



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



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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS ANGIOGÊNICAS DAS  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE LIPOASPIRADO NO  
TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

**BRYSA MARIANA DIAS SILVEIRA**

**SALVADOR-BA**

**2016**

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

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

**BRYSA MARIANA DIAS SILVEIRA**

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS ANGIOGÊNICAS DAS  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE LIPOASPIRADO NO  
TRANSPLANTE DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

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

**Orientador: Prof. Dr. Vitor Antônio Fortuna**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Labriola**

**SALVADOR-BA**

**2016**

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

S 587

Silveira, Brysa Mariana Dias  
Estudo das características angiogênicas das células tronco mesenquimais de lipoaspirado no transplante de ilhotas pancreáticas / Brysa Mariana Dias Silveira. -- Salvador, 2016.  
95 f. : il

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

1. Células tronco mesenquimais. 2. Angiogênese.  
3. Ilhotas pancreáticas. I. Fortuna, Vitor Antonio.  
II. Labriola, Letícia. III. Título.

CDU: 602.9

**BRYSA MARIANA DIAS SILVEIRA**

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS ANGIOGÊNICAS DAS CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS DE LIPOASPIRADO NO TRANSPLANTE DE ILHOTAS  
PANCREÁTICAS**

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

Salvador, 02 de setembro de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**



---

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

(Presidente)



---

Profa. Dra. Maria Isabel Doria Rossi (UFRJ)



---

Prof. Dr. Ricardo David Couto (UFBA)

Prepara-se o cavalo para o dia da batalha,  
mas o Senhor é que dá a vitória.

Provérbios 21:31

Dedico este trabalho aos meus pais, José Silveira e Mara Gleide Silveira, meus maiores exemplos de amor e perseverança.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, meu porto seguro e fortaleza, a Ele dedico todas as minhas vitórias.

Aos meus pais, Mara Gleide e José Silveira, por todo amor, paciência e atenção dedicados a mim. Sem dúvida são meus maiores exemplos de amor, caráter e fé.

À minha família e meus amigos, pelo carinho, paciência e inúmeros aprendizados que levarei para o resto da vida.

Ao meu orientador, prof. Dr. Vitor Fortuna, pela dedicação, paciência, conhecimento compartilhado. Melhor exemplo no âmbito acadêmico e científico.

Aos meus irmãos de laboratório, Tiago Ribeiro, Mércia Meira, Railane Souza, Carol Limoeiro e Ângelo, por inundarem meus dias com muito amor e cumplicidade. Melhor grupo!

Ao meu amigo e companheiro de trabalho, Tiago Ribeiro, pela cumplicidade, carinho e força.

À Dona Chica, seu Mario, Zé, Lis, Lu, seu Manoel, Tadeu, Ceiça, Yoná e Marquinhos por toda ajuda, resenhas e almoços repletos de alegria.

Ao Dr. Valber, por contribuir para a realização deste trabalho, disponibilizando as amostras de lipoaspirado.

Ao grupo labimuno, prof. Dr. Roberto Meyer, prof. Dra. Songeli, prof. Marcos, Rogério Reis, Ramon, Mariana, Eula, Samanta, Zunara e Evelin, pela amizade e carinho diário.

Ao grupo NUCEL, prof. Dr. Mari Sogayar, Dr. Ana Carreira e Dr. Marina Trombeta pela recepção calorosa, atenção e conhecimentos adquiridos durante meu período em São Paulo.

À minha co-orientadora prof. Dra. Letícia Labriola, por me abrir as portas de seu laboratório e pelo conhecimento compartilhado.

À coordenadora do curso, prof. Dra. Luzimar, por toda a pro-atividade, empenho e dedicação, fazendo com que o programa PMBqBM seja cada vez mais reconhecido.

Aos meus colegas do PMBqBM pela convivência, companheirismo e por todos as vivências incríveis que passamos. Turma igual não haverá!

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

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

O transplante de ilhotas pancreáticas é uma alternativa promissora no tratamento do Diabetes Tipo 1. Entretanto, após o isolamento há perda de uma massa considerável da amostra, prejudicando o sucesso do transplante. O co-cultivo de células tronco mesenquimais, com ilhotas pancreáticas contribui para a melhoria da qualidade do enxerto. O objetivo do trabalho foi a avaliação *in vitro* do potencial angiogênico do meio condicionado (MC) de células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-AD), por meio da revascularização e aumento da viabilidade das ilhotas pancreáticas. As células obtidas de 8 amostras de lipoaspirado foram caracterizadas (citometria de fluxo) e testadas quanto ao potencial multilinhagem. Para avaliação do potencial angiogênico, coletou-se MC em normóxia e hipóxia. Utilizou-se modelo com HUVEC para ensaio de migração e proliferação celular e ilhotas de ratos para análise da viabilidade intra ilhota. Análise proteômica foi realizada para avaliação da qualidade do MC. Dados obtidos demonstraram que HUVEC cultivadas na presença dos MC apresentaram aumento da capacidade proliferativa, migratória e redução do índice de apoptose. O MC em normóxia demonstrou maior capacidade angiogênica ( $p < 0.001$ ) e proliferativa ( $p < 0.05$ ) comparado ao MC em hipóxia. Ambos os MC estimularam a migração celular ( $p < 0.01$ ) e induziram a expressão da proteína Akt fosforilada em HUVEC. A presença de fatores de crescimento nos MC deu suporte aos efeitos observados no estudo. Desta forma, pode-se concluir que os MC de CTM-AD apresentam grande potencial para manutenção da integridade de ilhotas pancreáticas recém isoladas, devido aos seus efeitos protetor e angiogênico.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais, angiogênese e ilhotas pancreáticas;

## ABSTRACT

The islet transplantation is a promising alternative in the treatment of Diabetes Type 1. Nevertheless, after isolation there is loss of a part sample, hurting transplant success. Co-cultivation of mesenchymal stem cells with pancreatic islets contributes to improving the quality of the graft. The objective of this study was to evaluate in vitro angiogenic potential CM from MSC-AT through revascularisation and increase the viability of pancreatic islets. The cells obtained from 8 lipoaspirate samples were characterized (flow cytometry) and tested for multilineage potential. To evaluate the angiogenic potential, was collected CMs in normoxia and hypoxia. HUVEC model were used to migration and proliferation cell assay and rat islets for analysis intra islet viability. Proteomic analysis was performed to evaluate the CM quality. Results obtained showed that HUVEC cultured with CMs exhibit increased proliferative, migratory capacity and reduced apoptosis index. CM in normoxia showed greater angiogenic capacity ( $p < 0.001$ ) and proliferative ( $p < 0.05$ ) compared to the CM in hypoxia. Both CM stimulated cell migration ( $p < 0.01$ ) and induced expression of the phosphorylated Akt protein on HUVEC. The presence of growth factors in CM gave support to the effects seen in this study. Thus, one can conclude that MSC-AT CM have great potential for maintaining the integrity of freshly isolated pancreatic islets due to its protective and angiogenic effects.

Keywords: mesenchymal stem cells, angiogenesis and pancreatic islets

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Akt</b>	do inglês, <i>Protein Kinase B</i>
<b>ALK5</b>	do inglês, <i>TGF beta repector 1 signaling</i>
<b>Ang1</b>	do inglês, Angiopoietin 1
<b>ASC</b>	do inglês, Adipose-derived stromal/stem cells
<b>Bigh3</b>	do inglês, Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Protein ig-h3
<b>BDNF</b>	do inglês, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BrdU</b>	do inglês, <i>5-Bromo-2-Deoxyuridine</i>
<b>BSA</b>	do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>c-DNA</b>	do inglês, <i>complementary Deoxyribonucleic acid</i>
<b>CCR5</b>	do inglês, <i>chemokine receptor type 5</i>
<b>CD14</b>	do inglês, <i>cluster of differentiation 14</i>
<b>CD29</b>	do inglês, <i>Integrin beta-1</i>
<b>CD34</b>	Antígeno de célula progenitora hematopoiética
<b>CD45</b>	do inglês, <i>lymphocyte common antigen</i>
<b>CD73</b>	do inglês, <i>ecto-5'-nucleotidase</i>
<b>CD90</b>	do inglês, <i>cluster of differentiation 90</i>
<b>CD105</b>	do inglês, <i>Endoglin</i>
<b>CD132</b>	do inglês, <i>interleukin 2 receptor subunit gamma</i>
<b>CD271</b>	do inglês, <i>low-affinity nerve growth fator receptor</i>
<b>CFU-F</b>	do inglês, <i>Colony-Forming Unit-Fibroblast</i>
<b>CM</b>	do inglês, <i>Conditioned medium</i>
<b>CMF</b>	do inglês, <i>calcium and magnesium free</i>
<b>Col4</b>	Colágeno tipo 4
<b>CTM</b>	Células Tronco Mesenquimais
<b>CTM-AD</b>	Células Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo
<b>CXC3</b>	do inglês, <i>Chemokine delta</i>
<b>CXCL6</b>	do inglês, <i>Chemokine ligand 6</i>
<b>DAPI</b>	do inglês, <i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>

<b>DCs</b>	Células Dendríticas
<b>DMEM</b>	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium Glucose</i>
<b>DNA</b>	do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DPPIV</b>	Proteína complexante de adenosina desaminase 2
<b>DTH</b>	Hipersensibilidade Tipo Tardia
<b>DT1</b>	Diabetes Tipo 1
<b>dUTP</b>	desoxiuridinanucleotídeo trifosfato
<b>EGF</b>	do inglês, <i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>EGM-2</b>	do inglês, <i>Endothelial Cell Growth Medium</i>
<b>ERK</b>	do inglês, Extracellular Signal – Regulated Kinases
<b>FDA</b>	Diacetato de fluoresceína
<b>FGF 1/7</b>	do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor 1 e 7</i>
<b>FLT1</b>	do inglês, <i>Fms Related Tyrosine Kinase 1</i>
<b>GABA</b>	do inglês, gamma- Aminobutyric acid
<b>GAPDH</b>	do inglês, <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>
<b>GD2</b>	do inglês, <i>Disialoganglioside 1</i>
<b>GM-CSF</b>	do inglês, <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
<b>GDNF</b>	do inglês, <i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
<b>GLUT4</b>	Transportador de glicose 4
<b>HGF</b>	do inglês, <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
<b>HIF</b>	do inglês, <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
<b>HLA-DR</b>	do inglês, <i>Human Leukocyte Antigen-antigen D Related</i>
<b>HPRT</b>	do inglês, Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase
<b>HUVEC</b>	do inglês, <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
<b>IBMX</b>	do inglês, <i>3-isobutyl-1-methyl-xanthine</i>
<b>IDO</b>	do inglês, <i>Indoleamine</i>
<b>ICAM-1</b>	do inglês, <i>Intercelular adhesion molecule 1</i>

<b>IGF</b>	do inglês, <i>Insuline-like Growth Factor</i>
<b>IL-1</b>	do inglês, <i>Interleukin-1</i>
<b>IL-6</b>	do inglês, <i>Interleukin-6</i>
<b>IL-10</b>	do inglês, <i>Interleukin-10</i>
<b>KCL</b>	Cloreto de Potássio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato Monopotássico
<b>KDR</b>	do inglês, <i>Kinase Insert Domain Protein</i>
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MAPK</b>	do inglês, <i>Mitongen- Activated Protein Kinase</i>
<b>MCAM</b>	do inglês, <i>Melanoma Cell Adhesion Molecule</i>
<b>MC</b>	Meio Condicionado
<b>MCH</b>	Meio Condicionado de Hipóxia
<b>MCN</b>	Meio Condicionado de Normóxia
<b>MCP-1</b>	do inglês, <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MMP</b>	do inglês, <i>Matrix metalloproteinases</i>
<b>MSC-AT</b>	do inglês, <i>Mesenchymal stem cells from adipose tissue</i>
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>NFκβ</b>	do inglês, <i>Factor Nuclear Kappa Beta</i>
<b>NG2</b>	do inglês, <i>NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan</i>
<b>NRG1</b>	do inglês, <i>Neuregulin 1</i>
<b>NUCEL</b>	Núcleo de Terapia Celular e Molecular
<b>Nk44/ Nk30/ Nk62D</b>	do inglês, <i>Natural killer Cels</i>
<b>PAF</b>	Paraformaldeído
<b>p-AkT</b>	do inglês, <i>Phospho Akt</i>
<b>PBS</b>	do inglês, <i>Phosphate Buffer Solution</i>
<b>PCOLCE</b>	do inglês, <i>Procollagen C-endopeptidase enhancer 1</i>

<b>PDGFR- beta</b>	do inglês, <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor beta</i>
<b>PDK1</b>	do inglês, <i>Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase 1</i>
<b>PF4</b>	do inglês, <i>Platelet Factor 4</i>
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E
<b>PI</b>	Iodeto de Propídio
<b>PPAR</b>	do inglês, <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
<b>PS</b>	Penicilina
<b>PTX3</b>	do inglês, <i>Pentraxin 3</i>
<b>PVDF</b>	do inglês, <i>Polyvinylidene fluoride</i>
<b>qRT-PCR</b>	do inglês, <i>Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RNA</b>	do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>RPMI</b>	do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SDS</b>	do inglês, <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SDF1</b>	do inglês, <i>Stromal Derived Factor-1</i>
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SPARC</b>	do inglês, <i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein Precursor</i>
<b>SSEA</b>	Antígeno embrionário específico do estágio 1
<b>Stro-1</b>	Marcador de células tronco mesenquimais
<b>TdT</b>	Terminal desoxinucleotidil-transferase
<b>THBS</b>	do inglês, <i>Trombospondin</i>
<b>TGF-beta</b>	do inglês, <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
<b>TIMP</b>	do inglês, <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
<b>TNF</b>	do inglês, <i>Tumor necrosis fator</i>
<b>TUNEL</b>	do ingles, <i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin- dUTP Nick End Labeling</i>

<b>TRITON</b>	Polietileno glicol 4-tert-octilfenol éter
<b>TWEEN</b>	Polioxietileno-20-sorbitan monolaureato
<b>uPA</b>	do inglês, <i>Urokinase-Type-Plasminogen-Activator</i>
<b>VCAM-1</b>	do inglês, <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
<b>VEGF</b>	do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>VWF</b>	do inglês, <i>von Willebrand Factor</i>
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	do inglês, <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
<b><math>\mu</math>g</b>	Micrograma
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrometro
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Incidência da Diabetes no Brasil e no mundo. ....	20
Figura 2: Atividade imunomodulatória das CTM. ....	25
Figura 3: Mecanismo de sinalização celular em hipóxia. ....	29
Figura 4: Etapas do isolamento da fração vascular estromal.....	37
Figura 5: Representação ilustrativa das etapas do ensaio de BrdU. ....	44
Figura 6: .Imagem ilustrativa do ensaio de tubulogênese. ....	45
Figura 7: Imagem ilustrativa das etapas do ensaio de TUNEL. ....	46
Figura 8:Fotomicrografia de SVF e monocamada de CTM.....	56
Figura 9: Expressão de marcadores de superfície celular característicos de CTM-AD se manteve similar na segunda e sexta passagem.....	60
Figura 10: Potencial de diferenciação multilinhagem das CTM-AD. ....	61
Figura 11: Imunofluorescência das proteínas Col IV, $\alpha$ -SMA, PDGFR $\beta$ e NG2. ....	62
Figura 12.CTM-AD submetidas às condições de normóxia e hipóxia marcadas positivamente para a calceína.....	63
Figura 13. Fotomicrografia de HUVEC por contraste de fase e marcação para CD31.....	64
Figura 14.Figura ilustrativa do ensaio de migração utilizando HUVEC.....	65
Figura 15. Ensaio de incorporação de BrdU em HUVEC.....	66
Figura 16.MC de CTM-AD inibiram a apoptose das células endoteliais.....	68
Figura 17.Imagens ilustrativas do ensaio de tubulogênese.....	69
Figura 18.Níveis de expressão das proteínas Akt e p-Akt em meios condicionados de CTM-AD.....	70
Figura 19. Detecção de fatores pro e anti- angiogênicos em meio condicionado de normóxia.....	73
Figura 20. Ilhotas pancreáticas isoladas de ratos.....	74
Figura 21. Imagens representativas de ilhotas pancreáticas cultivadas em MCN, MCH	

e controles.....	76
Figura 22. Imunofluorescência para marcação de insulina (vermelho), CD31 (verde) e DAPI (azul) em ilhotas pancreáticas murinas.....	78
Gráfico 1. CTM-AD exibiu elevada capacidade de expansão em fase exponencial ....	57
Gráfico 2. Células isoladas apresentaram marcadores de superfície celular característicos de CTM-AD .....	59
Gráfico 3. Avaliação da capacidade migratória das HUVEC expostas aos MC de hipóxia e normóxia. ....	65
Gráfico 4.Representação gráfica do ensaio de incorporação de BrdU em HUVEC.....	67
Gráfico 5. Meio condicionado de CTM-AD em normóxia apresentou maior potencial angiogênico em modelo de microesferas.....	69
Gráfico 6. Expressão de transcritos em CTM-AD normóxia e hipóxia.....	72
Gráfico 7.Quantificação de fatores pró e anti angiogênicos em meio condicionado de normóxia.....	74
Gráfico 8.Manutenção da viabilidade celular das ilhotas após cultivo com MCN e MCH.....	77
Gráfico 9. Representação gráfica da marcação para insulina e CD31.....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: . Fatores secretados pelas CTM.. .....	27
Tabela 2: Anticorpos utilizados na caracterização molecular das CTM isoladas.....	41
Tabela 3. Lista de primers utilizados .....	49
Tabela 4,5,6. Características dos ratos Wistar utilizados no isolamento de ilhotas pancreáticas.....	51
Tabela 7. Lista dos anticorpos utilizados para marcação de células produtoras de insulina e endoteliais intra ilhotas.....	53
Tabela 8. Dados cadastrais das amostras biológicas utilizadas.....	54

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
1.1.	Diabetes tipo 1: fisiopatologia e incidência.....	18
1.1.1	Transplante de ilhotas pancreáticas humanas no tratamento do diabetes e alternativas para melhorar os resultados. ....	20
1.2	Terapia celular utilizando Células Tronco Mesenquimais .....	22
1.2.1	Propriedades terapêuticas do Meio condicionado de CTM .....	25
1.2.2	Atividade trófica das CTM mediante hipóxia .....	28
1.2.3	As Células Tronco Mesenquimais como ferramenta para a revascularização de ilhotas pancreáticas recém isoladas .....	30
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS .....	35
4	METODOLOGIA.....	36
4.1	Coleta do material biológico, transporte e aspectos éticos.....	36
4.2	Isolamento das Células Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo .....	36
4.3	Isolamento das Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (HUVEC)..	37
4.4	Curva de crescimento populacional, cálculo do tempo de dobramento e Índice de dobramento populacional cumulativo das CTM .....	38
4.5	Caracterização Imunofenotípica por citometria de fluxo.....	39
4.6	Ensaio de diferenciação em multilinhagem .....	39
4.7	Imunohistoquímica para detecção de proteínas membranares e de citoesqueleto .....	40
4.8	Preparo de Meio Condicionado e pré-condicionamento das CTM-AD.....	41
4.9	Ensaio de coloração com calceína-AM .....	42
4.10	Quantificação de proteínas – Método de Lowrymodificado .....	42
4.11	Análise da fosfatase alcalina .....	43
4.12	Ensaio <i>in vitro</i> de migração celular coletiva (wound-healing assay).....	43
4.13	Ensaio <i>in vitro</i> de detecção de BrdU.....	43
4.14	Ensaio <i>in vitro</i> de tubulogênese .....	44
4.15	Ensaio de detecção de TUNEL .....	45
4.16	Detecção de p-AkT e AKT por Western Blot.....	46
4.17	qRT-PCR .....	48
4.18	Perfil proteômico do meio condicionado: Identificação de fatores secretados pelas CTM	50

4.19	Isolamento de ilhotas pancreáticas ratos.....	50
4.20	Cultura das ilhotas pancreáticas recém isoladas e sua manutenção.....	52
4.21	Ensaio <i>in vitro</i> de coloração live/dead de ilhotas pancreáticas.....	52
4.22	Avaliação estatística. ....	53
5	RESULTADOS.....	54
5.1	Dados epidemiológicos dos pacientes e obtenção da Fração Vascular estromal .....	54
5.2	Isolamento e expansão das células tronco mesenquimais de tecido adiposo.....	55
5.3	Avaliação da cinética de expansão celular.....	56
5.4	Imunofenotipagem celular e diferenciação osteogênica e adipogênica.....	57
5.5	Caracterização molecular por imunohistoquímica.....	61
5.6	Condicionamento nas condições de normóxia e hipóxia .....	62
5.7	Isolamento de células endoteliais de cordão umbilical (HUVEC) e imunofluorescência para CD31 .....	63
5.8	Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade migratória das HUVEC( <i>scratch wound assay</i> ).....	64
5.9	Avaliação <i>in vitro</i> da proliferação celular de HUVEC .....	65
5.10	Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade das HUVEC.....	67
5.11	Avaliação <i>in vitro</i> do potencial angiogênico em HUVEC .....	68
5.12	Western Blot.....	69
5.13	Caracterização molecular das CTM-AD.....	71
5.14	Perfil proteômico do meio condicionado de normóxia .....	72
5.15	Isolamento de ilhotas pancreáticas de rato .....	74
5.16	Ensaio <i>in vitro</i> de viabilidade das ilhotas .....	75
5.17	Avaliação da expressão de insulina e morfologia de células endoteliais em ilhotas na presença de meio condicionado .....	77
6	DISCUSSÃO .....	80
7	CONCLUSÃO .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Diabetes tipo 1: fisiopatologia e incidência

O diabetes tipo 1 (DT1) é uma doença de origem autoimune ou idiopática caracterizada pela perda progressiva das células beta - pancreáticas, o que resulta na interrupção da produção de insulina, gerando um desequilíbrio metabólico grave (BRUNI et al, 2014). A destruição das células produtoras de insulina pode ser desencadeada por diversos fatores, alguns deles: (1) lesão tecidual decorrente a Hipersensibilidade do Tipo Tardio (DTH), mediada por células  $T_H1$   $CD4^+$  reativas a antígenos presentes nas ilhotas pancreáticas; (2) auto anticorpos contra células beta; (3) estimulação local de citocinas (TNF e IL-1 beta), resultando em lesão tecidual e lise mediada por células T citotóxicas (ABBAS, 2015). Desta forma, a degradação das células beta promove uma ineficiência na captação da glicose sanguínea – o hormônio insulina produzido pelas células beta é necessário para o deslocamento dos transportadores de glicose (GLUT4) para a superfície da membrana plasmática do tecido adiposo e para o músculo (NELSON, 2009). Indivíduos acometidos podem apresentar marcadores para auto-anticorpos de insulina, células beta pancreáticas e/ou glutamato descarboxilase (enzima que catalisa a descarboxilação do glutamato em ácido gama-aminobutírico- GABA) (American Diabetes Association, 2014).

