lima, B. L., Gurgel-Giannetti, J., Moza, M., CARPEN, O.

Heterogeneity in myotilin expression in a patient with limb girdle muscular dystrophy In: 9th International Congress of the World Muscle Society, Göteborg.

Neuromuscular Disorders. Pergamon, 2004. v.14. p.606 -

8. **KOSSUGUE, P. M.**, MUNIZ, V. P., Pavanello, R. C. M., Silva, H. C., Gurgel-Giannetti, J., Paim, J. F. O., VAINZOF, M.

Mutations in the c-terminal region of the RYR1 gene are also common in Brazilian patients with Central Core Disease In: XXI Congresso Brasileiro de Neurologia, Brasília.

Arquivos de Neuro-Psiquiatria. , 2004. v.62. p.12 - 13

9. VAINZOF, M., Yamamoto, L. U., **KOSSUGUE, P. M.**, Fogaça, L. L. Q., Gurgel-Giannetti, J., Salmikangas, P., Carpen, O.

Deficiency of myotilin in skeletal muscle of a patient with limb-girdle muscular dystrophy: a primary or a secondary defect? In: The 53rd Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Los Angeles.

The American Journal of Human Genetics. Chicago: The University of Chicago Press, 2003. v.73. p.557 -

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. VAINZOF, M., **KOSSUGUE, P. M.**, Ayub, D., Onofre, P., Zilberztajn, D., Sell, K., Yamamoto, L. U., Martins, P., MAIA, L., Zatz, M., Silva, H. C., Miglino, M. A., Ambrosio, C. A., Xavier Neto, J.

Modelos animais para doenças neuromusculares humanas In: V SIMPOSIO BRASILEIRO DE DNM/ELA, 2006, São Paulo.

.. , 2006.

2. **KOSSUGUE, P. M.**, MUNIZ, V. P., VAINZOF, M.

Estudos genéticos na Hipertermia Maligna e Miopatia de Central Core In: V Simpósio Brasileiro

de Hipertermia Maligna, São Paulo.

Revista Neurociências, 2005. v.13. p.66 - 68

3. VAINZOF, M., Yamamoto, L. U., **KOSSUGUE, P. M.**, Fogaça, L. L. Q., Velloso, F. J., Ayub, D., MUNIZ, V. P., Zatz, M., Silva, H. C., Massironi, S. M. G., Miglino, M. A., AMBROSIO, C. E., Miyazato, L. G., Moraes, J. R. E.

Modelos animais ajudando a decifrar doenças neuromusculares humanas In: V Simpósio Brasileiro de Hipertermia Maligna, São Paulo.

Revista Neurociências, 2005. v.13.

4. VAINZOF, M., **KOSSUGUE, P. M.**, Yamamoto, L. U., Gurgel-Giannetti, J., Paim, J. F. O., CARPEN, O.

Expressão heterogênea da proteína sarcomérica miotilina em pacientes com Distrofia Muscular das Cinturas (DMC) In: Quarto Encontro da Sociedade Brasileira de Investigação Neurológica, Curitiba.

O Dendrito, 2004. v.10. p.32 - 33

5. **KOSSUGUE, P. M.**, MUNIZ, V. P., Pavanello, R. C. M., Silva, H. C., Gurgel-Giannetti, J., Paim, J. F. O., Zatz, M., VAINZOF, M.

Mutações na região terminal do gene RYR1 são frequentes em pacientes brasileiros com Miopatia de Central Core (CCD) In: Quarto Encontro da Sociedade Brasileira de Investigação Neurológica, 2004, Curitiba.

O Dendrito, 2004. v.10. p.31 - 32

Apresentação de trabalho e palestra

1. **KOSSUGUE, P. M.**, Forni, M. F., LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.

DIFFERENTIATION OF MURINE EMBRYONIC STEM CELLS AND MURINE SKIN-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS INTO INSULIN-PRODUCING CELLS, 2012.

(Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. **KOSSUGUE, P. M.**, GRAZIOLI, G., LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.

Embryonic stem cell (ESC) differentiation into beta-like cells: role of Purkinje Cell Protein 4 (PCP4), 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

3. **KOSSUGUE, P. M.**, GRAZIOLI, G., LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.

EMBRYONIC STEM CELLS (ESCs) DIFFERENTIATION INTO INSULIN-PRODUCING β -LIKE CELLS: ROLE OF PURKINJE CELL PROTEIN 4 (PCP4), 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

4. **KOSSUGUE, P. M.**, LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.

Expression of genes related to stem cell differentiation into beta-like cells, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

5. **KOSSUGUE, P. M.**, FORTUNA, V., LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.

Expression of genes related to stem cells differentiation into beta-like cells, 2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

6. **KOSSUGUE, P. M.**, LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.

Differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

7. **KOSSUGUE, P. M.**, FORTUNA, V., LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.