Do ponto de vista genético, múltiplos genes estão envolvidos com o DT1, contudo alterações na região gênica do HLA (Antígeno Humano Leucocitário) exercem maiores influências de desenvolvimento da doença. Aproximadamente 50% dos pacientes caucasianos são heterozigotos para HLA-DR3/DR4. Maior susceptibilidade ao DT1 estaria relacionado aos alelos DQ2 e DQ8, devido a um desequilíbrio de ligação com DR3 e DR4 (região do resíduo 57) (ADA, 2016/ ABBAS, 2009).

Em fases iniciais, alguns pacientes podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença. Entretanto, se não tratado, o DT1 pode causar complicações microvasculares e macrovasculares (DIB et al, 2008). As

complicações macrovasculares estão relacionadas a quadros de hiperglicemia crônica e geram doenças cardiovasculares e cerebrais, gerando danos relacionados a artérias que irrigam o coração, cérebro e membros inferiores (ex: infarto do miocárdio, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral) (American Diabetes Association, 2014). As complicações microvasculares estão associadas a alterações em vasos sanguíneos pequenos que resultam em problemas específicos nos nervos periféricos, retina e glomérulo renal. Problemas neurais são os mais comuns em pacientes com Diabetes, ocasionando debilitações, amputação e ulcerações neuropáticas. A retinopatia diabética é a causa mais frequente de cegueira em jovens adultos e indivíduos com DT1 apresentam maiores riscos de desenvolvimento. Assim como a nefropatia diabética é a principal causa de falência renal do mundo, sendo responsável pelos maiores índices de morbidade e mortalidade em pacientes com DT1 (DAVEY, 2014).

DT1 corresponde a cerca de 5 – 10% dos casos envolvidos com a síndrome do diabetes, apresentando maior prevalência em crianças e adolescentes, com início abrupto acompanhado de severos sintomas que levam o paciente à dependência diária de insulina. Alguns casos podem surgir no início da idade adulta (15 – 30%), tendendo a ser de desenvolvimento mais lento, com um quadro clínico de células beta funcionais suficientes para prevenção de complicações severas como cetoacidose diabética (NELSON, 2009). O crescimento vertiginoso do número de pacientes diabéticos no mundo e, em particular no Brasil, tem levado a se considerar o diabetes como um grave problema de Saúde Pública. Estima-se que o número de pacientes diabéticos no mundo seja atualmente de cerca de 422 milhões, com expectativa de atingir o dobro de casos em 2025, a maioria previstos para países em desenvolvimento (<http://www.who.int>). O Brasil é o quarto país com maior taxa de diabéticos no mundo, ficando atrás da China, Índia e Estados Unidos. Foram diagnosticados, no ano de 2013, 13,4 milhões de pacientes acometidos com a síndrome metabólica, dos quais em torno de 5% apresentaram o diabetes tipo 1. No entanto, existem estimativas de que este número poderá triplicar até o ano 2030 (figura 1) (Disponível em : <http://www.diabetes.org.br/>).

Como medida de tratamento, uma das formas de minimizar os danos da DT1 é a insulinoaterapia, contudo os episódios de oscilações dos níveis glicêmicos, custo elevado e desconforto durante a administração, torna este tratamento desvantajoso. Desta forma, por ser menos invasivo quando comparado ao transplante de pâncreas total, o transplante de ilhotas pancreáticas vem representando uma alternativa promissora no tratamento da DT1 (ELIASCHEWITZ et al, 2009).



**Figura 1. Incidência da Diabetes no Brasil e no Mundo.**

### **1.1.1 Transplante de ilhotas pancreáticas humanas no tratamento do diabetes e alternativas para melhorar os resultados.**

As ilhotas pancreáticas são pequenos órgãos localizados no interior do pâncreas, cruciais para a homeostase da glicose, representando 2% da massa pancreática (BALLIAN & BRUNICARDI, 2007), compostas por 5 tipos de células endócrinas: células  $\beta$  produtoras de insulina, células  $\alpha$  produtoras de glucagon, células  $\delta$  produtoras de somatostatina, células produtoras de polipeptídeo pancreático (PP) e células épsilon produtoras de grelina (CABRERA et al, 2005). Em humanos, 60% da população celular das ilhotas é composta por células  $\beta$ , 30% por células  $\alpha$ , 10% por células  $\delta$ , menos que 5% por células PP e apenas 1% de células épsilon (SCHARFMANN, et al, 2008).

Experimentos pioneiros realizados por Lacy e Kostianovsky (1967), através do isolamento de ilhotas metabolicamente ativas de roedores, foram cruciais para a introdução do transplante de ilhotas pancreáticas como uma estratégia de correção do quadro hiperglicêmico de pacientes acometidos com

DT1 (LACY & KOSTIANOVSKY, 1967). Na última década foram contabilizados mais de 750 transplantes de ilhotas em 30 diferentes centros internacionais, avanços científicos voltados para a sua otimização estão sendo decisivos para o sucesso dos enxertos (BRUNI et al, 2014). Sem dúvida, o transplante de ilhotas pancreáticas isoladas a partir de doadores cadavéricos constitui uma alternativa promissora para o tratamento do DT1, devido ao controle fisiológico da glicemia e melhoria da qualidade de vida destes pacientes (FIGLIUZZI et al, 2014). Contudo, apesar das expectativas geradas em torno do controle glicêmico, este método limita-se em razão da escassez de doadores e da perda de material após a retirada do órgão (GLEASON et al, 2000; KIDO et al, 2000). Sabe-se que, variáveis como a idade do doador, IMC, isolamento das ilhotas, armazenamento e técnica de cultivo são importantes para que se tenha um bom desempenho (BALAMURUGAN et al, 2014).

Estima-se que até 70% da massa de células  $\beta$ -transplantadas são destruídas no início do período pós-transplante (RYAN et al, 2005). A remoção enzimática das ilhotas da matriz pancreática durante o processo de isolamento rompe as conexões entre a vascularização das ilhotas e a circulação sistêmica. As células endoteliais presentes nas ilhotas contribuem significativamente para a sobrevivência e viabilidade do transplante, contudo, após o isolamento seu percentual é drasticamente reduzido, sendo este influenciado conforme o tempo de cultura. Devido aos danos causados - perda de vascularização, estresse oxidativo, escassez de nutrientes - durante o isolamento e posterior cultivo, a qualidade do enxerto é altamente comprometida (PARK et al, 2010). Fatores como: danos mecânicos, ativação da via ALK5 (relacionada com a inibição da proliferação de células endoteliais) e ausência de agentes tróficos são decisivos para a redução da funcionalidade das ilhotas e aumento da taxa de apoptose (KING et al, 2014).

Uma alternativa para contornar estas limitações encontradas pela perda da viabilidade do enxerto seria o cultivo das ilhotas recém isoladas em meios condicionados produzidos por células tronco mesenquimais (CTM), visando a manutenção das células endoteliais, regularização da vascularização e por sua vez melhora da integridade da amostra (BHANG et al, 2013). A escolha como fonte de CTM seria o tecido adiposo, por representar um excelente candidato para terapia celular, ao se enquadrar nos pré-requisitos: amostras são

facilmente acessíveis - pelo aumento desenfreado do número de cirurgias em clínicas de estética, seu isolamento é simples, CTM podem ser criopreservadas com perda mínima de potência e não ausência de reações adversas em transplantes autólogos ou alogênicos de CTM. Como ponto chave, o perfil secretório das células em questão possui um arsenal de fatores capazes de melhorar a sobrevivência e viabilidade de células vizinhas, induzir a angiogênese por meio da comunicação com células endoteliais e contribuir para a regeneração de tecidos (ONG & SHIGEKI, 2013). No entanto, até o momento, os benefícios do meio condicionado de CTM de tecido adiposo sobre a viabilidade de ilhotas pancreáticas e células endoteliais ainda não foram completamente investigados.

## **1.2 Terapia celular utilizando Células Tronco Mesenquimais**

A terapia celular é uma opção terapêutica cujo objetivo é a utilização de células visando a regeneração tecidual. Estudos desenvolvidos na década atual demonstram ser uma alternativa promissora para o tratamento de diversas condições patológicas. Dentre a enorme diversidade de células tronco descritas com potencial terapêutico, as células tronco adultas são a alternativa segura e com aplicação imediata. Atualmente, o foco das discussões científicas não se restringe à questão de que os ensaios clínicos de terapias celulares para a regeneração de tecidos devam ser prosseguidos, mas de que forma eles devem ser executados (MURRY et al, 2005). Neste contexto, o uso das células tronco estromais, sugeridas como mesenquimais (CTM), tem sido relevante para várias indicações terapêuticas.

As CTM são células imaturas localizadas em diferentes locais, como: sangue periférico, medula óssea, tecido adiposo, sangue menstrual, fígado, coração, pulmão e polpa dentária. *In vivo*, são caracterizadas como uma população quiescente situada em nichos perivasculares, coexistindo com pericitos e células endoteliais (CRISAN et al, 2012). *In vitro*, um conjunto de determinadas características são inerentes à identificação de CTM: estas células denotam capacidade de auto-renovação, aderência ao plástico, manutenção do estado indiferenciado, alta capacidade proliferativa, sendo

capazes de se diferenciar em três linhagens mesodermiais (adipogênica, condrogênica e osteogênica) e expõem um painel específico de marcadores de superfície (DOMINICI et al, 2006).

Quando expostas a condições de cultura, as CTM expressam alguns marcadores característicos – CD105, CD73, CD90, CD29 com negatividade para a presença de CD45, CD34, CD14, CD146, CD79a/CD19 e HLA-DR. Contudo, ainda não há um consenso sobre um único marcador específico capaz de ser utilizado para identificar estas células. Alguns marcadores como Stro-1, CD271, CD146, SSEA-4 e GD2 estão sendo sugeridos e devido a presença destes variar de acordo com a fonte, origem e as sub-populações das CTM, presume-se que cada tipo de CTM possua marcadores diferenciados (LV et al, 2014). Estudos especulam que as CTM não sejam originárias de fibroblastos e sim de células perivasculares – denominadas células murais ou pericitos (CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup> e CD146<sup>+</sup>). As células perivasculares se localizam ao redor dos vasos sanguíneos, possuindo capacidade de comunicação com as células endoteliais vizinhas, através da liberação de fatores tróficos, sendo responsáveis pela estabilização, migração e brotamento de novos vasos sanguíneos (WATT et al, 2013). Um exemplo são as CTM de tecido adiposo, que são raramente encontradas próximas a adipócitos, sendo mais observadas ao redor de estruturas vasculares que compõem a microvasculatura do tecido e em culturas iniciais, *in vitro*, apresentando positividade para o marcador CD34 (TRAKTUEV et al, 2008). Maumus e colaboradores (2011) ratificaram a presença destas CTM-AD por imunofluorescência e apesar de não terem detectado um marcador específico, relataram a coexistência destas células com pericitos e células endoteliais (ambos seriam progênies de CTM-AD).

Muito ainda há de ser esclarecido quanto a identidade exata *in vivo*. Contudo, sabe-se que as CTM são candidatas ideais para a medicina regenerativa e a escolha da fonte de origem é crucial para tratamentos futuros. Na prática, uma fonte ideal de CTM autólogas deve ser de fácil obtenção, gerar mínimo desconforto ao paciente, e ser capaz de produzir uma quantidade substancial de células. A hipoderme parece representar tal alternativa. O tecido adiposo tem sido estudado recentemente como uma excelente fonte de células-tronco, que assim como a medula óssea, supõe-se que apresente uma

origem mesenquimal (ONG & SHIGEKI, 2013). Após o isolamento deste tecido, a Fração Estromal Vascular (SVF) - composta por células endoteliais, macrófagos/monócitos, fibroblastos, pericitos, células hematopoiéticas e linfócitos, é obtida (BAER, 2014). A população de células mesenquimais, encontrada na SVF, são selecionadas através da sua capacidade de adesão ao plástico e proliferação, sendo denominadas do inglês *adipose-derived stem cells* ou ASCs. Estas células caracterizam-se pelo potencial de diferenciação *in vitro* em múltiplos tipos celulares, incluindo as linhagens osteogênica, condrogênica, adipogênica, miogênica e neurogênica (DOMINICI et al, 2006).

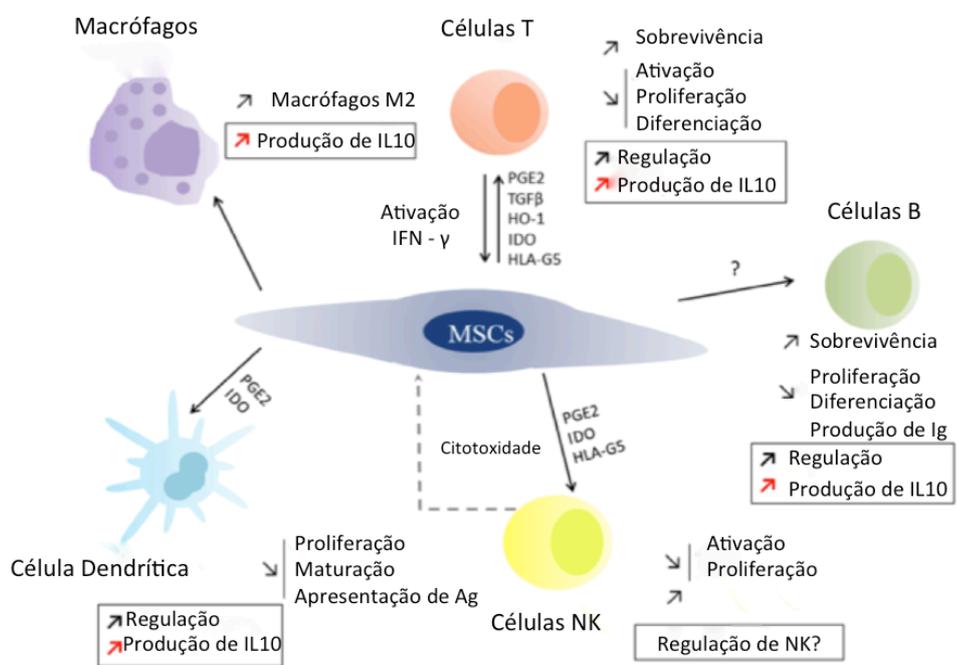
Além desta plasticidade, outras vantagens desta população celular em comparação com as células da medula óssea é a maior facilidade de obtenção, menor morbidade para o doador e extração de maior quantidade de células tronco mesenquimais em procedimento único (GIMBLE et al, 2007). Os principais locais de depósito de tecido adiposo branco (rico em CTM) são os subcutâneos (coxas, nádegas e abdômen) e os intra-abdominais viscerais. A coleta das células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-AD) pode ser realizada pelo método de lipoaspiração das regiões subcutâneas, sendo um processo minimamente invasivo (GIMBLE et al, 2007).

A análise comparativa de CTM de tecido adiposo e medula óssea demonstrou não haver diferença significativa quanto à morfologia, a taxa de sucesso de isolamento, frequência de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F), potencial de expansão, e o perfil fenotípico (KERN et al., 2006). Ambas as CTM possuem capacidades imunossupressoras, com potencial de ser utilizadas em transplantes halogênicos, reduzindo as reações de histoincompatibilidade. Um estudo recente, por exemplo, descreveu a utilização de CTM-AD para a resolução de um caso de doença do enxerto-versus- hospedeiro e toxicidade renal (FANG et al, 2007). Tanto as CTM de tecido adiposo quanto as de medula óssea demonstraram capacidade angiogênica no tecido isquêmico, no entanto o seu mecanismo permanece duvidoso.

### 1.2.1 Propriedades terapêuticas do Meio condicionado de CTM

Independente do mecanismo utilizado (parácrino, imunomodulatório, angiogênico, etc) acredita-se que as CTM apresentem efeitos benéficos para a terapia celular (LI et al, 2011). Pesquisas tem demonstrado que o meio condicionado (MC) de CTM possui citocinas, fatores de crescimento e moléculas bioativas responsáveis por efeitos de reparo e regeneração tecidual (REHMAN et al, 2004/ GU et al, 2014/ GUO et al, 2016).

Hoje, sabe-se que o potencial imunomodulatório não é algo constitutivo da CTM e sim induzido por um microambiente inflamatório. A presença de INF- $\gamma$  em combinação com uma citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  estimula a expressão de níveis elevados de fatores com capacidade imunossupressora, assim como promove a expressão de moléculas de superfície de adesão celular (CXCR3, CCR5, ICAM-1 e VCAM-1) e membros da família de integrinas (MA et al, 2014). Desta forma, a presença de mediadores (PGE2,IDO, TGF- $\beta$ , IL-10, HGF e IL6) no MC de CTM é responsável pelos seus efeitos imunomodulatórios (figura 2) (NAJAR et al 2016/ YOUSEFI et al, 2016/ FRANÇOIS et al, 2012).



**Figura 2. Atividade imunomodulatória das CTM**(adaptado de NAJAR et al, 2016).

Além das propriedades imunogênicas (OOI et al, 2014), os efeitos de CTM também vem sendo observados mediante modelos de indução da angiogênese e regeneração tecidual. Estudos relatam que o MC de CTM-AD é composto por fatores angiogênicos e anti-apoptóticos responsáveis pela manutenção da integridade de células alvo (STREM et al, 2005). Fatores como VEGF, HGF, Ang-1, bFGF, PDGF e MCP-1, envolvidos na regulação da angiogênese e MMP-2, MMP-9, TIMP-1, IGF, GM-CSF e TGF-beta, relacionados a prevenção da fibrose e apoptose também foram encontrados no MC (KONALA et al, 2016/ REHMAN et al, 2004).

Modelo envolvendo células endoteliais intra ilhota associaram concentrações significativas de HGF, TGF, VEGF-A e IL-6, presentes em sobrenadantes, ao aumento da revascularização tecidual e sobrevivência celular (PARK et al, 2010). Assim como a presença de fatores neurotróficos (BDNF, NGF e GDNF), em MC de CTM-AD, a efeitos antiapoptóticos em neurônios e retardamento da progressão da doença em modelo de Huntington (LEE et al, 2009).

Além destes fatores, pesquisas demonstram que o MC de CTM também é composto por exossomas, microvesículas lipídicas de origem endossomal que são liberadas mediante a fusão exocítica com membranas do plasma por vários tipos celulares, estando envolvidas na comunicação intercelular, na modulação da resposta imune, apresentação de antígeno e no transporte de conteúdos intracelulares: microRNA, proteínas e mRNA (AKYUREKLI et al, 2014). Desta forma, assim como as biomoléculas citadas (tabela 1), os exossomas atuariam na modificação da atividade celular pelo mecanismo de transferência epigenética (YEO et al, 2012).

Concluindo, a composição do MC de CTM é de grande relevância para o aumento do efeito protetor contra a senescência, indução da estabilidade genômica, promoção da viabilidade, motilidade e tropismo em células alvo (PHAM et al, 2016), tornando-o uma alternativa promissora para a terapia celular.

Biomoléculas presentes no MC de CTM		
<u>Sigla</u>	<u>Nome</u>	<u>Função</u>
<b>PDGE2</b>	do inglês <i>Prostaglandin E</i>	Imunossupressora
<b>IDO</b>	do inglês <i>Indoleamine</i>	Imunossupressora
<b>TGF-beta</b>	do inglês <i>transforming growth factor</i>	Imunossupressora
<b>IL-6</b>	do inglês <i>interleukin 6</i>	Anti-inflamatória e anti-apoptótica
<b>IL-10</b>	do inglês <i>Interleukin 10</i>	Anti-inflamatória
<b>VEGF</b>	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>	Angiogênese
<b>HGF</b>	do inglês <i>hepatocyte growth factor</i>	Angiogênese
<b>Ang-1</b>	do inglês <i>Angiopoietin 1</i>	Angiogênese
<b>bFGF</b>	do inglês <i>basic fibroblast growth factor</i>	Angiogênese
<b>PDGF</b>	do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>	Angiogênese
<b>MCP-1</b>	do inglês <i>monocyte chemoattractant protein</i>	Anti-fibrose
<b>MMP-2</b>	do inglês <i>metalloproteinase 2</i>	Migração celular
<b>MMP-9</b>	do inglês <i>metalloproteinase 9</i>	Migração celular
<b>TIMP-1</b>	do inglês <i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>	Anti-fibrose
<b>IGF</b>	do inglês <i>Insulin Growth factor</i>	Anti-apoptótica
<b>GM-CSF</b>	do inglês <i>granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor</i>	Anti-apoptótica
<b>BDNF</b>	do inglês <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	Neuroprotetora
<b>NGF</b>	do inglês <i>nerve growth factor</i>	Neuroprotetora
<b>GDNF</b>	do inglês <i>glial cell line-neurotrophic factor</i>	Neuroprotetora

**Tabela 1. Fatores secretados pelas CTM.**

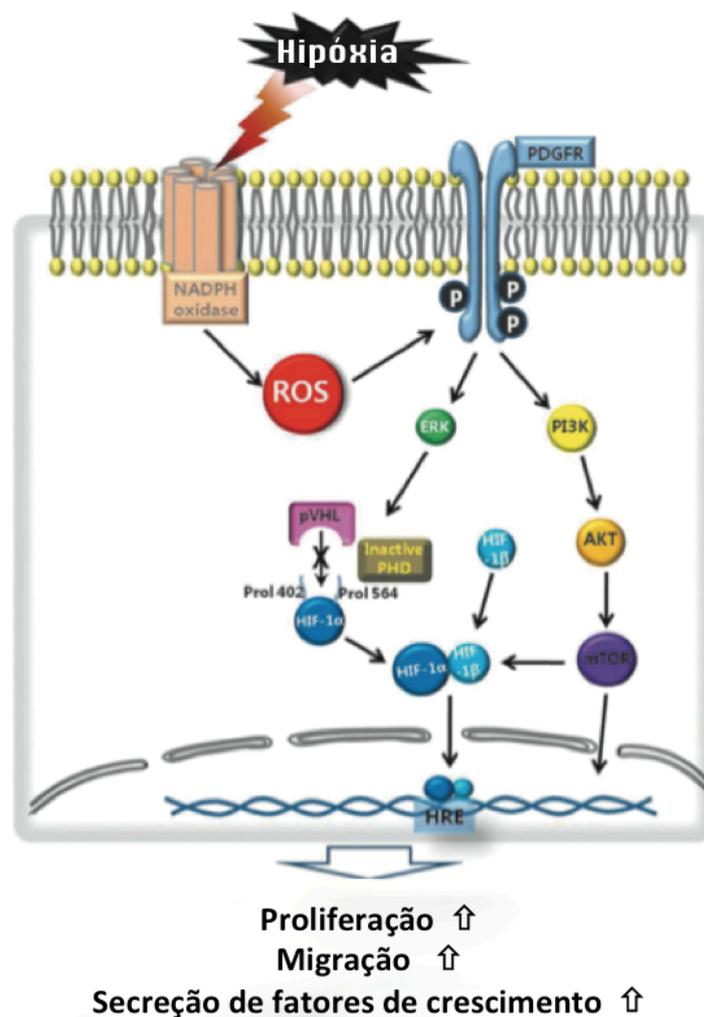
### 1.2.2 Atividade trófica das CTM mediante hipóxia

A capacidade de auto renovação e diferenciação das CTM são dependentes do microambiente que as cercam. A concentração de oxigênio varia de forma significativa nos tecidos do corpo humano, havendo elevados níveis pressóricos em órgãos com maior perfusão (KANG et al, 2014). Células tronco mesenquimais estão localizadas em nichos com baixa tensão de oxigênio (40-60mmHg), como consequência, variações na pressão de oxigênio ( $PO_2$ ) levam a alterações no seu fenótipo e em sua atividade parácrina (KIM & SUNG, 2012/ KIM et al, 2011).

Estudos sugerem que as CTM expostas a hipóxia aumentam a secreção de fatores, potencializando os efeitos do seu MC (KAKUDO et al, 2015/ YAMAMOTO et al, 2013) CTM, em geral, podem sofrer regulação através da ação de quimiocinas ou por condições de hipóxia, o que resulta no aumento da secreção de fatores angiogênicos e, por conseguinte, indução da síntese de novos vasos sanguíneos (BRONCKAERS et al, 2014). Em 2.5% de  $O_2$  há um maior consumo de glicose e produção de lactato, por glicólise anaeróbica. CTM cultivadas nesta condição reduzem o consumo de oxigênio, no intuito de manter a homeostase e se auto preservar, através do bloqueio da utilização do piruvato, no ciclo de Krebs pela enzima PDK1(piruvato desidrogenase) (EJTEHADIFAR et al, 2015). Desta forma, o pré condicionamento em hipóxia gera grandes efeitos na biologia celular, assim como em seu metabolismo (HAQUE et al, 2013).

Mudanças na expressão de metaloproteinases (MMP), como MMP-1 e MMP-3, microRNA e secreção de mediadores de crescimento são observados após indução à hipóxia (LIN et al, 2008). Diversos mecanismos estão envolvidos neste processo, dentre eles, um fator importante é o aumento da síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela família NOX. Em excesso, a síntese de EROs pode ocasionar o desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo, todavia, em baixos níveis é fundamental para o crescimento, migração, sobrevivência, senescência e diferenciação celular (BURAVKOVA et al, 2014). Em CTM submetidas à hipóxia, EROs atuam como segundo mensageiro para a transdução do sinal e expressão de genes como AKT e ERK (KIM et al, 2011).

A produção de EROs resulta na ativação de receptores tirosina-quinase em CTM, fosforilando o receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR-  $\beta$ ) (KIM et al, 2011). Como consequência da ativação das tirosinas-quinases, há o aumento da fosforilação das vias de sinalização PI3K/AKT/mTOR/ERK1/2. No mais, há inibição da degradação do fator indutor de hipóxia (HIF), aumentando os níveis citosólicos de HIF1- $\alpha$ , que se move para o núcleo e ativa a transcrição de genes envolvidos com a proliferação, migração, cicatrização e secreção de fatores de crescimento (KIM & SUNG, 2012) (figura 3).



**Figura 3: Mecanismo de sinalização celular em hipóxia** (Adaptado de KIM & SUNG, 2012).

### **1.2.3 As Células Tronco Mesenquimais como ferramenta para a revascularização de ilhotas pancreáticas recém isoladas**

Vários estudos descrevem a influência dos efeitos tróficos das CTM sobre as ilhotas pancreáticas, fatores detectados em seus meios condicionados (PARK et al, 2010/ FRANSSON et al, 2015/ DIETRICH et al, 2015/) – Angiopoietina 1, VEGF, HGF, EGF, PDGF, FGF, KGF e TGF- $\beta$  mostraram afetar diretamente as células endoteliais intra ilhotas, promovendo a manutenção da integridade, induzindo a migração e proliferação (MA et al. 2013). Ao contrário do que se imaginava, os efeitos gerais das CTM giram em torno de sua capacidade de transformar o microambiente do hospedeiro, ao invés de se transdiferenciar em diferentes linhagens mesodermiais. Os principais mecanismos básicos envolvidos são: imunomodulação (secreção de compostos bioativos capazes de inibir reações imunes e promover o reparo), síntese de fatores tróficos que induzam mecanismos angiogênicos e recrutamento de CTM endógenas (HUNG et al, 2007/ BRONCKAERS et al, 2014/ OOI et al, 2014).

Estudos recentes comprovam estes efeitos sobre a revascularização das ilhotas pancreáticas. Ao associarem as ilhotas pancreáticas de camundongo com o sobrenadante de CTM em um co-cultivo, Fuggle et al (2010) percebeu que houve um aumento da viabilidade celular da função excretora de insulina e migração das células endoteliais intra ilhota (aumentando a revascularização) devido à presença de HGF, IL-6, TGF- $\beta$  e VEGF-A (FUGGLE et al, 2010). Outra pesquisa experimental, utilizando camundongos diabéticos, relatou que os efeitos do contato direto de CTM com as ilhotas induziram o aumento do fator de crescimento VEGF quando comparadas às ilhotas cultivadas sozinhas, acarretando maior ganho de massa e função das células beta antes e após o transplante (RACKHAM et al, 2013). Por fim, uma pesquisa evidenciou a superexpressão de VEGF por CTM de medula óssea modificadas geneticamente, o que promoveu uma melhora na eficácia do transplante pelo aumento da sobrevivência e revascularização das ilhotas (MUNDRA & MAHATO, 2013).

#### **1.2.4 Mecanismos envolvidos na vascularização promovido pelas CTM**

O grande desafio encontrado atualmente, em terapias que envolvam engenharia de tecidos, é o estabelecimento de uma vascularização eficiente que garanta em longo prazo a sobrevivência e funcionalidade do tecido enxertado (LASCHKE & MENGER, 2012).

Duas possibilidades não excludentes justificam o papel das CTM visando o aumento da revascularização de ilhotas pancreáticas. A primeira alternativa considera que o co-cultivo de CTM com ilhotas pancreáticas aumentaria a viabilidade de células endoteliais presentes no tecido enxertado e assim aumentariam a angiogênese intra ilhota e as chances de recirculação nos microcapilares já presentes na ilhota transplantada (FRANSSON et al, 2015). A segunda alternativa sustenta que as CTM seriam capazes de secretar fatores que induziriam a atração e invasão de vasos sanguíneos do hospedeiro, garantindo a revascularização do tecido transplantado (NYQVIST et al, 2011).

Em prol da primeira alternativa, sabe-se que após o isolamento as ilhotas pancreáticas apresentam em sua anatomia células endoteliais e capilares sanguíneos que são capazes de formar vasos sanguíneos funcionais, contudo o número das células endoteliais reduz drasticamente com o passar dos dias (aproximadamente 95% após 4 dias) (NYQVIST et al, 2005). Estudos apontam que as células endoteliais intra ilhotas contribuem de forma positiva para o processo de revascularização das ilhotas pancreáticas recém isoladas, sendo cruciais para o sucesso do enxerto (KING et al, 2015). Com base nestes dados, uma terapia eficaz estaria relacionada à promoção da manutenção da viabilidade das células endoteliais e indução da revascularização das ilhotas pancreáticas posteriormente ao transplante.

Uma forma de interação celular presente durante o mecanismo de remodelamento microvascular ocorre entre os pericitos e as células endoteliais. (ARMULIK, GENOVÉ & BETSHOLTZ, 2011). Esta interação é mediada por várias moléculas como a angiopoietina -1 que é expressa por células mesenquimais perivasculares e age sobre o receptor Tie-2, presente nas células endoteliais, favorecendo o processo de estabilização dos vasos recém formados por meio do recrutamento de pericitos (GEEVARGHESE & HERMAN,

2014). Assim como o PDGF-B, expresso por células endoteliais, que é responsável pela migração e proliferação do receptor de PDGF-B dos pericitos e o VEGF um mitógeno endotelial que desempenha papel ativo na angiogênese e potencializa a sobrevivência e estabilidade de células endoteliais em microvasos (GEEVARGHESE & HERMAN, 2014).

A segunda alternativa baseia-se no mecanismo de inoculação, onde as ilhotas pancreáticas transplantadas sofrem revascularização através dos vasos sanguíneos do hospedeiro, que migram na direção das ilhotas do doador por meio da angiogênese (LASCHKE & MENGER, 2013). Fatores tróficos secretados por CTM seriam responsáveis por estimular o brotamento de vasos sanguíneos do hospedeiro e posterior inoculação (WITTIG et al, 2013). Pesquisa com CTM humanas da medula óssea e do tecido adiposo expandidas em um arcabouço de colágeno e implantadas em membranas corialantóides de frangos, demonstrou a presença de vários fatores pró angiogênicos, como PDGF-AA importante fator migratório durante a angiogênese e VEGF-A, fator angiogênico envolvido diretamente no brotamento de vasos sanguíneos (EDWARDS et al, 2014). Assim como Li et al., 2014, mostrou que a co-cultura *in vitro* de CTM e células endoteliais por 24 horas, promoveu a liberação pelas CTM de IL-1 $\beta$  e IL-6, que ativam a família das proteínas NF-kB, responsáveis por sinalizar a transcrição de genes, quimiocinas, receptores de superfície e moléculas relacionadas ao processo de angiogênese *in vivo* e *in vitro* (LI et al, 2014).

Em ambas as alternativas, as CTM representam uma peça chave para a terapia celular. Seu potencial secretório e capacidade de interação célula-célula vem despertando grande interesse no mundo científico, onde sua utilização ou administração dos seus meios condicionados em modelos de regeneração tecidual, manutenção da integridade de enxertos e promoção da angiogênese serão cruciais para a melhoria de técnicas e, neste caso, a otimização do transplante de ilhotas pancreáticas (DIETRICH et al, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

O transplante de ilhotas representa uma alternativa viável no tratamento da diabetes. No entanto, devido à perda de massa considerável de ilhotas logo após o transplante, são necessários dois ou mais doadores para conseguir a normoglicemia. Dentro desse contexto, a equipe envolvida no projeto é pioneira no transplante de ilhotas pancreáticas no Brasil (ELIASCHEWITZ et al., 2004) e vem introduzindo modificações para melhorar a taxa de sucesso deste tipo de alternativa terapêutica (LABRIOLA et al., 2007; TERRA et al., 2011).

A remoção enzimática das ilhotas da matriz pancreática durante o processo de isolamento favorece a apoptose das células da ilhota e contribui para a redução da viabilidade. Outro agravante é a destruição substancial das ilhotas pelo sistema imune do indivíduo receptor, logo após o transplante. Estratégias que facilitem a regeneração da matriz, melhorem a viabilidade das ilhotas e modulem a resposta autoimune, são alvos potenciais para a redução do número de doadores de ilhotas por beneficiário, melhoria do resultado do transplante e reversão do diabetes.

Em indivíduos saudáveis, nas adaptações fisiológicas que requerem maior demanda de insulina, como durante o desenvolvimento pós-natal, aumento do peso corporal (em casos extremos, a obesidade) ou gravidez, o aumento do número de células beta das ilhotas ocorre simultaneamente ao aumento e expansão da microcirculação. As células endoteliais estão posicionadas para responder a hormônios e, juntamente a mediadores químicos locais, favorecer o crescimento, sobrevivência e função das ilhotas pancreáticas. O balanço entre densidade da microvasculatura e de ilhotas pancreáticas resulta de sinais mútuos entre os vasos sanguíneos e células beta.

A revascularização e angiogênese nas ilhotas são outro alvo potencial para melhoria do resultado do transplante, já que durante o processo de isolamento, os vasos sanguíneos são desconectados, e as células endoteliais remanescentes sobrevivem por apenas uma semana. O restabelecimento adequado da microcirculação nas ilhotas transplantadas preveniria a disfunção e morte das mesmas. Neste âmbito, as células tronco mesenquimais

apresentam posição de destaque, visto que estão presentes em todos os tecidos e liberam vários fatores que melhoram a sobrevivência e viabilidade de células alvo, induzindo a angiogênese e contribuindo para a regeneração de tecidos. Mais especificamente, as CTM do tecido adiposo (CTM-AD) são excelente candidatas para a terapia celular, por serem facilmente acessíveis, pois seu isolamento é simples, podem ser criopreservadas com perda mínima de potência, e não mostram reações adversas em transplantes autólogos ou alogênicos de CTM. Por sua vez, o meio condicionado produzido por estas células expõem grandes potenciais parácrinos para a otimização do transplante de ilhotas pancreáticas, contribuindo para o sucesso do enxerto e melhora do quadro clínico do portador.

### 3 OBJETIVOS

#### **Geral:**

Estudar as características angiogênicas dos meios condicionados de células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-AD) visando aperfeiçoar a viabilidade de ilhotas pancreáticas.

#### **Específicos:**

- Obter, expandir e caracterizar CTM-AD de amostras de lipoaspirados;
- Avaliar *in vitro* o efeito dos meios condicionados coletados sobre a proliferação, viabilidade, migração e angiogênese das células endoteliais da veia do cordão umbilical (HUVEC);
- Investigar o perfil proteômico dos meios condicionados;
- Avaliar a viabilidade das ilhotas pancreáticas em cultivo com os meios condicionados de CTM-AD

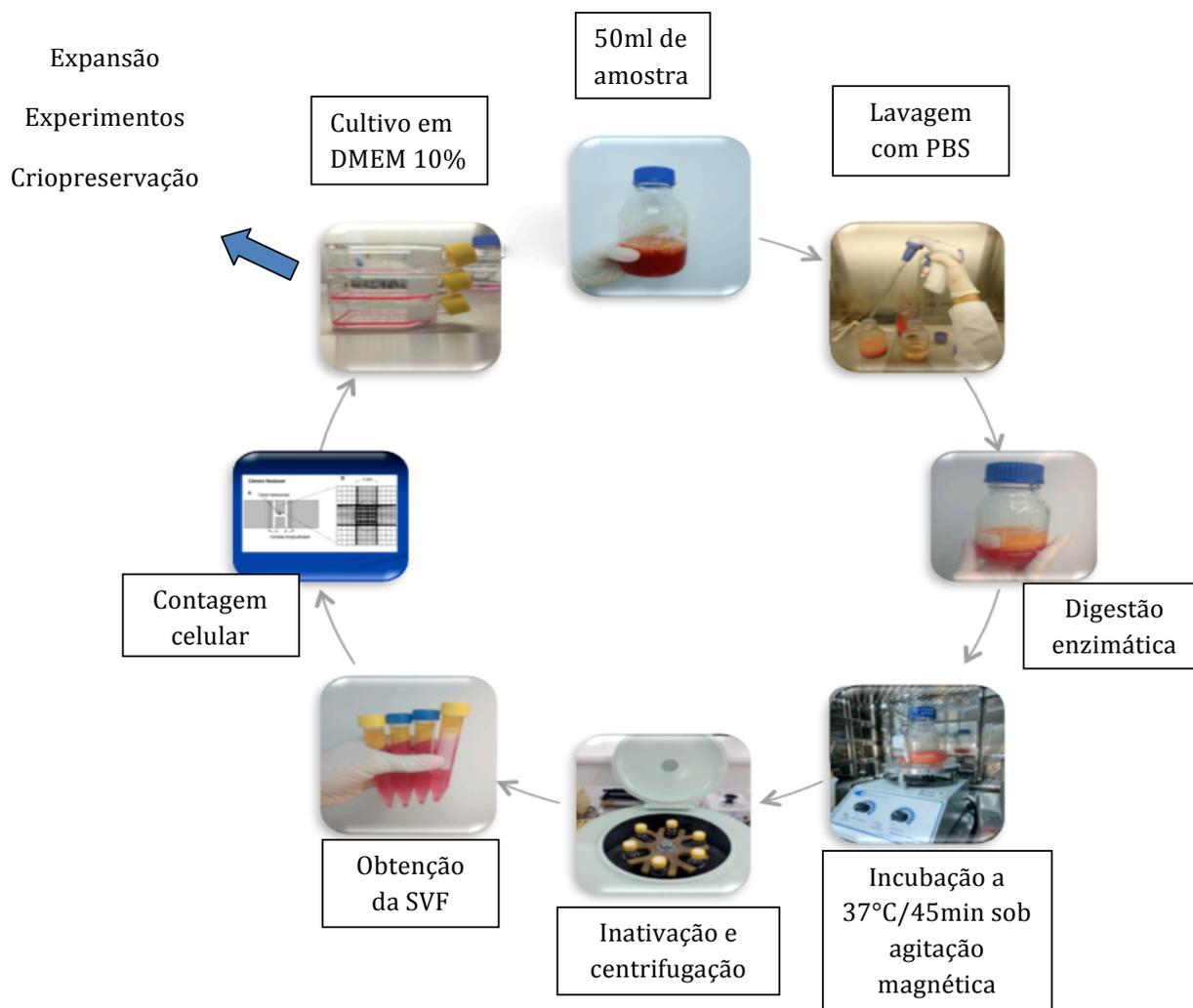
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Coleta do material biológico, transporte e aspectos éticos

O comitê de Ética em pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira (UFBA) autorizou a realização deste projeto (Parecer 625.059, em anexo). Os materiais biológicos para obtenção das CTM foram obtidos após cirurgia plástica de lipoaspiração, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). Os critérios de exclusão adotados foram: idade superior a 45 anos, hábito tabagista, histórico de obesidade, hipertensão e diabetes. A obtenção do material biológico ocorreu sem ocasionar alteração na rotina médica e no atendimento dos pacientes. As amostras de lipoaspirado foram coletadas, armazenadas em meio RPMI 10% Soro Fetal Bovino (SFB) + ciprofloxacino (100U/mL), sob refrigeração a 4<sup>o</sup>C e transportado ao Laboratório, para isolamento da fração vascular estromal (SVF) em até 24hs. Um volume total de 50 ml de lipoaspirado foi obtido por cada material coletado.

### 4.2 Isolamento das Células Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo

As amostras de lipoaspirado foram lavadas com PBS, afim de retirar o excesso de sangue e submetidas à digestão enzimática, com adição de 30 ml de colagenase 11mg/ml (Sigma, C0130-1G) e agitação mecânica, a 37<sup>o</sup>C/45min. Após inativação da enzima colagenase I, adição de 30ml de SFB, o material digerido foi centrifugado a 1500 rpm/10min para a obtenção da fração vascular estromal (*sedimento celular*). A SVF foi ressuspensa em meio DMEM com baixa glicose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life Technologies, Lot: 1664511), suplementado com 10% de SFB + ciprofloxacino (100U/mL) e penicilina (100 U/ml) em garrafas de cultivo aderentes de 25cm<sup>2</sup>. O meio de cultivo foi renovado a cada três dias de acordo com a técnica de ZUK et al, (2001)(figura 4). Ao atingirem a confluência (aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células/garrafa), as células foram subcultivadas com Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco®, Invitrogen, EUA) e expandidas e/ou congeladas para experimentos posteriores. A contagem celular foi realizada através da utilização do hemocitômetro, com adição do corante Azul de tripan.



**Figura 4. Etapas do isolamento da fração vascular estromal.**

### 4.3 Isolamento das Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana (HUVEC)

As células endoteliais foram isoladas a partir da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) como descrito por Davis J. (2007). Os cordões umbilicais foram coletados de gestantes jovens (idade máxima 35 anos), que realizaram o pré-natal e possuíam histórico negativo para doenças transmissíveis, distúrbios metabólicos e hormonais (Parecer 625.059, em anexo). Todas as gestantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes e após o

parto. Após a coleta do material fresco em meio de cultura RPMI 10% SFB + ciprofloxacino (100U/ml), o cordão umbilical passou pelo processo lavagem (3x com solução PBS) e digestão da veia do cordão umbilical com colagenase I 1mg/ml (Sigma, C0130-1G), clampeando a região e acondicionando à temperatura de 37<sup>o</sup>C/30min. Após inativação da enzima, com SFB e coleta do material digerido, este foi centrifugado (1000 RPM por 5 minutos) com ressuspensão apenas do sedimento celular. O material isolado foi acondicionado em garrafas de cultura (25cm<sup>2</sup>) recobertas com colágeno e cultivado na presença do meio de cultura seletivo para células endoteliais, meio EGM-2 ( do inglês Endothelial Growth Medium – 2 SingleQuotes kit Supplements & growth factors – Lonza Cat No. cc-4176) + 2% DE SFB e ciprofloxacino (100U/ml) (DAVIS et al, 2007). Fenótipo poligonal característico de células endoteliais foi evidenciado nas culturas após 5 dias de isolamento. As HUVEC foram mantidas em cultura, com troca do meio a cada 2 dias e utilizadas nos experimentos entre as passagens 2 e 6.

#### **4.4 Curva de crescimento populacional, cálculo do tempo de dobramento e Índice de dobramento populacional cumulativo das CTM**

Para avaliação do crescimento populacional, foi realizado o cálculo do tempo de dobramento. O ensaio durou um período de 100 dias. CTM-AD recém isoladas foram cultivadas em placas aderentes de 6 poços (9.6 cm<sup>2</sup>) e subcultivadas ao atingirem a confluência total. A contagem celular foi realizada utilizando o hemocitômetro. A cada etapa de subcultivo com Tripsina-EDTA 0,25%, as células foram contadas e um volume de 1x10<sup>5</sup> replaqueado. Este processo foi repetido sucessivamente até o centésimo dia. Obteve-se o tempo de duplicação das amostras analisadas através do cálculo do tempo de dobramento: **Tempo de duplicação = duração \* log (2) / log (população final) – log (população inicial)** (ROTH, 2006) (disponível em: <http://www.doubling-time.com/compute.php>). O índice de dobramento populacional total (NDPT) foi calculado através da fórmula: **NDPT = log (número de células com 100% confluência/número de células plaqueadas)/log(2)** (CHEVALLIER et al, 2010). Resultados expressos na forma de média ± desvio padrão.