Expression of genes related to differentiation of stem cells into beta-like cells, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

8. GABANYI, I., LOJUDICE, F., **KOSSUGUE, P. M.**, REBELATO, E., DEMASI, M., SOGAYAR, M. C.

USO DA PROTEÍNA VP22 COMO FERRAMENTA PARA INTERNALIZAR PROTEÍNAS EM

CÉLULAS TRONCO VISANDO SUA DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA, 2011. (Outra,Apresentação de Trabalho)

9. GABANYI, I., **KOSSUGUE, P. M.**, LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.
VP22.Pax4 transduction into murine embryonic stem cells enhances their differentiation into insulin producing cells, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

10. **KOSSUGUE, P. M.**, GABANYI, I., LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.
Insulin-producing cell differentiation by Pax4 and endoderm inducers, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

11. SOGAYAR, M. C., CARREIRA, A. C., MARES-GUIA, T. R., Labriola, L., LOJUDICE, F., CAMPOS-LISBOA, A. C., BUSTOS-VALENZUELA, J. C., Forni, M. F., HALCSIK, E., Campanha-Rodrigues, A. L., TERRA, L. F., **KOSSUGUE, P. M.**, Mantovani, M., GABANYI, I., AOKI, M., Mourão, R. F., GRAZIOLI, G., POLIZEL, L. S., Higa, P. M., ANTONINI, G. M. A., ZATTAR, F. S., OLIVEIRA, T. C., GRANJEIRO, J. M.
Stem cell translational research at the Cell and Molecular Therapy Center (NUCEL) aiming at new tools for Regenerative Medicine., 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

12. GABANYI, I., **KOSSUGUE, P. M.**, LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.
VP22.Pax4 transduction into murine embryonic stem cells enhances their differentiation into insulin producing cells, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

13. **KOSSUGUE, P. M.**, Haga, R. B., Forni, M. F., LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.
Factors secreted during mESCs differentiation into insulin-producing cells positively influence mS-MSCs differentiation, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

14. Higa, P. M., Haga, R. B., **KOSSUGUE, P. M.**, LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.
In vitro and in vivo osteogenic differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells (hDPSC), 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

15. Moreira, E. O., **KOSSUGUE, P. M.**, SOGAYAR, M. C., Goldberg, A. C.
Serum from hepatectomized rats may contribute to hepatocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

16. GABANYI, I., **KOSSUGUE, P. M.**, LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.
VP22.Pax4 transduction into stem cells enhances differentiation into insulin producing cells, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

17. **KOSSUGUE, P. M.**, LOJUDICE, F., SOGAYAR, M. C.
Comparison of SHED and hDPSC: are they the same cell?, 2008. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

18. Mantovani, M., MARES-GUIA, T. R., Labriola, L., LOJUDICE, F., Silva-Valenzuela, M.G., **KOSSUGUE, P. M.**, Campanha-Rodrigues, A. L., Mourão, R. F., Oliveira, E. M., Noronha, I. L., Franco, D., Genzini, T., Crescentini, F., Mota, L. T., Pilotto, G., Letrinta, R., Eliaschewitz, F. G., Garay, H. M., SOGAYAR, M. C.
Pancreatic islet transplantation as an alternative treatment for type 1 Diabetes Mellitus: role of NUCEL - Cell and Molecular Therapy Center, 2008. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

19. **KOSSUGUE, P. M.**, MUNIZ, V. P., Pavanello, R. C. M., Zatz, M., Silva, H. C., Gurgel-Giannetti, J., Paim, J. F. O., VAINZOF, M.
Mutações na região terminal do gene RYR1 e padrão de herança autossômica recessiva em pacientes brasileiros com Miopatia de Central Core (CCD), 2005. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

20. **KOSSUGUE, P. M.**, MUNIZ, V. P., Pavanello, R. C. M., Silva, H. C., Gurgel-Giannetti, J., Paim, J. F. O., Zatz, M., VAINZOF, M.
Triagem de mutações na região C-terminal do gene RYR1 identifica alta frequência de

formas autossômicas recessivas de Miopatia de Central Core (CCD) no Brasil, 2005. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

21. **KOSSUGUE, P. M.**, MUNIZ, V. P., Zatz, M., Silva, H. C., VAINZOF, M.
Mutações na região terminal de gene RYR1 são frequentes em pacientes brasileiros com Miopatia de Central Core (CCD), 2004. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. CARREIRA, A. C., LOJUDICE, F., AOKI, M., MOLINA, E., Mantovani, M., LIMA, M., WAILEMANN, R., TERRA, L. F., SODRE, F., **KOSSUGUE, P. M.**, Mourão, R. F., NOGUEIRA, R., SOGAYAR, M. C.

Workshop/Curso Prático: A Caminho da Biotecnologia, 2010. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. CARREIRA, A. C., DEMASI, M., COELHO, T. M., GROSS, G., LIMA, M., Mourão, R. F., LOBBA, A., Forni, M. F., Mantovani, M., TERRA, L. F., **KOSSUGUE, P. M.**, LOJUDICE, F., HALCSIK, E., SOGAYAR, M. C.

Curso/Workshop Biologia Molecular da Transformação Maligna, 2009. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

3. **KOSSUGUE, P. M.**

Diferenciação de Células Tronco em células produtoras de insulina: Terapia para Diabetes Mellitus Tipo 1, 2008. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