#### 4.5 Caracterização Imunofenotípica por citometria de fluxo

A imunofenotipagem das CTM-AD foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se os seguintes anticorpos acoplados com ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC) e seus controles isotipos: anti-CD14 PE (clone 61D3, Lot: E026669, ebioscience), anti-CD34FITC (BD, Cat No. 348053), anti-CD45PerCP (lot: ED7029, Exbio), anti-CD146 PE (lot: 91811, BD Biosciences), anti-HLA-DR PE (clone: MEM-12, lot: 1P474T100, Exbio), anti-CD29FITC (clone: TS2116, lot: E031567, ebioscience), anti-CD73 PE (clone: AD2, lot: 1P675T100, exbio), anti-CD90 (clone: ebioE10, lot: E0228253, ebioscience) PE, anti-CD105FITC (clone: SN6, lot: E029268, ebioscience)(DUDA et al., 2007). Um volume de  $6 \times 10^4$  células foi utilizado para cada dupla marcação, com os anticorpos supracitados. CTM-AD na segunda e sexta passagem foram subcultivadas (Tripsina-EDTA 0,25% - Gibco®, Invitrogen, EUA), centrifugadas a 1500rpm/10min, com descarte do sobrenadante e ressuspensão do *sedimento celular* para marcação com 10ul de cada anticorpo (diluído 1:300) em solução salina CMF (88mM de NaCl; 1mM de KCl; 2,4mM de  $\text{NaHCO}_3$ ; 7,5mM de Tris-Cl – pH 7,6).

As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e acondicionadas em ambiente isento de luz, com posterior adição de 1ml da solução salina CMF + 3% de SFB. Por fim, centrifugou-se novamente e ressuspendeu o sedimento celular em solução salina CMF. A leitura foi realizada de forma imediata no citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences, CA, EUA), com análise utilizando o software BD Cell Quest pro software.

#### 4.6 Ensaio de diferenciação em multilinhagem

Com o objetivo de demonstrar a plasticidade das CTM-AD, realizou-se os ensaios de diferenciação adipogênico e osteogênico, *in vitro*, com base no protocolo de ZUK et al., (2001).

Aproximadamente  $5 \times 10^4$  células foram semeadas por poço ( $1.9 \text{ cm}^2$ ), e cultivadas inicialmente em meio DMEM low glucose (10% de SFB) + antibióticos até atingirem a pré-confluência. Para conversão em adipócitos, utilizou-se o meio indutor adipogênico composto de DMEM High glucose

suplementado com penicilina (100U/ml) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB),  $10^{-8}$ M de dexametazona (Sigma), 2,5µg/mL de insulina (Sigma), 100µM de indometacina (Sigma) e 0,5mM de 3-isobutil-metilxantina (Sigma). A indução osteogênica foi realizada através do cultivo das células em meio específico composto por *DMEM High glucose* suplementado 10%SFB, 0.1µM de Dexametazona (Sigma) e 50µg/ml de ácido ascórbico-2-fosfato (Sigma). Os meios indutores foram renovados a cada 3 dias, durante os 14 dias de ensaio.

Um total de 3 amostras biológicas foram analisadas, com triplicadas individuais para cada experimento. Após a etapa de indução à diferenciação, retirou-se os meios indutores, lavou-se a cultura com solução salina CMF e fixou-se com paraformaldeído 4%, por 1 hora. Utilizou-se a solução saturada de *Oil Red O* (Sigma Aldrich ®, USA), para a coloração das gotículas de gordura presentes na cultura adipogênica e Alizarina Red S 1% (Sigma Aldrich ®, USA) (pH 4,1) para evidenciar a deposição da matriz de cálcio, característico de uma população celular osteogênica. As imagens foram registradas pelo microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas).

#### **4.7 Imunohistoquímica para detecção de proteínas membranares e de citoesqueleto**

Para caracterização molecular das CTM e HUVEC, realizou-se a detecção de proteínas presentes na matriz extracelular, citoesqueleto e membrana plasmática. CTM-AD na terceira e sexta passagem ou HUVEC na terceira passagem foram cultivadas sobre lamínulas de vidro circulares em placas de 24 poços, até a pré-confluência (70%). As células foram fixadas com paraformaldeído 4% e permeabilizadas com solução de permeabilização (PBS + 0,3% Triton X-100 + 3% BSA) à temperatura ambiente por 30 minutos. Finalizada esta primeira etapa, preparou-se a câmara úmida e diluiu-se os anticorpos primários (tabela 2) na solução de bloqueio (PBS + 3% BSA), incubando *overnight* à 4<sup>o</sup>C em ausência de luz. As células foram lavadas com PBS (3 lavagens de 10 minutos) e incubadas com os anticorpos secundários conjugados ao fluorocromo + DAPI (para marcação nuclear) por 2 horas à temperatura de 37<sup>o</sup>C, em ambiente isento de luz. Por fim, as lamínulas foram

lavadas na solução salina de CMF e adicionadas sobre lâminas para a visualização no microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas). O meio de montagem utilizado foi: *Dako Faramount Aqueous Mounting Medium*, S3025.

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

**Tabela 2. Anticorpos utilizados na caracterização molecular das CTM isoladas.**

#### **4.8 Preparo de Meio Condicionado e pré-condicionamento das CTM-AD**

Para preparo do meio condicionado (MC), as CTM-AD foram cultivadas em garrafas de T25, até a confluência total e pré-condicionadas em uma das seguintes condições:

(1) Condição de normóxia - CTM-AD incubadas por 48hs em meio depletado de soro (EGM-2 + 3% de BSA + antibióticos), em estufa 37°C, 5% CO<sub>2</sub>+ níveis normais de oxigênio (EDWARDS et al, 2014).

(2) Condição de hipóxia: CTM-AD incubadas por 48hs em meio depletado de soro (EGM-2 + 3% de BSA + antibióticos), e mantida em câmara de hipóxia a 37<sup>0</sup>C. A condição de hipóxia (2% de oxigênio) foi obtida em câmara hermeticamente vedada, contendo duas unidades de anaerobac (gerador de hipóxia, ANA12T010416B) e fita indicadora de baixa pressão de O<sub>2</sub> (Probac do Brasil) (EDWARDS et al, 2014).

Após 48hs de pré-condicionamento, o meio condicionado foi recolhido por centrifugação a 1500 rpm/8min e armazenado a -20°C para uso posterior (SILVEIRA et al, 2010).

#### **4.9 Ensaio de coloração com calceína-AM**

Esta técnica foi empregada para avaliação da viabilidade celular de CTM-AD ao final do pré-condicionamento, utilizando o kit *Calceína-AM (Molecular Probes, Life technologies--C3100MP)*.

A conversão da calceína em um análogo impermeável e de fluorescência verde por enzimas esterases foi indicativo da integridade celular (NERI et al, 2001). Imediatamente após o término do pré-condicionamento, as células foram incubadas por 30 minutos com solução salina CMF contendo 1ul de Calceína AM (1:500). A captura de imagens fluorescentes emitida pela calceína ocorreu em microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas). As imagens obtidas foram convertidas em gráfico através do cálculo da densidade integrada (**densidade integrada = (intensidade do número de pixels)–(intensidade do background)**) (MCCLOY et al, 2014).

#### **4.10 Quantificação de proteínas – Método de Lowry modificado**

Para a padronização do meio condicionado, realizou-se o método de Lowry modificado (HARTREE, 1972). Este método consiste na utilização do reagente de FolinCiocalteau (F9252 Sigma-Aldrich), que reage com as proteínas da amostra, formando um complexo de cor azul. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific), utilizando o comprimento de onda de 660nm. Albumina sérica bovina a 1% (Sigma, A9418-10G) foi utilizada para a elaboração da curva padrão.

#### 4.11 Análise da fosfatase alcalina

Para avaliação da atividade enzimática da fosfatase alcalina, um volume de 50ul do meio condicionado foi adicionado a 100ul de p-Nitrofenilfosfato (N7653-100MI, Sigma) e incubado em banho-maria 37<sup>o</sup>C/30min. A solução foi analisada através do espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific), no comprimento de onda selecionado foi 405nm. (SIGMA, 2002).

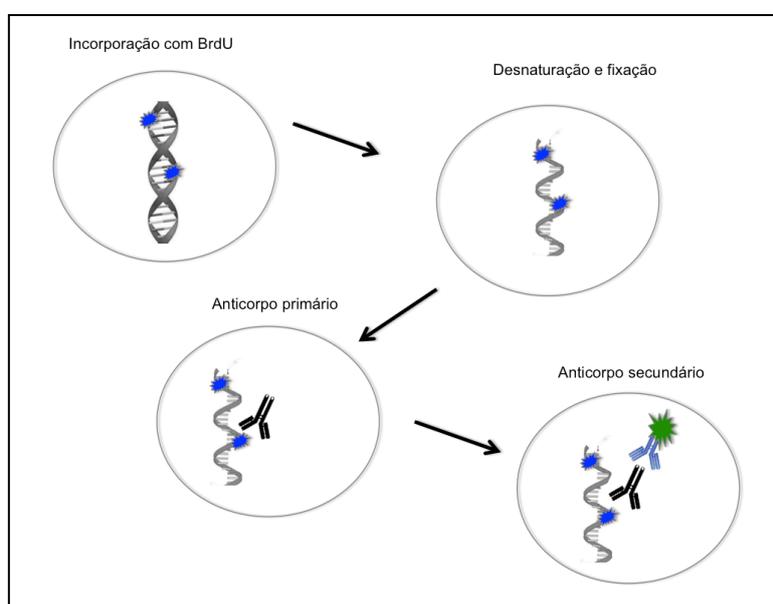
#### 4.12 Ensaio *in vitro* de migração celular coletiva (wound-healing assay)

Este ensaio foi usado para avaliar a capacidade das células HUVEC para iniciar migração uma vez que uma área desnudada foi criada em uma cultura confluenta. As células endoteliais foram cultivadas em placa de 24 poços e crescidas até à confluência. No tempo “zero” foi feita uma lesão na monocamada, arrastando uma ponteira (P200) em linha reta através da monocamada. O local da lesão foi marcado na parte inferior da placa. O meio de cultura foi aspirado e substituído por uma das seguintes condições: A) Meio completo (EGM-2 suplementado com fatores); B) Meio incompleto (EGM-2 incompleto + 3% de BSA ); C) MC normóxia; D) MC hipóxia. Foram obtidos registros fotográficos da região lesionada no tempo zero e 18hs após a lesão. A análise da migração das células endoteliais foi realizada através do cálculo percentual da área regenerada após o período de 18 horas: **porcentagem da área recuperada = (área inicial – área final)/ área inicial.**

#### 4.13 Ensaio *in vitro* de detecção de BrdU

A capacidade proliferativa das HUVEC foi avaliada pelo ensaio de incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). O BrdU é um nucleósideo sintético análogo da timidina, o qual é incorporado ao DNA de células que estão na fase S do ciclo celular (figura 5). Neste ensaio, HUVEC em pré-confluência foram sincronizadas ao meio EGM-2 com 0.5% de SFB + antibióticos, por um período de 12 horas. Após esta etapa, as células foram cultivadas, por 24 horas, em quatro condições: meio completo (meio EGM-2 + Fatores), meio incompleto (meio EGM-2 + 3% de BSA– A9418 -10G Sigma),

MC normóxia e MC hipóxia. Cada meio supracitado foi associado a 1ul de BrdU. O BrdU foi identificado por imunofluorescência através da incubação com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti- Bromodeoxiuridina humana (VECTOR, VP-B209) diluído 1:200 em solução de bloqueio (PBS + 3% BSA)(WANG et al, 2014). O número de células incorporadas com BrdU foram analisadas após a marcação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado (Alexa Fluor 488, diluição: 1:2000) + DAPI, diluídos na solução de bloqueio. Fotos foram registradas pelo microscópio de fluorescência Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas).

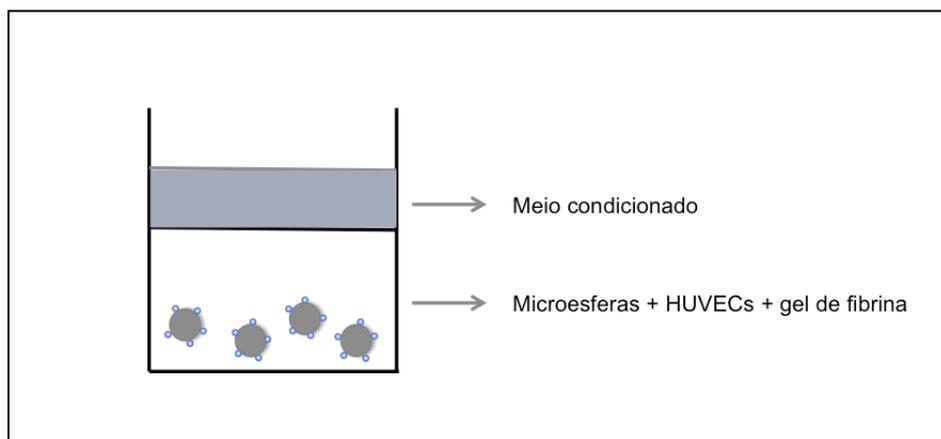


**Figura 5. Representação ilustrativa das etapas do ensaio de BrdU.**

#### **4.14 Ensaio *in vitro* de tubulogênese**

O ensaio de tubulogênese *in vitro* seguiu o protocolo descrito por Newman et al, (2012). HUVEC em confluência, foram subcultivadas e associadas a 2.500 microesferas revestidas por colágeno e introduzidas em um gel de fibrina. O preparo do gel foi realizado dissolvendo 3 mg/ml de fibrinogênio (F3879, Sigma-Aldrich®) em meio EGM-2 sem SFB. As microesferas revestidas foram contadas a fim de se obter uma concentração de 500 microesferas/ml, antes de serem adicionadas a solução de fibrinogênio no tubo cônico. Um volume de 0,15 U/ml de aprotinina (A3428, Sigma-Aldrich®) foi adicionado à solução contendo fibrinogênio + microesferas revestidas com

HUVEC. Ao final, a solução supracitada foi associada a 0,625 U/ml de trombina (T4648, Sigma-Aldrich®). Após a polimerização do gel, os seguintes meios foram adicionados: meio completo, MC normóxia e MC hipóxia (figura 6). O ensaio durou 5 dias, com troca dos meios diariamente. Registros foram obtidos pelo Microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas), a quantificação e o comprimento das estruturas tubulares foram medidas e analisados pelo programa imageJ (NIH, EUA).



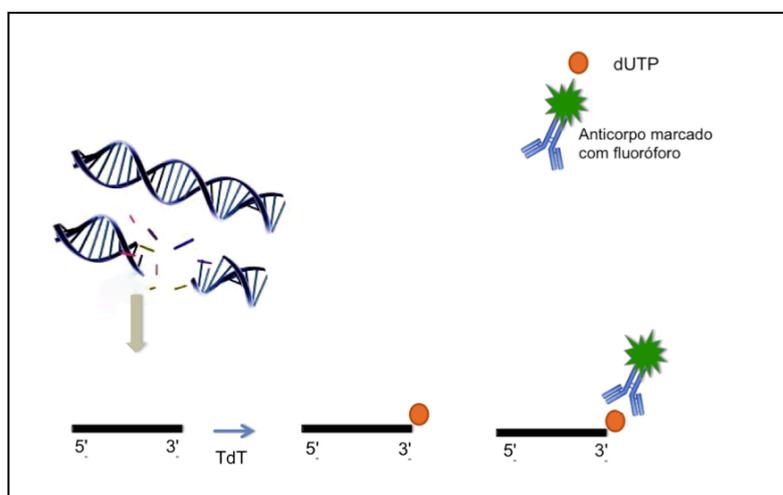
**Figura 6.** Imagem ilustrativa do ensaio de tubulogênese. HUVEC semeadas em microesferas e embebidas em gel de fibrina.

#### 4.15 Ensaio de detecção de TUNEL

O efeito protetor do meio condicionado de CTM-AD sobre as células HUVEC foi avaliado através do método de TUNEL (do inglês, Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling). O método de TUNEL tem por finalidade a detecção de fragmentos de DNA em células no estado apoptótico tardio (figura 7).

Células HUVEC foram semeadas lamínulas revestidas de colágeno, até a pré-confluência (aproximadamente 70%) e submetidas as seguintes condições: meio completo (meio EGM-2 + fatores e antibióticos), meio incompleto (meio EGM-2 + 3% de BSA– A9418 -10G Sigma), MC normóxia e MC hipóxia, por 24hs. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (30min), permeabilizadas (0,1% Triton-X-100; 0,1% citrato de sódio) por 5 min e incubadas em solução contendo 50ul da enzima TdT (Terminal deoxinucleotídeo Transferase) + 450ul do mix de nucleotídeos

conjugados com fluoresceína (*In situ Cell Death detection kit, Fluorescein – Roche*), por 1 hora a 37°C em ambiente isento de luz. Para marcação nuclear, utilizou-se o iodeto de propídeo (PI). As células em apoptose foram identificadas e quantificadas em microscópio de fluorescência Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas).



**Figura 7.** Imagem ilustrativa das etapas do ensaio de TUNEL.

#### 4.16 Detecção de p-AkT e AkT por Western Blot

A técnica de Western Blot foi realizada para detectar a expressão das proteínas quinases p-AkT e AkT, envolvidas na via de sinalização de controle da sobrevivência celular em HUVEC. O ensaio foi realizado com base no protocolo de Derakhshan et al, (2008). As amostras de proteínas obtidas a partir do lisado celular da monocamada de HUVEC foram cultivadas em placas de 6 poços, extraídas com a utilização do coquetel de inibição de protease (P8340, Sigma-Aldrich®) e mantidas no freezer a - 80 °C até o momento da liofilização e posterior aplicação no gel de poliacrilamida 10%. O preparo das amostras para aplicação no gel foi feito por meio da adição de 100 ug de proteína / poço reconstituído em 8 uL do tampão de amostra (solução 1M Tris.HCl pH 6,8, SDS 4%, Glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,2%) seguido de aquecimento a 100°C por 5 minutos. Um volume de 40 uL das amostras e 4 uL do marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BIO-RAD) foi aplicado ao gel de poliacrilamida e submetido a eletroforese em tampão Tris-Glicina (pH 8,3).

Após o término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de PVDF, utilizando o dispositivo de transferência a seco de segunda geração (iBlot® 2 DryBlotting System, ThermoScientific™). Após a transferência a membrana foi bloqueada por 3 horas em solução PBSA 0,1% Tween (PBSA-T) com 5% de leite desnatado. Na sequência, a membrana foi incubada *overnight* (12 horas) com o anticorpo primário monoclonal de coelho anti-pAkt (Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® RabbitmAb #4060, CellSignaling Technology®) na concentração 1:500. A membrana foi lavada com PBSA-T por 3 vezes de 10 minutos e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário (Peroxidase Goat Anti-Rabbit IgG Antibody PI1000, Vector Laboratories) na concentração 1:1000. Após algumas etapas de lavagem foi realizado o *stripping* a frio da membrana de PVDF com a solução de *stripping* (25 mM de glicina, 1% SDS, Tris HCl pH 6,8) por 30 minutos, e 4 lavagens com PBSA-T. A membrana foi bloqueada novamente por 3 horas em solução PBSA 0,1% Tween (PBSA-T) com 5% de leite desnatado e depois incubada *overnight* (12 horas) com o anticorpo primário monoclonal de coelho anti-AkT (AktAntibody #9272, Cell Signaling Technology®) na concentração 1:500. A membrana foi então lavada com PBSA-T, por 3 vezes de 10 minutos e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário (Peroxidase Goat Anti-Rabbit IgG Antibody PI1000, Vector Laboratories) na concentração 1:1000. Após algumas etapas de lavagens subsequentes, a membrana foi imersa em solução quimioluminescente de revelação (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat, Merck millipore) e as bandas detectadas utilizando o fotodocumentador (Alliance 4.7, Uvitec Cambridge). As bandas detectadas por quimioluminescência foram quantificadas pela razão entre a densitometria da p-AkT pela AkT, utilizando o software Image J (NIH, EUA). O cálculo utilizado foi: **fluorescência celular total corrigida = densidade integrada – (área selecionada x média de fluorescência de leitura dos backgrounds)**(MCCLOY et al, 2014).

#### 4.17 qRT-PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real foi utilizada para a avaliação e quantificação da expressão dos transcritos (RNAm) de alguns genes envolvidos na diferenciação e angiogênese. Foram avaliados os níveis de expressão dos seguintes transcritos: IL8, HGF, NRG1, Beta-igh3, Pcolce, THBS, vWF, PDGFr, VEGF, SDF1, Ang1, FGF1, Col4, Eng, MCAM, CD90, CD34, CD14, CD31, KDR, FLT1, PPAR, SPARC e MMP9 (tabela 3). Os *primers* utilizados foram coletados dos bancos de dados Primer blast (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e primer bank Harvard (disponível em: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). O RNA total das culturas primárias de CTM utilizadas neste trabalho foi isolado utilizando-se colunas de sílica e metodologia disponibilizados pelo RNAspin Mini-kit (GE, Healthcare/ Lot: SPI001443). O grau de pureza do RNA foi estimado pela relação Abs260nm/Abs280nm, tendo-se, como pureza satisfatória, uma relação próxima de 2,0. A síntese de cDNA foi feita em reações de transcrição reversa pela enzima Super script III (Fermentas) com as amostras de RNA purificadas. A identificação e quantificação dos produtos de c-DNA formados foi pela reação de qRT-PCR quantitativo utilizando-se o corante SYBR® Green Master Mix (A&B, Lot: 1503124) e como molde 3µL do cDNA sintetizado. Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em triplicata, no termociclador Vii7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e os resultados calculados utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  modificado, utilizando o gene GAPDH como controle endógeno (PFAFF, 2004).

Gene	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
<b>ANG1</b>	GTCAATGGGGGAGGTTGGACTGTA	AGCCAATATTCACCGGAGGGATTT
<b>BIGH3</b>	CATCAGCTACGAGTGCTGTC	GTGTACAGCTGAGTGGTGGT
<b>FGF1</b>	GATGGGACAAGGGACAGGAG	CGTATAAAAGCCCGTCGGTG
<b>HGF</b>	GCCTCTGGTTCCCCTTCAAT	GCTGCGTCCTTTACCAATGA
<b>II-8</b>	CAGGAAGAAACCACCGGAAG	TCTTTAGCACTCCTTGGCAAAA
<b>NRG-1</b>	GGGAGTGCTTCATGGTGAAG	TTACGTAGTTTTGGCAGCGA
<b>PCOLCE</b>	GGAGTGCATCTGGACCATAAC	GAAGACTCGGAATGAGAGGGA
<b>FLT1</b>	CGGGGATTTCACTGTACATCT	AAGCAAACCACACTGGCTTC
<b>SDF-1</b>	ATGAACGCCAAGGTCGTG	GGCTTTTGAAGAATCGGCAT
<b>SPARC</b>	GCTGGATGAGAACAACACCC	GCAGGAAGAGTCGAAGGTCT
<b>MCAM</b>	ACTTCCACCTCCACCAGCTC	GTCTGCGCCTTCTTGCTC
<b>ENG</b>	CTGAGGACCAGAAGCACCTC	TCCATGTCCTCTTCCTGGAG
<b>KDR</b>	CGGCTCTTTGCTTACTGTT	CCTGTATGGAGGAGGAGGAA
<b>THBS</b>	TTGCCACAGCTCGTAGAACA	CAATGCCACAGTTCCTGATG
<b>vWF</b>	TTTCCCCAGAGGAGATGTTG	TCGGACCCTTATGACTTTGC
<b>COL1A</b>	CACACGTCTCGGTCATGGTA	AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG
<b>PDGFr</b>	AGCACCTTCGTTCTGACCTG	TATTCTCCCGTGTCTAGCCCA
<b>VEGF</b>	GAGGAGCAGTTACGGTCTGTG	TCCTTTTCTTAGCTGACACTTGT
<b>COL4</b>	AGATAAGGGTCCAACCTGGTGT	ACCTTTAACGGCACCTAAAATGA
<b>CD90</b>	CATCTGCGAGTGTGGTGTCT	CCCCACCATCCCCTACC
<b>PPAR</b>	GATGCCAGCGACTTTGACTC	ACCCACGTCATCTTCAGGGA
<b>MMP2</b>	AGCTCCCGGAAAAGATTGATG	CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT

**Tabela 3. Lista de primers utilizados.**

#### 4.18 Perfil proteômico do meio condicionado: Identificação de fatores secretados pelas CTM

Ensaio utilizado para a investigação de fatores angiogênicos presentes no extrato celular das CTM-AD. O kit array Proteome Profiler Human Angiogenesis (R &D Systems, Inc) foi utilizado para a detecção de fatores envolvidos na angiogênese e degradação da matriz celular. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Avaliou-se cerca de 2mL de meio condicionado ou 200 ug de proteínas totais a partir de amostras do extrato total de células mesenquimais. Os fatores foram detectados por quimioluminescência aumentada e quantificados por densitometria utilizando o software ImageJ (NIH, EUA), através do cálculo: **fluorescência celular total corrigida = densidade integrada - (área selecionada x média de fluorescência de leitura dos *backgrounds*)**. Dados qualitativos/quantitativos dos fatores presentes no meio foram comparados com os resultados de angiogênese *in vitro* (EDWARDS et al, 2014).

#### 4.19 Isolamento de ilhotas pancreáticas ratos

Ilhotas pancreáticas foram isoladas de ratos machos Wistar, com massa corpórea entre 270 a 350g e aproximadamente 8 semanas de vida. Um total de 15 ratos machos Wistar foram necessários para 3 sessões de isolamentos das ilhotas pancreáticas (tabela 4, 5 e 6). O procedimento de isolamento foi realizado no laboratório do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) - depto. de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os pâncreas foram perfundidos através do ducto de Wirson e digeridos com Colagenase V (7mg/ml - Sigma), de acordo com o método de Ricordi et al, (1988), com algumas modificações (RYAN et al, 2001). A purificação foi realizada utilizando um gradiente de densidade contínuo de Ficoll (gradiente decrescente de 1,096 a 1,037) e centrifugando a 2.000 rpm/15min a 4<sup>o</sup>C. A pureza das preparações das ilhotas pancreáticas após o isolamento foi determinada por coloração com ditizona (Sigma-Aldrich®), que intercala íons de Zn<sup>+</sup> presentes em grânulos de insulina. Cada sessão de isolamento utilizou 5 ratos, obtendo-se uma média de 2000 ilhotas/sessão.

Isolamento 1		
Rato	Peso	Gênero
1	308	Macho
2	330	
3	343	
4	316	
5	304	

**Tabela 4. Características dos ratos Wistar utilizados no isolamento de ilhotas pancreáticas. Média do peso: 320.2**

Isolamento 2		
Rato	Peso	Gênero
1	270	Macho
2	296	
3	312	
4	258	
5	273	

**Tabela 5. Características dos ratos Wistar utilizados no segundo isolamento de ilhotas pancreáticas. Média de peso: 281.8**

Isolamento 3		
Rato	Peso	Gênero
1	336	Macho
2	310	
3	318	
4	311	
5	291	

**Tabela 6. Características dos ratos Wistar utilizados no terceiro isolamento de ilhotas pancreáticas. Média de peso: 313,2**

#### 4.20 Cultura das ilhotas pancreáticas recém isoladas e sua manutenção

As ilhotas isoladas foram mantidas em garrafas T25 não aderentes em meio CMRL 1066 +10% de SFB e antibióticos (5.6mM glicose) (Mediatech - Cellgro, Miami, FL, USA) e incubadas a 37<sup>0</sup>C em 2% de CO<sub>2</sub>. A realização destes procedimentos ocorreu no laboratório do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) - depto. de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

#### 4.21 Ensaio *in vitro* de coloração live/dead de ilhotas pancreáticas

A viabilidade celular das ilhotas pancreáticas foi avaliada usando kit de fluorescência (live/dead) com marcação de células vivas por FDA (F7378, Sigma-Aldrich®). Após 24hs do isolamento, as ilhotas pancreáticas foram cultivadas em quatro diferentes condições: meio CMRL 1066 + 10% SFB , meio incompleto, MC normóxia, MC hipóxia, durante 24 horas. A presença de células vivas foi determinada utilizando o corante FDA (diacetato de fluoresceína), com emissão de fluorescência verde. O iodeto de propídeo (PI) foi utilizado como marcador de células não-viáveis , apresentando fluorescência em vermelho. A quantificação dos dados resultantes da viabilidade de ilhotas foi realizada após análise das imagens pelo software Image J (NIH, EUA), aplicando a fórmula **fluorescência celular total corrigida (CTCF) = densidade integrada - (área selecionada x média de fluorescência de leitura dos backgrounds)**. O valor médio de CTCF/área de cada ilhota analisada na imagem foi aplicado ao final na seguinte fórmula para obtenção do percentual: **% morte = MÉDIA CTCF/área PI / SOMA (MÉDIA CTCF/área PI + MÉDIA CTCF/área FDA)** (MCCLOY et al, 2014).

#### 4. 23 Imunofluorescencia confocal para ensaio de insulina e células endoteliais em ilhotas pancreáticas de rato

Afim de avaliar possíveis mudanças na secreção de insulina por células  $\beta$  e a presença de células endoteliais presentes nas ilhotas pancreáticas de ratos, foi feita a marcação por imunofluorescência para detecção de insulina e

marcador de superfície endotelial CD31 (descritos na tabela 7). A captação das imagens foi obtida através da visualização no microscópio confocal Zeiss - modelo LSM 510-Meta, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

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

**Tabela 7. Lista dos anticorpos utilizados para marcação de células produtoras de insulina e endoteliais intra ilhotas.**

#### **4.22 Avaliação estatística.**

A análise dos dados foi realizada com ferramentas de estatística aplicando-se a análise não-paramétrica Mann-Whitney test, para reconhecer a significância entre duas médias amostrais independentes. Foram consideradas amostras significantes, aquelas, na qual as comparações entre as médias amostrais tiveram valor de  $p < 0,05$ . Nos ensaios de migração foram realizadas análises pareadas no qual foram consideradas amostras significantes, aquelas, na qual as comparações entre as médias amostrais tiveram valor de  $p < 0,05$ . A conversão dos dados em gráfico foi realizada através do software Graph Pad Prisma (©2016 GraphPad Software, Inc). N correspondeu ao número de replicatas biológicas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Dados epidemiológicos dos pacientes e obtenção da Fração Vascular estromal

Foram obtidas amostras biológicas de lipoaspirado de pacientes do sexo feminino, com média de idade de 33,75 anos (tabela 8). Um volume de 50 ml do lipoaspirado/paciente foi suficiente para a obtenção inicial de aproximadamente  $10 \times 10^6$  células.

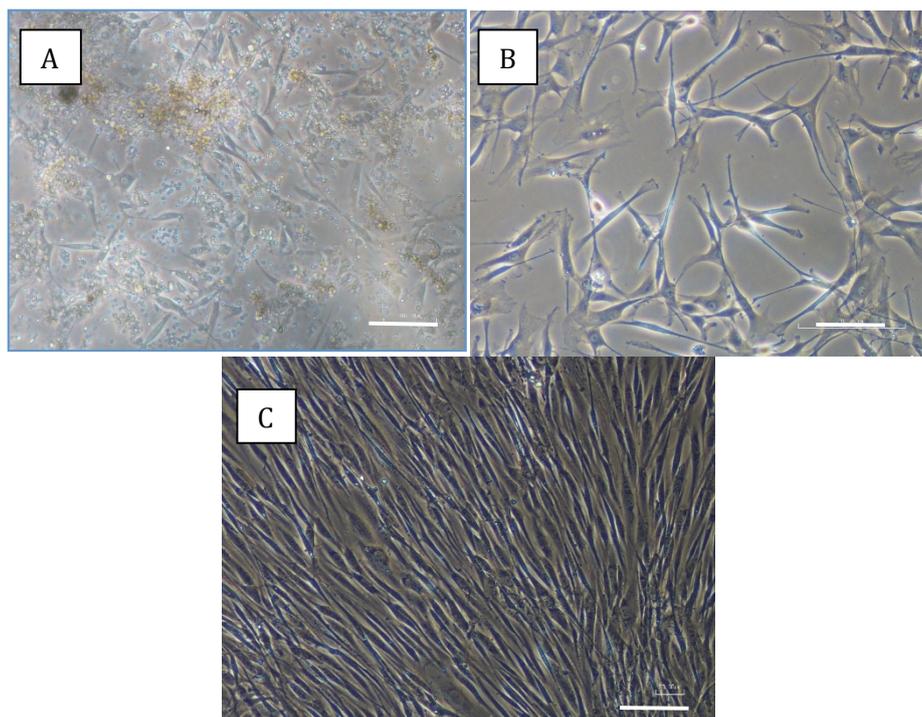
Identificação	Idade	Etnia	Gênero	Material
Isolamento 1	30	Parda	Feminino	Lipoaspirado do culote externo
Isolamento 2	45	Branca	Feminino	Lipoaspirado abdominal
Isolamento 3	35	Branca	Feminino	Lipoaspirado abdominal
Isolamento 4	27	Parda	Feminino	Lipoaspirado abdominal
Isolamento 5	38	Negra	Feminino	Lipaspirado abdominal
Isolamento 6	40	Branca	Feminino	Não especificado
Isolamento 7	25	Branca	Feminino	Lipoaspiado abdominal
Isolamento 8	30	Branca	Feminino	Lipoaspirado abdominal

Tabela 8. Dados cadastrais das amostras biológicas utilizadas.

## 5.2 Isolamento e expansão das células tronco mesenquimais de tecido adiposo

As CTM foram obtidas após o cultivo da população de células da SVF. Inicialmente, as células apresentaram-se como população heterogênea composta por células não aderentes (contaminantes em suspensão, como hemácias, adipócitos e células mortas) e células aderentes, após 24hs do isolamento. Após substituição do meio de cultivo, as células não aderentes foram removidas e obteve-se uma cultura morfológica mais homogênea à medida que as células foram subcultivadas, repicadas e expandidas para novos frascos de cultivo. Observou-se que a população homogênea composta por células com morfologia similar à de um fibroblasto, núcleo localizado na região central, aderentes ao plástico e com alta capacidade de expansão *in vitro*. A monocamada de células fibroblastóides demonstrou aspecto de vales e montanhas em regiões de alta e baixa confluência (figura 8).

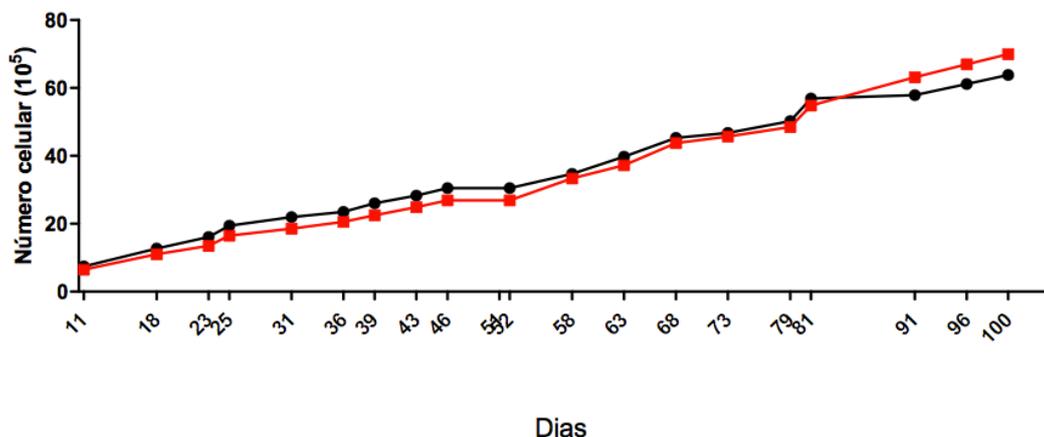
As células fibroblastóides foram expandidas até a passagem 2 (total aproximado de  $20 \times 10^6$  células), então metade da população foi congelada em tubos de criopreservação ( $1 \times 10^6$  células/tubo) e armazenadas em nitrogênio e outra parte mantida em cultivo. Para a realização dos experimentos, utilizou-se células entre as passagens 2 e 6.



**Fig 8. Fotomicrografia de SVF e monocamada de CTM. (A)** SVF em cultivo após 24hs e **(B)** após 1 semana; **(C)**, Monocamada de CTM. Escala: 100 $\mu$ m. N= 8 amostras.

### 5.3 Avaliação da cinética de expansão celular

Com o objetivo de avaliar a capacidade proliferativa, analisou-se o tempo de dobramento médio celular por 100 dias. As CTM-AD foram analisadas a cada passagem, de P0 até P19 (Gráfico 1). A população celular conseguiu preservar suas características ao longo do período analisado, atingindo o número de 19 passagens com tempo dobramento de  $1.18 \pm 0,92$  dias e índice de dobramento populacional cumulativo, ao longo de todo o ensaio, de  $20,14 \pm 1.30$  número de duplicações.



**Gráfico 1. CTM-AD exibiu elevada capacidade de expansão em fase exponencial.** Curva de proliferação celular de duas amostras de CTM-AD durante período de 100 dias. N= 3 amostras.

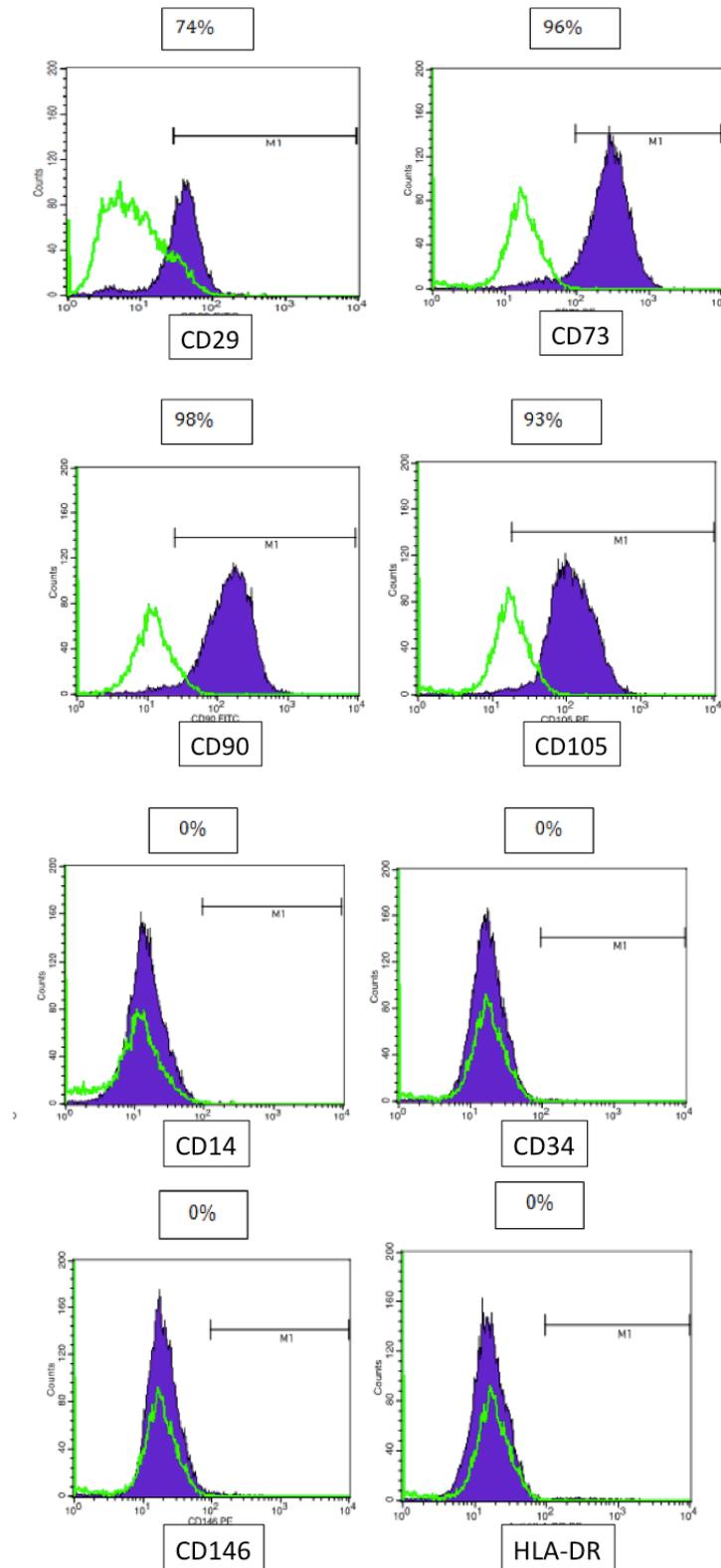
#### 5.4 Imunofenotipagem celular e diferenciação osteogênica e adipogênica

Para a caracterização da origem estromal, realizou-se o ensaio de citometria de fluxo (gráfico 2). Um volume de  $6 \times 10^5$  células (nas passagens 2 e 6) foi utilizado para a realização da imunofenotipagem celular. Com base nos critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular segundo Bourin et al, (2013). A análise resultou no perfil fenotípico para CTM-AD. As células foram caracterizadas como:  $CD29^+$  (integrina beta-1),  $CD73^+$  (ecto-5'-nucleotidase),  $CD90^+$  (Thy-1),  $CD105^+$  (endoglina),  $CD14^-$ ,  $CD34^-$  (glicoproteína transmembrana expressa em células progenitoras hematopoiéticas),  $CD45^-$  (receptor tirosina fosfatase, antígeno leucocitário),  $CD146^-$  (MCAM) e  $HLADR^-$  em ambas as passagens (gráfico 2 e figura 9). De acordo com os dados obtidos, observou-se que as células isoladas apresentaram a expressão de marcadores de superfície específicos de CTM-AD, esta expressão foi mantida em ambas as passagens analisadas.

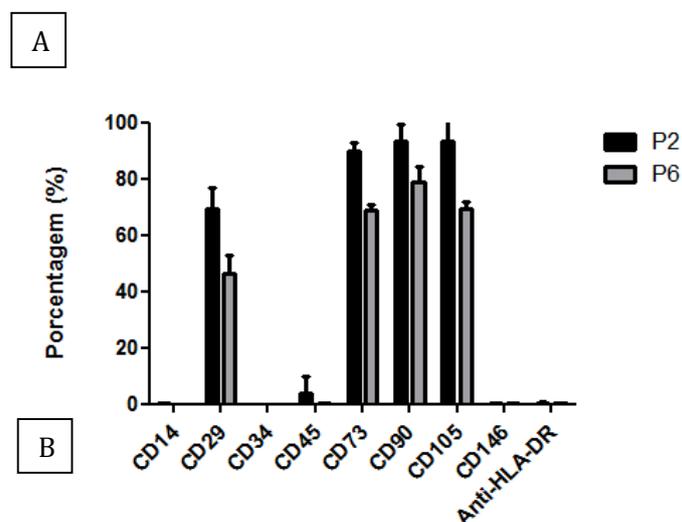
Afim de avaliar a plasticidade das células, CTM-AD foram induzidas à diferenciação osteogênica e adipogênica. O ensaio foi baseado no protocolo estabelecido por Dominici et al (2006) e utilizou CTM-AD na passagem 2. Após 14 dias de ensaio, as CTM-AD cultivadas em meio de cultura de indução osteogênica apresentaram morfologia caracterizada por regiões densas

representativas de matriz óssea. As células diferenciadas foram coradas com *Alizarin red* (figura 10).

As CTM-AD cultivadas em meio completo para indução adipogênica apresentaram a presença de gotículas lipídicas intracelulares dispersas por toda a população celular. As vesículas lipídicas foram evidenciadas através da coloração com *Oil red*. Ambas as populações celulares osteogênica e adipogênica foram observadas por microscopia invertida.

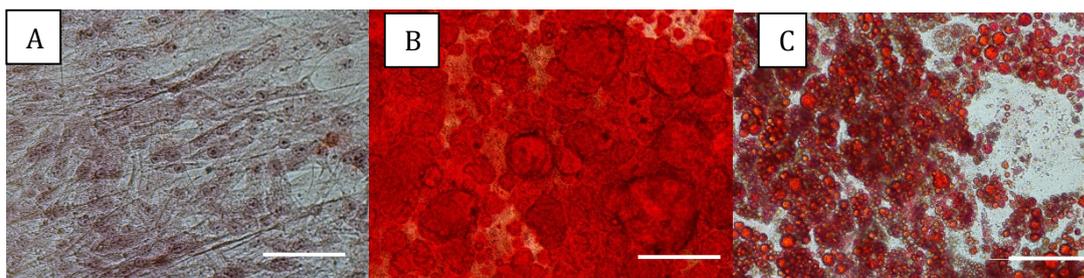


**Gráfico 2. Células isoladas apresentaram marcadores de superfície celular característicos de CTM-AD.** Perfil imunofenotípico de CTM-AD isoladas de tecido adiposo. Picos negativos (linha verde) correspondem a autofluorescência celular. CTM-AD foram positivas para CD29, CD73, CD90, CD105 e negativas para marcadores CD14, CD34, CD146 e HLA-DR. Valores similares foram obtidos na segunda e sexta passagem. N=8 amostras.



	P2	P6
<b>CD14</b>	0.15% ± 0.085	0.02% ± 0.00
<b>CD29</b>	69.50% ± 7.29	46.27% ± 6.36
<b>CD34</b>	0.02% ± 0.01	0.01% ± 0.01
<b>CD45</b>	5.38% ± 7.58	0.09% ± 0.01
<b>CD73</b>	89.87% ± 4.03	68.69% ± 2.32
<b>CD90</b>	93.07% ± 6.14	79.00% ± 5.56
<b>CD105</b>	93.38% ± 7.82	69.54% ± 2.05
<b>CD146</b>	0.16% ± 0.01	0.10% ± 0.14
<b>HLA-DR</b>	0.48% ± 0.15	0.33% ± 0.16

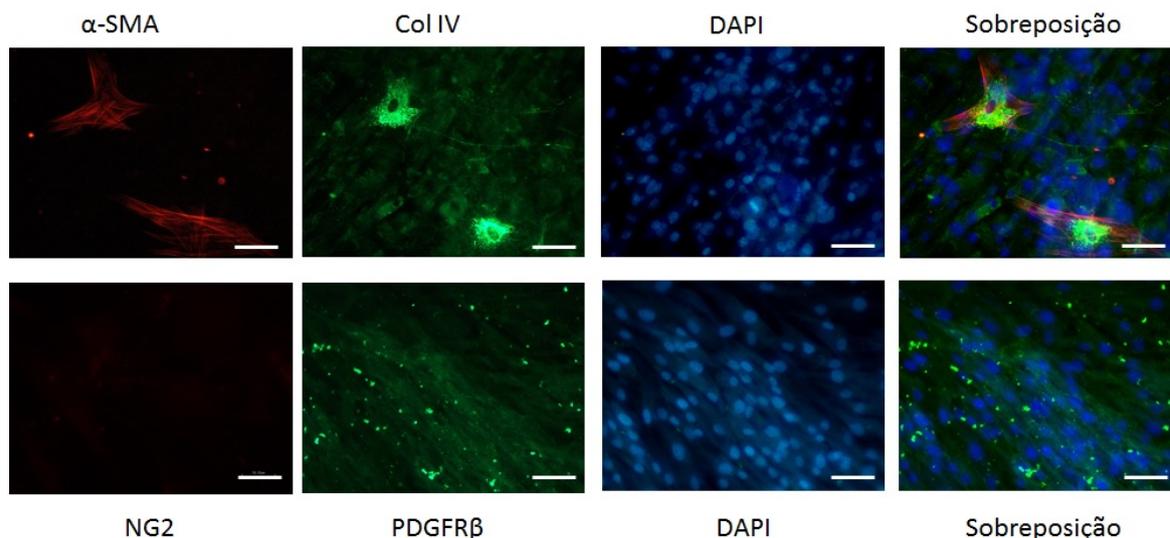
**Figura 9. Expressão de marcadores de superfície celular característicos de CTM-AD se manteve similar na segunda e sexta passagem. (A)** Representação gráfica da expressão dos marcadores de superfície celular analisados. **(B)** Análise estatística dos dados obtidos (porcentagem e desvio padrão), não houve diferença estatística entre as passagens. N=8 amostras.



**Figura 10. Potencial de diferenciação multilinhagem das CTM-AD.** CTM-AD foram incubadas com meio controle (A), osteogênico (B) e adipogênico (C). Após 14 dias de ensaio, as monocamadas foram fixadas e coradas com *Alizarin red* para coloração de depósitos de cálcio e *Oil red* para gotículas de gordura. Barra de escala: 100um. N= 3 amostras.

### 5.5 Caracterização molecular por imunohistoquímica

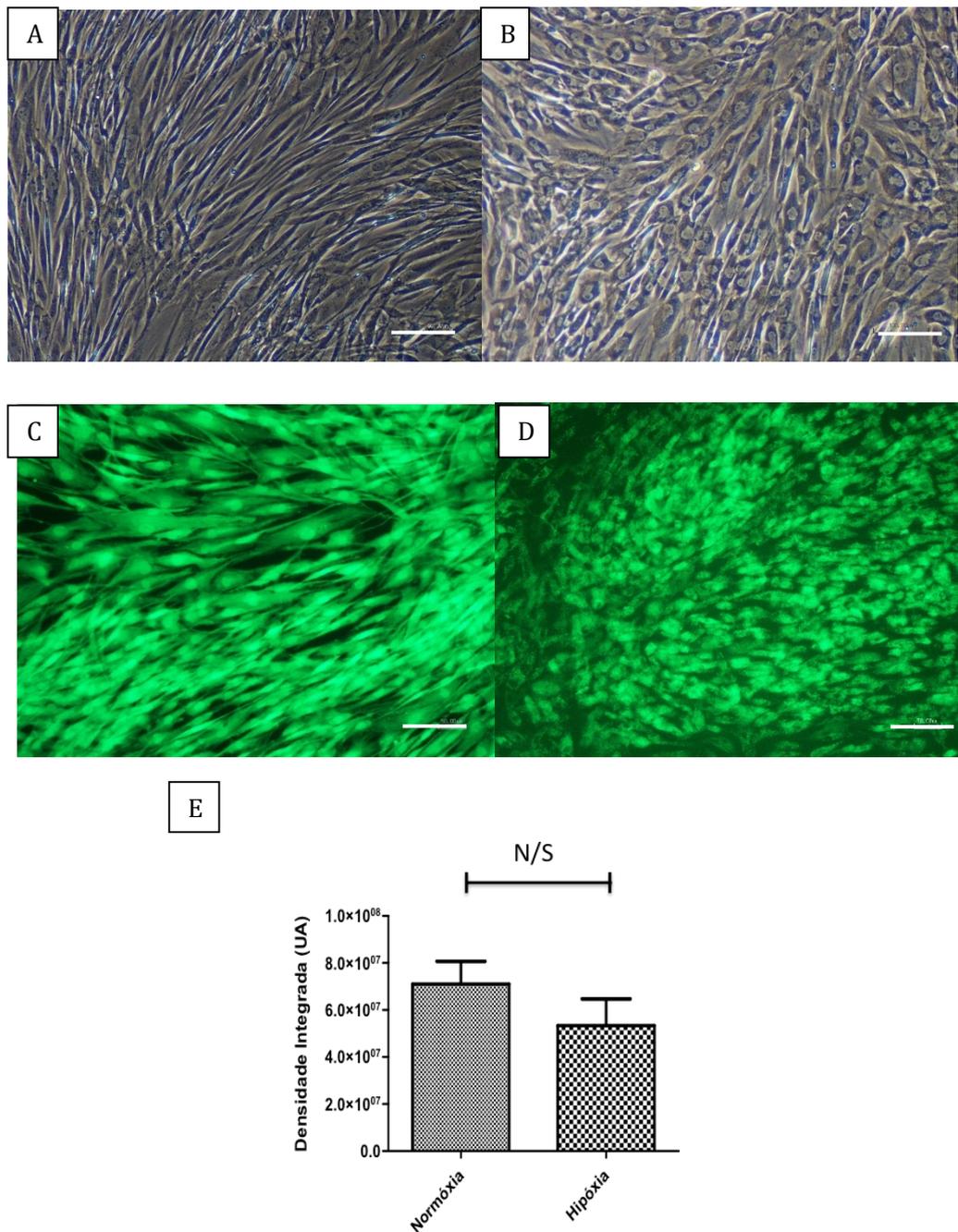
Com o objetivo de ratificar a origem mesenquimal, analisou-se a presença dos componentes celulares Col 4 (colágeno 4), PDGFR $\beta$  (Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas), NG2 (Antígeno neural/gliial 2) e  $\alpha$ -SMA (Alfa actina de músculo liso) em CTM-AD. As células isoladas apresentaram expressão positiva para Col4, proteína integral de matriz extracelular e para o receptor tirosina quinase PDGFR $\beta$ . A população celular não apresentou marcação para NG2 (proteoglicano integral de membrana), observou-se também marcação de 0,4% de células positivas para  $\alpha$ -SMA, marcador miogênico. Resultados obtidos por imunofluorescência demonstraram que as células nas passagens 3 e 6 apresentaram fenótipo de uma CTM (figura 11).



**Figura 11. Imunofluorescência das proteínas Col IV,  $\alpha$ -SMA, PDGFR $\beta$  e NG2.** Fotomicrografia de CTM-AD demonstra expressão de proteínas integrais de matriz extracelular Col4, receptor membranar PDGFR $\beta$ , e citoesqueleto ( $\alpha$ -SMA). Apenas 0,4% de células positivas para  $\alpha$ -SMA e ausência de positividade para NG2. Barra de escala: 50 $\mu$ m. N=2 amostras.

## 5.6 Condicionamento nas condições de normóxia e hipóxia

No intuito de analisar a capacidade secretória em diferentes condições, as CTM-AD foram isentas de nutriente e acondicionadas em normóxia e hipóxia. Após 48hs de incubação coletou-se o MC, analisou-se a morfologia e a viabilidade celular (marcação com calceína-AM). Através da microscopia invertida, observou-se alterações morfológicas das amostras submetidas à hipóxia. O ambiente de hipóxia resultou no aumento do núcleo, arredondamento celular e maior formação de grânulos citoplasmáticos. O ensaio de calceína AM demonstrou que não houve alteração na viabilidade celular após o condicionamento em normóxia ou hipóxia. Células em normóxia preservaram sua morfologia original fibroblastóide. Desta forma, percebeu-se que apesar de induzir uma mudança morfológica, o pré-condicionamento em hipóxia não alterou a viabilidade da célula (figura 12).

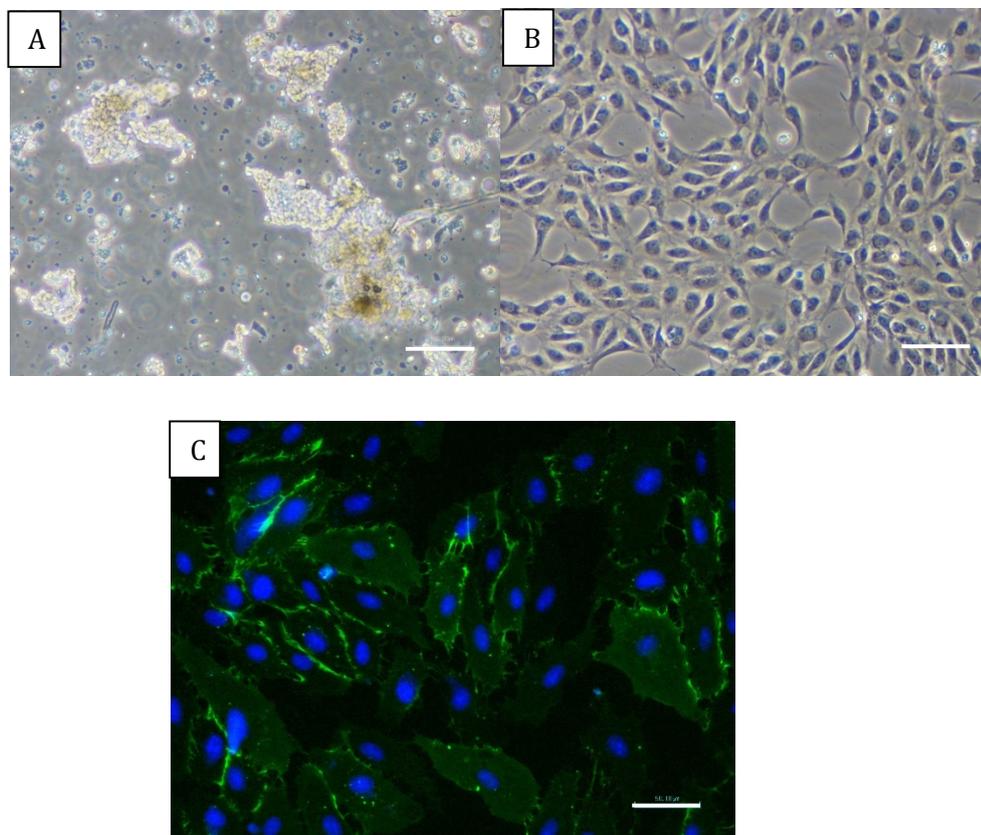


**Figura 12. CTM-AD submetidas às condições de normóxia e hipóxia marcadas positivamente para a calceína. (A,C) Células pre-condicionadas em normóxia. (B,D) células após hipóxia. (E) Densidade integrada das condições analisadas. Barra escalar: 100  $\mu$ m. N=3 amostras. Nenhuma significância estatística.**

### **5.7 Isolamento de células endoteliais de cordão umbilical (HUVEC) e imunofluorescência para CD31**

HUVEC foram utilizadas nos ensaios de migração, proliferação, viabilidade e tubulogênese, afim de testar o potencial angiogênico dos meios condicionados coletados. Células endoteliais cultivadas em EGM-

2suplementado com fatores, apresentaram morfologia poligonal em decorrência a sua aderência ao plástico (figura 13) e marcação positiva para CD31 (PECAM), molécula de adesão celular presente em células endoteliais.



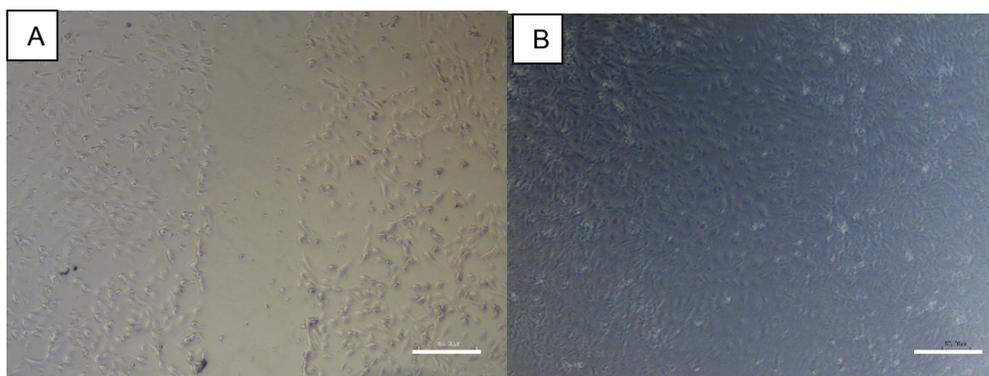
**Figura 13. Fotomicrografia de HUVEC por contraste de fase e marcação para CD31.** (A) Disposição em clusters e aspecto refringente das HUVEC recém isoladas. (B) Cultura aderente de HUVEC, segunda passagem, apresentação em formato poliglona. (C) Imunofluorescência com marcação nuclear (DAPI, azul) e CD31 (em verde). Barra de escala:100µm. N= 6 amostras.

### 5.8 Avaliação *in vitro* da capacidade migratória das HUVEC (*scratch wound assay*)

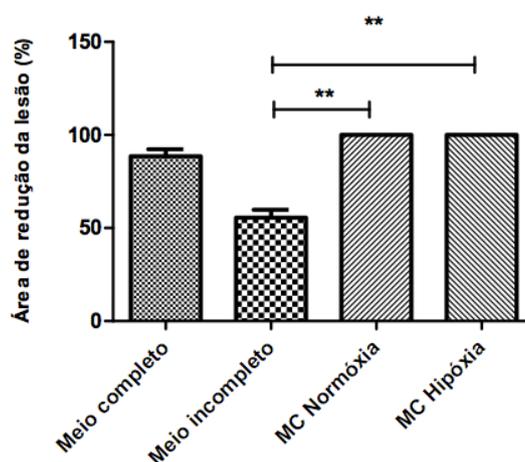
Este ensaio foi realizado para avaliar o efeito do MC sobre a capacidade de migração celular das HUVEC. A migração celular é um passo importante na restauração da integridade (área lesionada) da monocamada celular, indicativo da presença de proteínas com ação quimiotática no MC e importante na regeneração celular.

A medida da área recoberta após a lesão na presença dos MCs, demonstrou que os MCs de normóxia e hipóxia induziram a reparação da

monocamada através da migração celular (figura 14). Após 18 horas, o Meio incompleto recuperou  $\pm 53\%$  da área lesionada, enquanto os MCs recuperaram 100%. Diferenças estatísticas entre os MC de normóxia e hipóxia foram obtidas quando comparados ao meio incompleto,  $**p < 0.01$  (Gráfico 3).



**Figura 14.** Figura ilustrativa do ensaio de migração utilizando HUVEC. Monocamada lesionada na região central em tempo 0 (A) e sua reconstituição após 18hs (B). Barra de escala: 100 $\mu$ m. N=4 amostras.

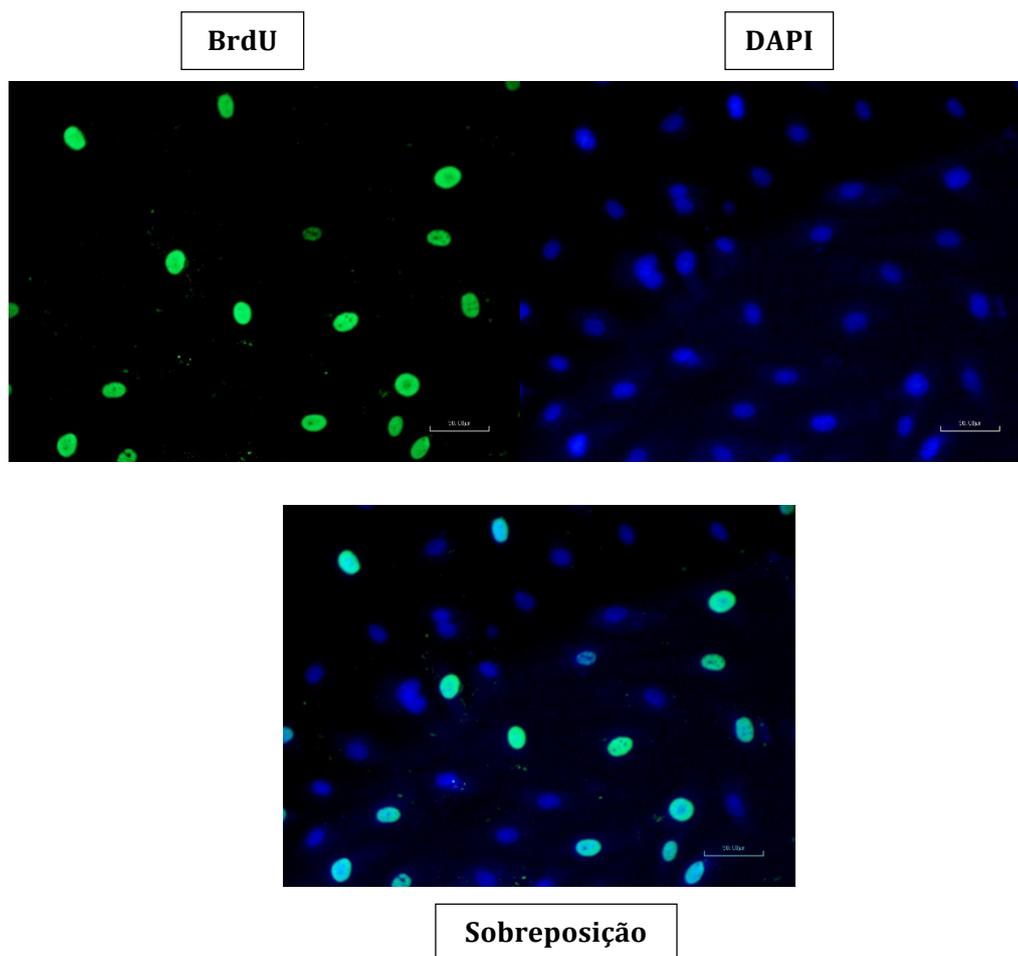


**Gráfico 3.** Avaliação da capacidade migratória das HUVECs expostas aos MC de hipóxia e normóxia. Meios condicionados de normóxia e hipóxia apresentaram melhor efeito migratório que o meio incompleto e resultados semelhantes ao meio completo  $**p < 0.01$ . N = 3 amostras.

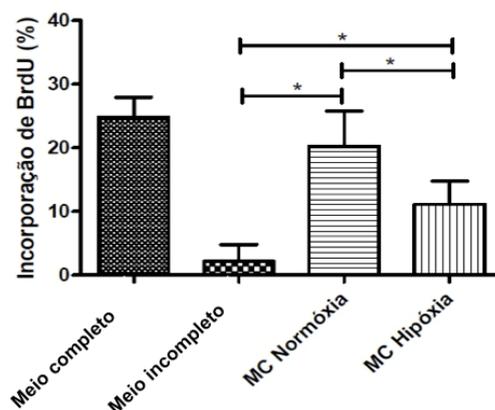
### 5.9 Avaliação *in vitro* da proliferação celular de HUVEC

O ensaio de incorporação de BrdU teve como objetivo avaliar a proliferação de HUVEC sincronizadas com os MC de normóxia e hipóxia.

Células na fase S do ciclo celular foram marcadas positivamente para a presença de BrdU (verde) no interior da região nuclear (figura 15). HUVEC cultivadas com os MC apresentaram maior capacidade proliferativa quando comparadas a HUVEC cultivadas com meio incompleto. Entretanto, o MC normóxia demonstrou maior potencial proliferativo sob as células endoteliais que o MC hipóxia (análise estatística com  $*p < 0.05$ ). Uma percentagem de  $\pm 21\%$  de células incorporaram BrdU na presença do MC normóxia e  $\pm 13\%$  em cultivo com MC hipóxia (gráfico 4).



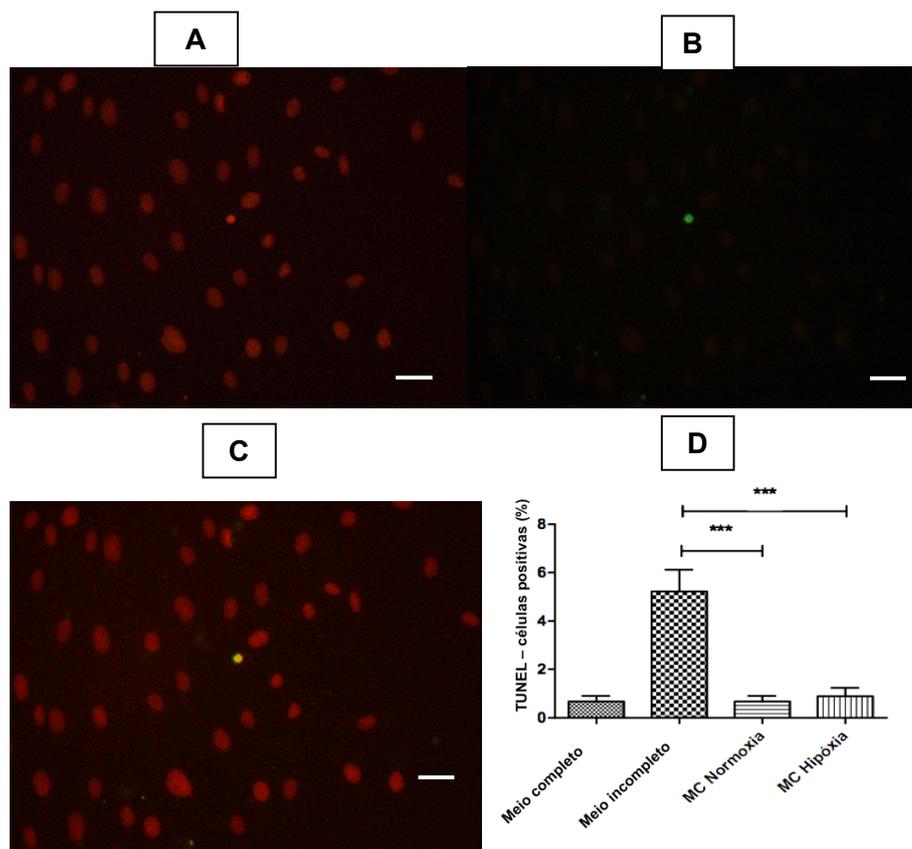
**Figura 15. Ensaio de incorporação de BrdU em HUVEC.** Fotomicrografia de núcleos celulares marcados positivamente para BrdU (verde), população nuclear total identificada por DAPI (azul) e sobreposição das imagens.



**Gráfico 4. Representação gráfica do ensaio de incorporação de BrdU em HUVEC.** MC normóxia induziu uma maior proliferação em HUVEC quando comparado ao meio incompleto e MC hipóxia. MC hipóxia apresentou diferença estatística quando comparado ao meio incompleto. \*  $p < 0.05$ . N= 3 amostras.

### 5.10 Avaliação *in vitro* da viabilidade das HUVEC

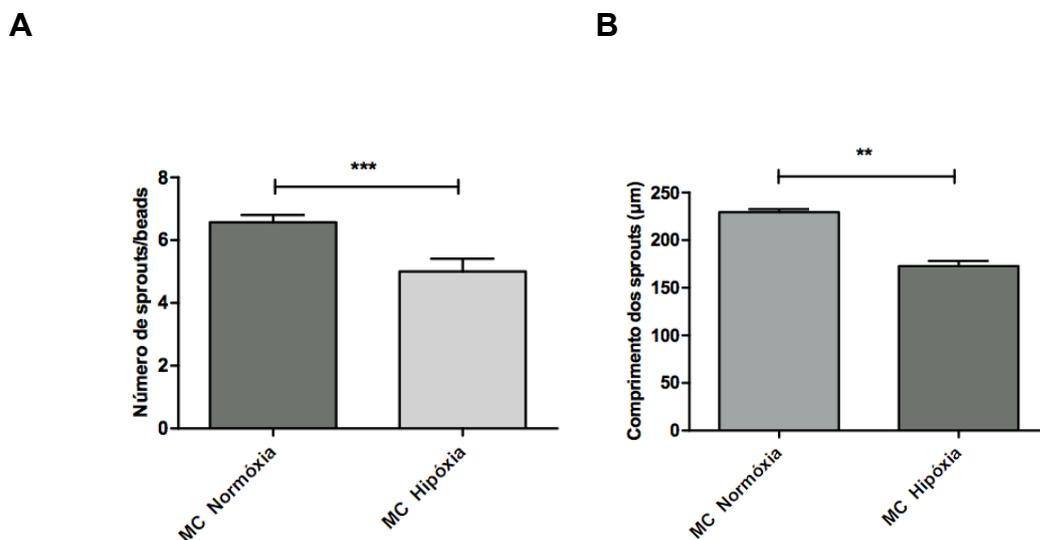
Realizou-se o ensaio de TUNEL com o objetivo de avaliar o potencial efeito dos MC sob a manutenção da viabilidade em HUVEC. O método de TUNEL permite a identificação de células em apoptose tardia, através da marcação da fragmentação de DNA nuclear. O resultado deste ensaio foi expresso como percentagem de células apoptóticas (TUNEL +) em uma população total de aproximadamente 100 células/quadrante. Células HUVEC tratadas com meio incompleto por 24 horas apresentaram um alto índice de apoptose (TUNEL +), com significativa redução na viabilidade celular, comparado ao meio completo. Nossos resultados demonstraram um baixo número de células em apoptose (com núcleos picnóticos) nas HUVEC tratadas com MC. Não se observou diferença na significância estatística entre MC de normóxia e hipóxia, indicando que ambos possuem características anti-apoptóticas e exerceram um efeito positivo sobre a manutenção da integridade celular, semelhante ao meio completo (controle negativo de morte celular) (figura 16).



**Figura 16. MC de CTM-AD inibiram a apoptose das células endoteliais. (A, B, C)** Imagens representativa do ensaio de TUNEL; (A) Marcação do núcleo celular com iodeto de propídeo; (B) Célula positiva para TUNEL; (C) Sobreposição das marcações com iodeto de propídeo e TUNEL; (D) Representação gráfica dos dados obtidos: meios condicionados de normóxia e hipóxia apresentaram boa capacidade anti-apoptótica sobre as HUVEC, resultado indica que estes possuem em sua composição mediadores responsáveis pela manutenção da viabilidade celular. \*\*\*  $p < 0.001$ . Barra de escala: 50 $\mu$ m. N=4 amostras.

### 5.11 Avaliação *in vitro* do potencial angiogênico em HUVEC

Utilizou-se o modelo de tubulogênese estabelecido por (NAKATSU & HUGHES, 2008) para a análise do efeito angiogênico dos meios condicionados de CTM-AD. Este ensaio foi realizado em duplicata e durou um período de 5 dias. Ambos os MC induziram a formação de estruturas tubulares (figura 17), evidenciadas desde o segundo dia de incubação. Entretanto, o MC de normóxia apresentou maior capacidade de estimulação do brotamento de estruturas tubulares (\*\*\*)  $p < 0.001$  e maior comprimento destes (\*\*  $p < 0.01$ ) (gráfico 5).



**Gráfico 5. Meio condicionado de CTM-AD em normóxia apresentou maior potencial angiogênico em modelo de microesferas.** (A) Mensuração do comprimento de sprouts e (B) quantificação do número de sprouts/microesferas. \*\* p< 0.01 \*\*\* p< 0.001. N=3 amostras.

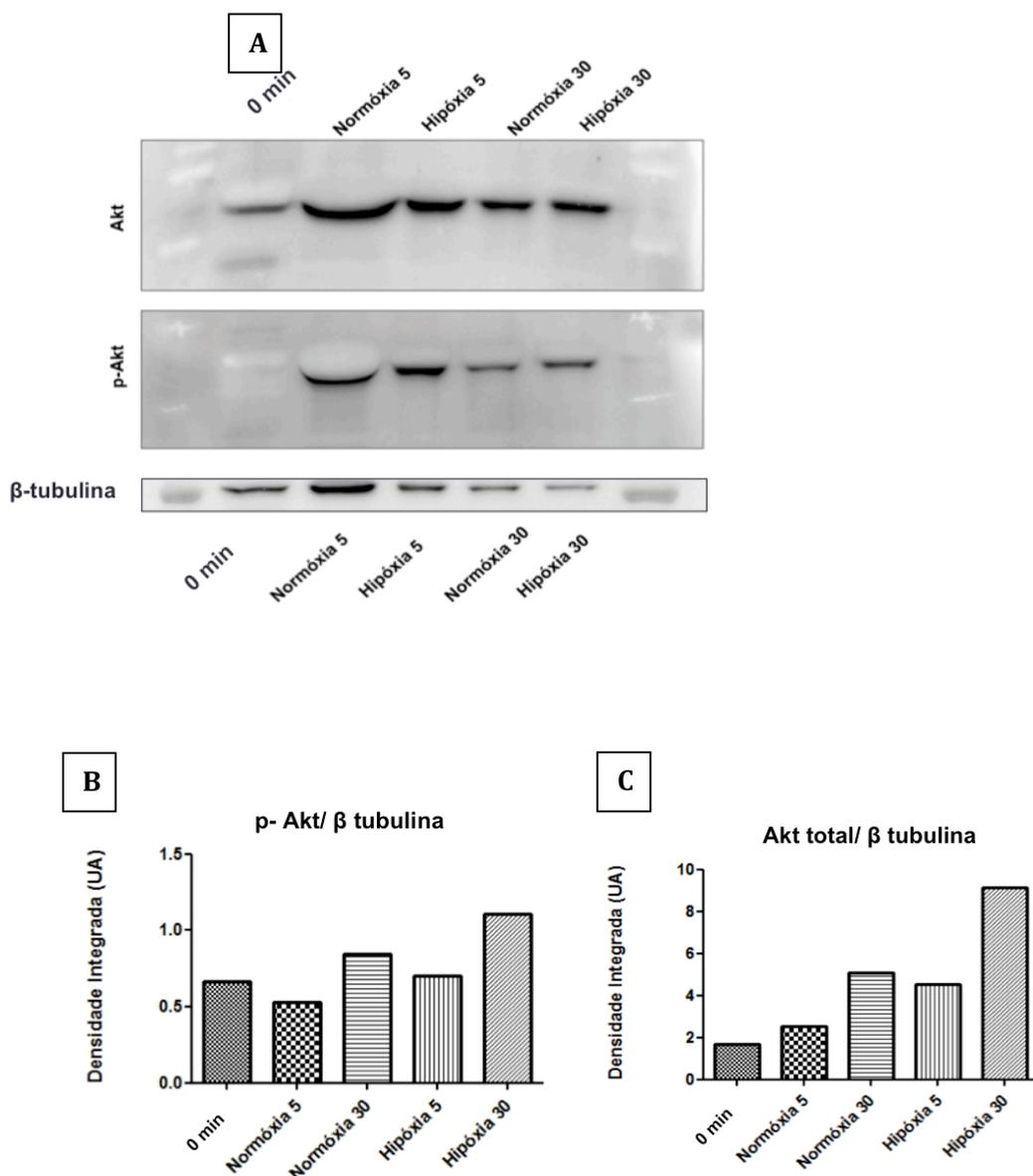


**Figura 17. Imagens ilustrativas do ensaio de tubulogênese** (A) Formação de estruturas tubulares com dois dias de experimento. (B) Quinto e último dia de ensaio. (C) Controle negativo. Barra de escala: 50µm. N=3 amostras.

## 5.12 Western Blot

Para melhor compreensão dos efeitos promovidos pelos MC, analisou-se a expressão das proteínas Akt e p-Akt em extratos celulares de HUVEC. Após 24hna ausência de soro, as HUVEC foram incubadas com MC (normóxia e hipóxia) por 5 e 30 minutos. Ambas as proteínas analisadas participam da via

de sinalização, em etapas iniciais, PI3K/Akt/mTOR e são responsáveis por ativar uma cascata de eventos envolvidos com a regulação do ciclo celular. Os dados de Western blot demonstraram que em ambas condições houve ativação da via Akt, evidenciado pela expressão das proteínas Akt e p-Akt (figura 18).



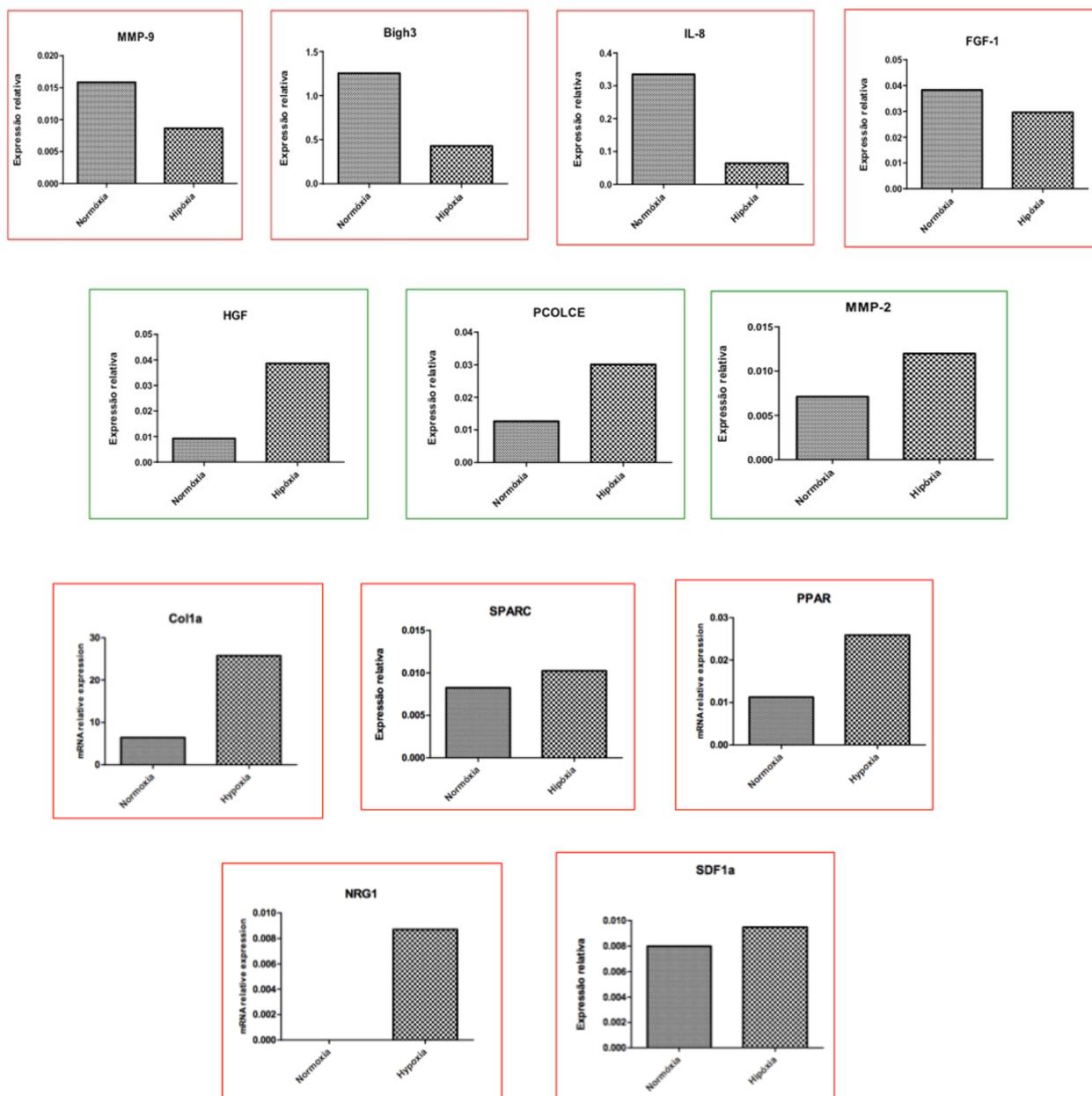
**Figura 18. Níveis de expressão das proteínas Akt e p-Akt em meios condicionados de CTM-AD.** (A) Fotomicrografia da expressão de p-Akt, Akt e beta-tubulina em membranas de Western Blot (B,C) Quantificação da expressão de p-Akt e Akt em HUVEC cultivadas com MC normoxia e hipoxia em 5 e 30 min. N= 1 amostra.

### 5.13 Caracterização molecular das CTM-AD

Com o objetivo de analisar a expressão dos transcritos gênicos envolvidos na caracterização e angiogênese em CTM submetidas a condições de normóxia e hipóxia, realizou-se a técnica de qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real). Os genes analisados foram: IL8, HGF, NRG1, Beta-igh3, Pcolce, THBS, vWF, PDGFr, VEGF, SDF1, Ang1, FGF1, Col4, Eng, MCAM, CD90, CD34, CD14, CD31, KDR, FLT1, PPAR, SPARC e MMP9.

A presença de transcritos foi demonstrada por meio de gráficos da expressão relativa. Comparou-se os níveis de expressão gênica entre os extratos celulares submetidos à normóxia e hipóxia, por 48 horas. Os resultados foram normalizados utilizando os genes endógenos: HPRT, HMBS E GAPDH. Entretanto, por apresentar maior estabilidade em ambas as condições, utilizou-se o gene endógeno GAPDH para a exposição dos dados.

Genes envolvidos na promoção da angiogênese e degradação da matriz celular foram expressos em CTM-AD em ambas as condições de normóxia e hipóxia. FGF, PDGFR, IL-8, Bigh3, Col4 e MMP-9 apresentaram maior expressão no MC de normóxia, contudo, os transcritos para HGF, MMP-2, PCOLCE, Col1, NRG1 e PPAR foram mais expressos no MC de hipóxia (gráfico 6). Os resultados demonstraram que o condicionamento por 48 horas, em normóxia e hipóxia, levou à expressão diferenciada de transcritos envolvidos no processo de formação dos vasos sanguíneos. Todavia, a variação da pressão de oxigênio não alterou a expressão de transcritos envolvidos na caracterização de CTM.



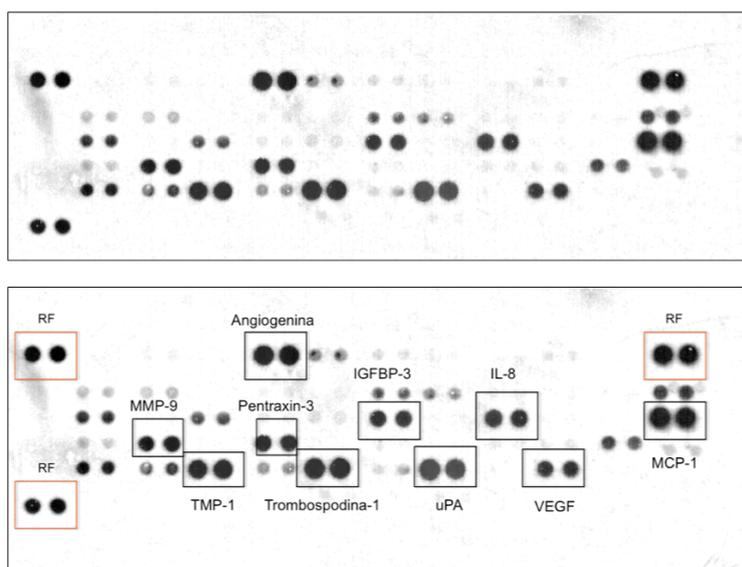
**Gráfico 6. Expressão de transcritos em CTM-AD normóxia e hipóxia.** CTM-AD em condições de normóxia e hipóxia apresentaram expressão de transcritos envolvidos no processo de degradação da matriz celular e angiogênese. N= 3 amostras.

#### 5.14 Perfil proteômico do meio condicionado de normóxia

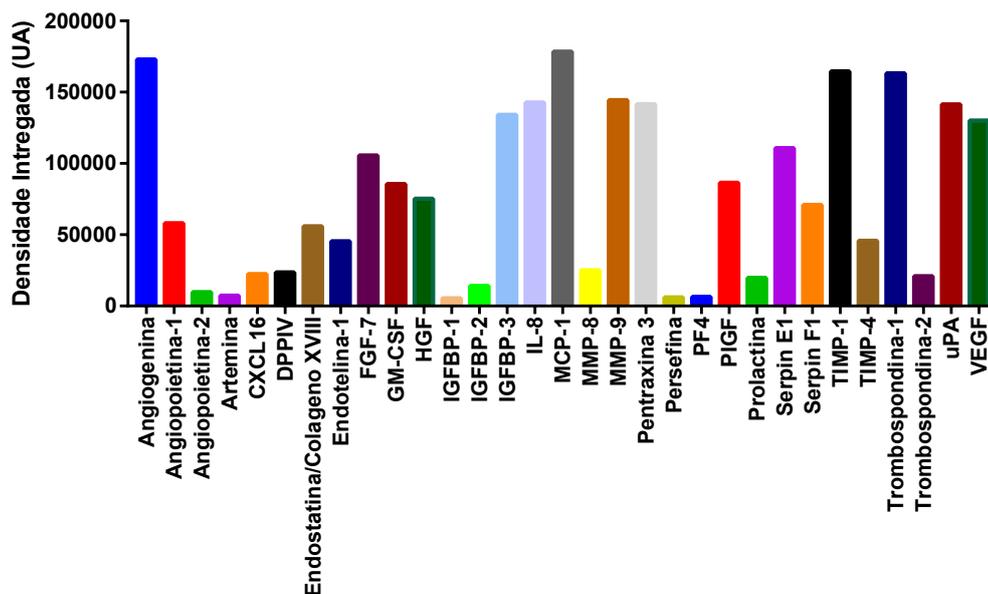
Afim de analisar o perfil de expressão de proteínas envolvidas no processo de angiogênese em MC normóxia, realizou-se o ensaio de Array com o kit da Human Angiogenesis Antibody Array (R&D systems<sup>TM</sup>). MC normóxia foi selecionado para este ensaio devido aos seus efeitos positivos sob indução

da proliferação, angiogênese e migração das HUVEC. Neste ensaio, analisou-se a expressão 55 proteínas. Fatores pró angiogênicos: Angiogenina, Angiopoietina 1/2, Artemina, CXCL6, FGF-7, GM-CSF, HGF, IGFBP-1/2/3, IL-8, MCP-1, MMP9, Pentraxina-3, Persefina, PIGF e VEGF foram detectados no teste (gráfico6). Assim como, alguns mediadores anti-angiogênicos: DPPIV, Endostatina, Endotelina, PF4, Prolactina, Serpin E1/F1, TIMP 1/4, Trombospondina 1/2 e uPA. Uma maior expressão de Angiogenina, MMP-9, IL-8, IGFBP-3, Pentraxina-3, MCP-1, TIMP-1, Trombospondina, uPA e VEGF foi evidenciada (figura 19).

MC normóxia mostrou agregar em sua composição um conjunto de fatores envolvidos com o processo de angiogênese. A função antagonica de alguns fatores detectados, evidenciou a multifuncionalidade do MC.



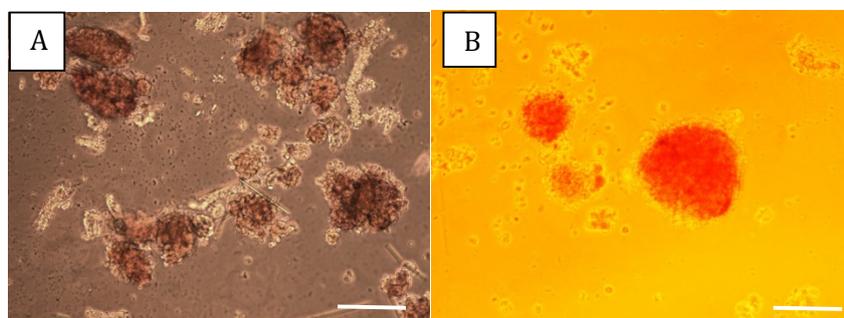
**Figura 19. Detecção de fatores pro e anti- angiogênicos em meio condicionado de normóxia.** MC de normóxia apresentou valores elevados de Angiogenina, MMP-9, IL-8, IGFBP-3, Pentraxina-3, MCP-1, TIMP-1, Trombospondina, uPA e VEGF, componentes envolvidos diretamente no processo de angiogênese e degradação da matriz extracelular. N= 1 amostra.



**Gráfico 7. Quantificação de fatores pró e anti angiogênicos em meio condicionado de normóxia.** MC de normóxia apresentou em sua composição um mix de mediadores importantes para a promoção da angiogênese, assim como inibição deste processo. Presença de fatores antagonísticos demonstra o potencial diversificado do MCN de CTM-AD. N= 1 amostra.

### 5.15 Isolamento de ilhotas pancreáticas de rato

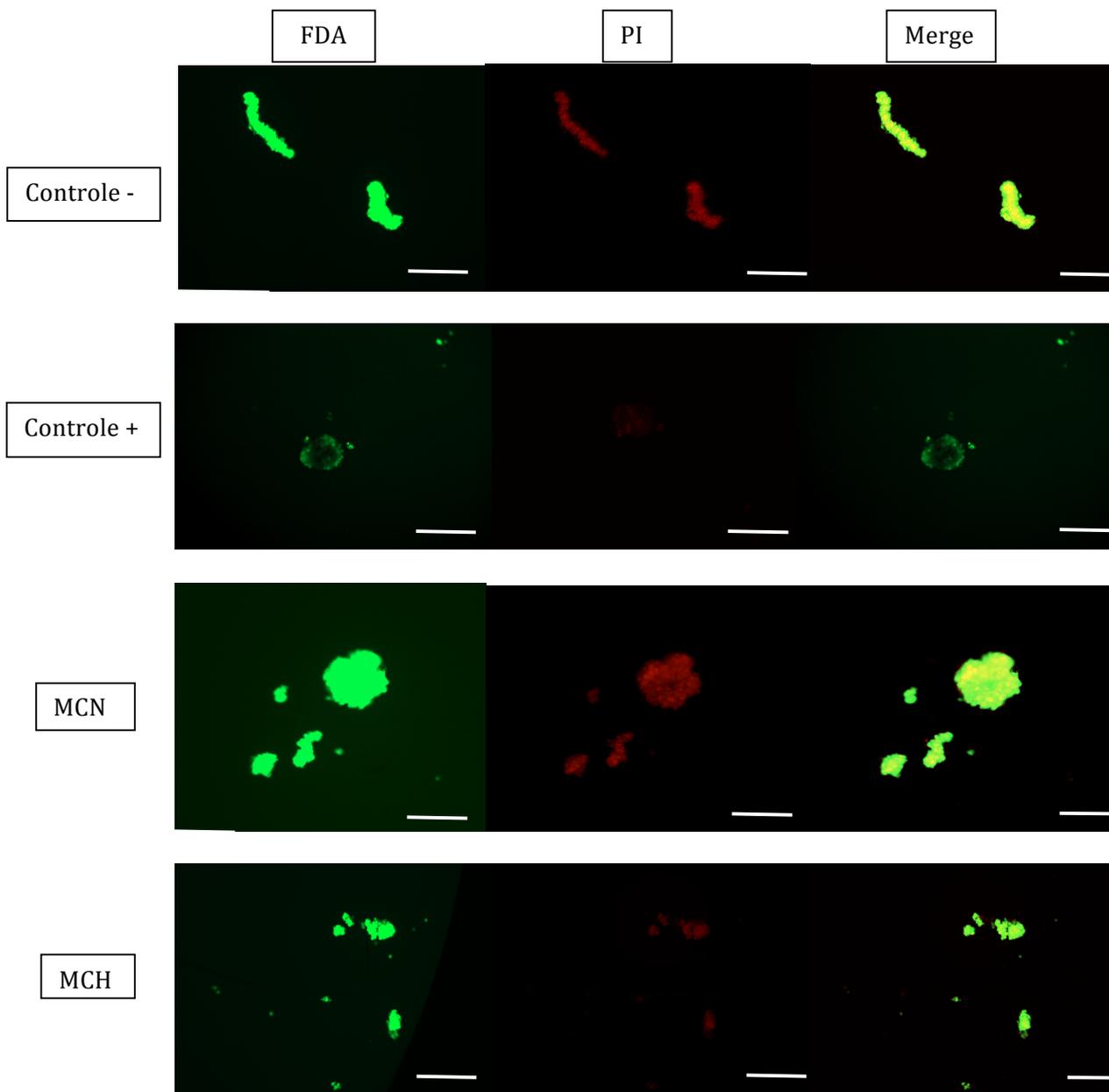
Para avaliar os potenciais efeitos dos MC de CTM-AD sob a manutenção da integridade de ilhotas pancreáticas, isolou-se ilhotas pancreáticas de ratos Wistar. As ilhotas isoladas apresentaram tamanhos variados de 100µm a 200µm e coloração avermelhada quando coradas com ditizona, corante que se liga aos grânulos intracelulares de insulina nas células beta (figura 20).



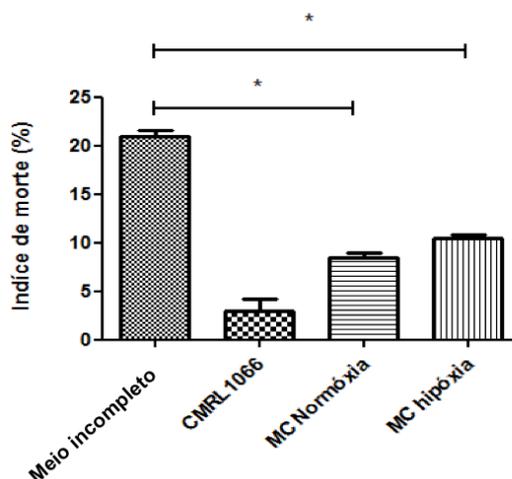
**Figura 20. Ilhotas pancreáticas isoladas de rato.** (A) População heterogênea formada por ilhotas pancreáticas e ácinos anteriormente à purificação. (B) Ilhotas pancreáticas recém purificadas e marcadas com ditizona. Barra de escala: 100µm. N=3 amostras.

### **5.16 Ensaio *in vitro* de viabilidade das ilhotas**

Para analisar o potencial efeito dos MC sob a viabilidade das ilhotas pancreáticas de ratos Wistar, utilizou-se a marcação com FDA. As ilhotas pancreáticas foram cultivadas nas seguintes condições: A) em meio EGM-2 + 3% de BSA, B) meio CMRL 1066, C) MC normóxia, D) MC hipóxia, por 24hs. Células mortas apresentaram marcação para iodeto de propídio (em vermelho) e células viáveis foram marcadas com FDA (em verde) (figura 21). Ilhotas tratadas com os MC e mantiveram viáveis, não apresentando diferenças estatísticas entre as condições de normóxia e hipóxia. Os dados encontrados foram similares aos obtidos em ilhotas cultivadas em meio CMRL 1066 (gráfico 8), demonstrando potencial efeito anti-apoptótico de ambos os MC.



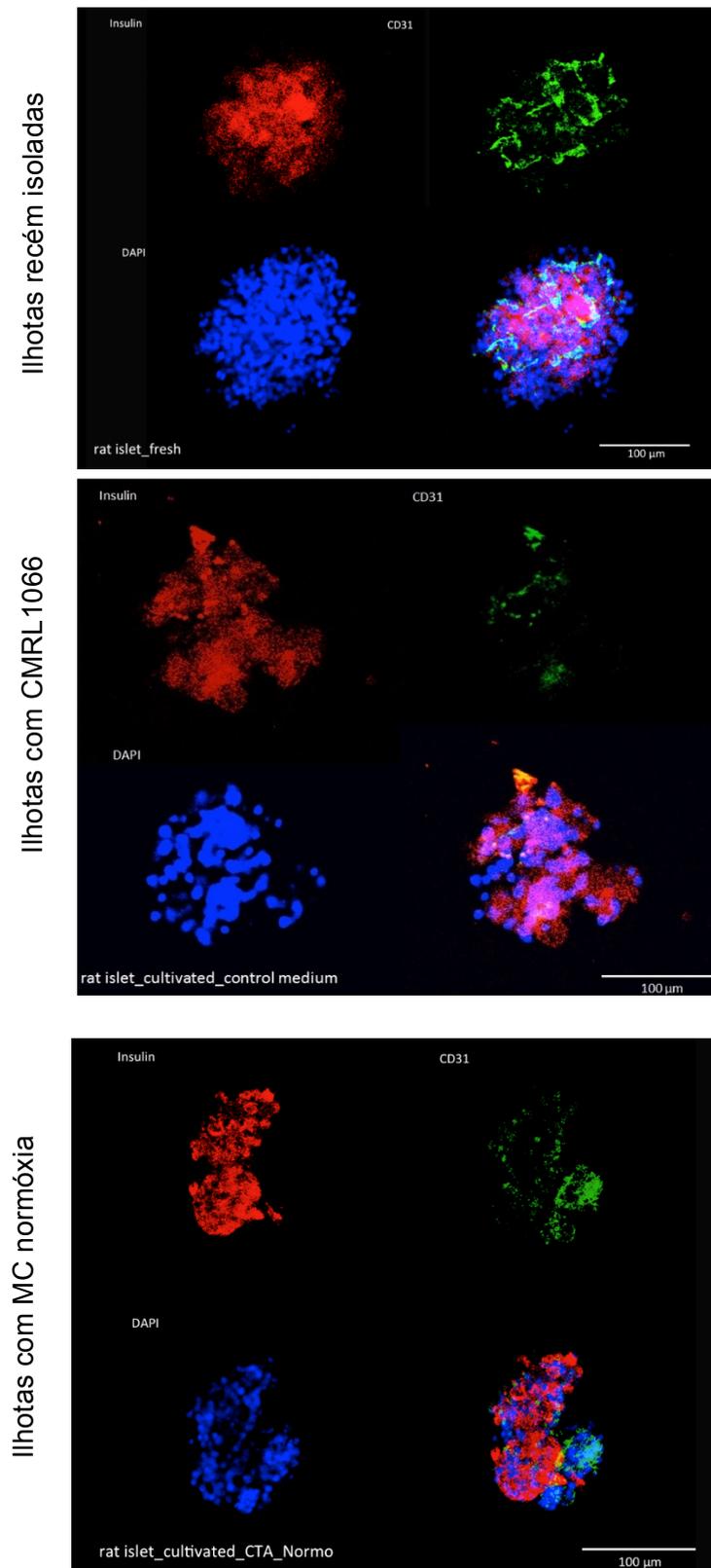
**Figura 21. Imagens representativas de ilhotas pancreáticas cultivadas em MCN, MCH e controles.** Marcação células vivas por FDA (verde), núcleo de células mortas por PI (vermelho). Controle negativo: CMRL 1066, controle positivo: EGM-2, MCN: meio condicionado normóxia, MCH: meio condicionado hipóxia. Barra de escala: 100 $\mu$ m. N=3 amostras.



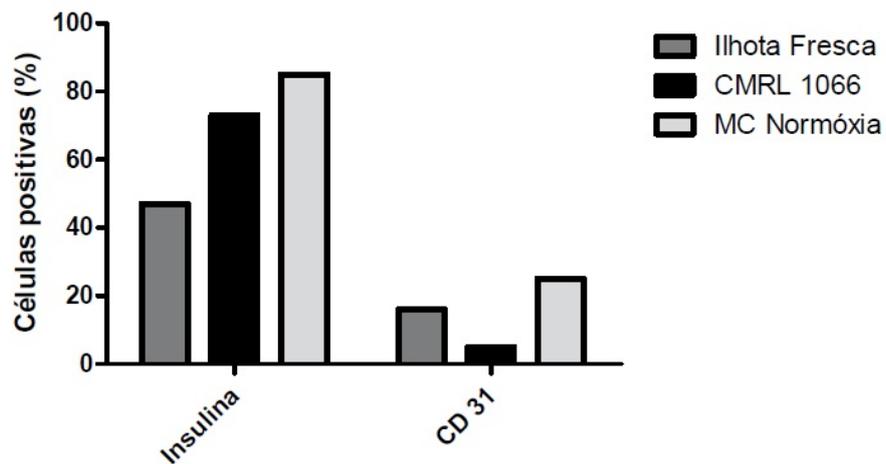
**Gráfico 8. Manutenção da viabilidade celular das ilhotas após cultivo com MCN e MCH.** Os meios condicionados reduziram o índice de morte celular e promoveram a manutenção das amostras assim como o controle negativo. MCN: meio condicionado normóxia, MCN: meio condicionado hipóxia. \*  $p < 0.05$ .  $N=3$  amostras.

### 5.17 Avaliação da expressão de insulina e morfologia de células endoteliais em ilhotas na presença de meio condicionado

Com o objetivo de avaliar o efeito do MC de normóxia sob ilhotas pancreáticas murinas, analisou-se o conteúdo de insulina (marcação com anticorpo anti-insulina) e a morfologia das células endoteliais (marcação com anticorpo anti-CD31) em ilhotas frescas. Este ensaio utilizou apenas o MC normóxia devido ao seu melhor desempenho na indução da proliferação de HUVEC e formação de estruturas tubulares, evidenciado nos ensaios anteriores. As ilhotas recém isoladas apresentaram típica morfologia de vasos sanguíneos, característica evidenciada pela marcação com CD31 e positividade para a presença de insulina em seu interior. Ilhota tratada com MC de normóxia obteve melhor resultado quanto a expressão de insulina, quando comparada as ilhotas recém isoladas e cultivadas com meio CMRL1066 (gráfico 9). Entretanto, apesar de apresentar células endoteliais viáveis, a ilhota tratada com MC normóxia demonstrou perda da morfologia supracitada (figura 22).



**Figura 22. Imunofluorescência para marcação de insulina (vermelho), CD31 (verde) e DAPI (azul) em ilhotas pancreáticas murinas. Análise da funcionalidade e viabilidade de ilhotas recém isoladas, cultivadas com meio CMRL 1066 e MC normóxia. Barra de escala = 100 µm. N=1 amostra.**



**Gráfico 9. Representação gráfica da marcação para insulina e CD31.** Ilhota cultivada com MC normóxia exibiu maior expressão de insulina que a ilhota fresca e cultivada com CMRL 1066. MC normóxia exerceu efeito anti-apoptótico e preservou a viabilidade das células endoteliais intra ilhota N = 1 amostra.

## 6 DISCUSSÃO

O transplante de ilhotas pancreáticas é uma alternativa promissora para o tratamento do DT1. Entretanto, a diminuição da viabilidade, após o isolamento e cultivo das ilhotas pancreáticas, é um determinante para o insucesso dos transplantes (YAMADA et al, 2014). Após o processo de isolamento há rompimento das conexões vasculares entre o enxerto e a circulação sistêmica, ocasionando escassez de nutrientes e estresse oxidativo. Estudos demonstram que o cultivo de ilhotas pancreáticas com MC de CTM induz mudanças na expressão de genes envolvidos na angiogênese e sobrevivência celular, permitindo a revascularização, manutenção da integridade do enxerto e reversão do quadro hiperglicêmico pós-transplante (PARK et al, 2010/ BHANG et al, 2013/ FRANSSON et al, 2015/REKITTKE et al, 2016). Neste âmbito, as CTM atuam como alternativa para a otimização do transplante de ilhotas e reversão do DT1.

As células aderentes ao plástico isoladas da fração vascular estromal apresentaram características de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Após uma semana em cultivo, as células demonstraram morfologia fibroblastóide com núcleo na região central, plasticidade para diferenciação em linhagens mesodermis adipogênica e osteogênicae exibiram marcadores fenotípicos de população mesenquimal, corroborando os critérios estabelecidos pela International Society for Cellular Therapy (BOURIN et al, 2013). As CTM-AD submetidas à adipogênese apresentaram mudanças em sua morfologia com presença de gotículas de gordura no interior do citoplasma, enquanto as células submetidas à osteogênese foram evidenciadas pela presença da matriz mineralizada em seu fenótipo. Devido a fácil obtenção, plasticidade celular e capacidade de expansão, as CTM-AD, apresentam potencial para a terapia celular (PENG et al, 2008/ ZUK et al, 2001).

A cinética de crescimento das CTM-AD durante o período avaliado (passagens 0-19) foi homogênea e constante. O tempo de dobramento cumulativo/passagem foi de  $1.18 \pm 0,92$  dias (media  $\pm$  desvio padrão) e o tempo de dobramento populacional, ao longo dos 100 dias foi de  $20,14 \pm 1.30$  (media  $\pm$  desvio padrão). Até o centésimo dia, as células apresentaram-se

viáveis, proliferativas, preservando seu estado indiferenciado e demonstraram uma relação linear entre o tempo acumulado de duplicação da população e o número da passagem. Este dados foram consistentes com os dados encontrados por DING e colaboradores(2013), com tempo de dobramento populacional de  $21.5 \pm 2,3$ . Kalinina et al, (2015) avaliou CTM-AD proveniente de 10 pacientes e descreve que o tempo de dobramento variou entre 68 a 165 hr e que esta variação não correlacionou-se a IMC, idade ou raça dos pacientes. O tempo de dobramento cumulativo de  $2,7 \pm 0,5$  CTM de medula óssea (BARTMANN, et al 2007)são equivalentes ao observado neste trabalho, demonstrando que as CTM-AD isoladas e caracterizadas neste trabalho possuem boa capacidade proliferativa e potencial para utilização na terapia celular (IKEBE & SUZUKI, 2014).

As CTM-AD submetidas à normóxia e hipóxia apresentaram-se viáveis após 48hs segundo coloração com calceína AM. Ambos os MC coletados apresentaram níveis proteicos elevados e alta atividade de fosfatase alcalina (dados não mostrados), indicando alta atividade secretória, não havendo diferenças estatísticas entre normóxia e hipóxia. Diferente do que foi descrito anteriormente (REHMAN et al, 2004/ LIU et al, 2013/ EDWARDS et al, 2014/ PHAM et al, 2016), o condicionamento de CTM-AD em hipóxia não promoveu um crescimento na atividade secretória além do que já se observou em normóxia. Isto pode ser justificado pelo fato do tecido adiposo ser um órgão bem vascularizado, apresentando CTM-AD anatomicamente localizadas em nichos com considerável pressão parcial de oxigênio. No entanto, células em hipóxia exibiram mudança para um fenótipo arredondado com maiores formações granulares ao redor do citoplasma. A manutenção na viabilidade celular e alteração do fenótipo pode ser explicado pela mudança da resposta celular, uma vez que o ambiente de hipóxia aumenta a síntese de ROS – importante para a sobrevivência, proliferação e migração celular, através da ativação das vias de sinalização AKT/ERK1 e 2, com estimulação da expressão de transcritos (KIM et al, 2011/ KIM et al, 2012/ BURAKOVA et al, 2014).

O efeito angiogênico dos MC foi analisado pelos ensaios de migração, proliferação e tubulogênese. Nossos resultados indicam que ambos os MC de

normóxia e hipóxia promoveram de forma equivalente a migração de HUVEC. No entanto, MC de normóxia induziu maior proliferação celular e maior capacidade de formação de estruturas tubulares em géis tridimensionais (3D) de fibrina comparado ao MC hipóxia. Portanto, nossos resultados indicam que o MC normóxia possui maior potencial angiogênico que o MC hipóxia. Estes resultados são distintos e estão parcialmente em acordo com o descrito previamente (LIU et al, 2013/FOTIA et al, 2015/ PARK et al, 2015/ PHAM et al, 2016/ GUO et al, 2016). A maioria da literatura ressalta que o meio condicionado de CTM-AD em hipóxia possui grande potencial na regeneração tecidual em modelos *in vitro* e pre-clínicos de lesão em vários tecidos (hepático, cutâneo, renal e cardiovascular entre outros) (RASMUSSEN et al, 2011; SUN et al, 2014; HE et al, 2015; QIN et al, 2015). Segundo estes e outros autores, o condicionamento de CTM-AD em hipóxia induziria a produção e secreção de fatores de crescimento e citocinas, como HGF, VEGF, GM-CSF e bFGF, que então seriam responsáveis pelos efeitos protetor e de reparo tecidual (ROSOVA et al, 2008/ SONG et al, 2010). Segundo Rasmussen et al, (2011), o MC de CTM-AD em hipóxia possui maior potencial angiogênico sobre células endoteliais devido a presença de maior quantidade de fatores de crescimento, como SDF-1, IGF-1 e VEGF.

Todavia, segundo estes mesmo autores (RASMUSSEN et al, 2011), a indução e super-expressão de genes pró-angiogênicos nas CTM-ADs, como VEGF e IGF-1 ocorreu principalmente por procedimentos de tripsinização e não apenas por hipóxia. Recentemente, um estudo descrevendo o perfil secretório de CTM-AD identificou mais de 600 proteínas no meio condicionado envolvidas com regeneração tecidual (KALININA et al, 2015). Neste trabalho, os autores identificaram 41 proteínas envolvidas com desenvolvimento de vasos sanguíneos e cujas quantidades são variáveis e dependentes das características dos sujeitos doadores (IMC, raça, idade). Neste mesmo trabalho, o condicionamento em hipóxia resultou na secreção de 6 proteínas novas e alteração na quantidade de outras 8 proteínas. Nenhuma destas proteínas alteradas pela hipóxia estavam envolvidas com angiogênese ou efeitos sobre células endoteliais. Segundo estes autores, o grande número de proteínas secretadas não foi afetado pela hipóxia e a variabilidade na secreção

de proteínas pelas CTM-AD foi devida principalmente pelas características dos sujeitos doadores do lipoaspirado. Portanto, nossos resultados de comparação do potencial angiogênico do MC normóxia e hipóxia pode ser melhor compreendido com base na variabilidade das características dos sujeitos doadores e nas condições de cultivo intrínsecas no nosso trabalho.

Os MC induziram a ativação da proteína Akt em HUVEC. Os resultados observados indicam que ambas as condições de normóxia e hipóxia induziram a ativação da via PI3K/Akt/mTOR (KIM et al, 2010). Segundo os autores, as quantidades significativas de ROS e de PDGF-beta, resulta na ativação do receptor PDGFR-beta, responsável por ativar as vias Akt e ERk1/2, envolvidas na sobrevivência e estimulação da migração celular (KIM & SUNG, 2012/ HOSSINI et al., 2016). Fatores como deprivação de nutrientes e baixa pressão parcial de oxigênio seriam responsáveis pelo aumento de ROS. Desta forma, resultados sugerem que os efeitos pro-angiogênicos e proliferativos dos MC sobre as HUVEC foram mediados pela ativação da via PI3K/Akt/mTOR.

CTM-AD em normóxia e hipóxia expressaram genes envolvidos angiogênese e migração celular. Análise proveniente da reação RT-qPCR demonstrou que FGF, PDGFR, IL-8, Bigh3, Col4 e MMP-9 apresentaram maior expressão em CTM submetidas à normóxia, enquanto HGF, MMP-2, PCOLCE, Col1, NRG1 e PPAR exibiram maior expressão em CTM submetidas à hipóxia. A incubação em hipóxia não alterou a expressão das moléculas de superfície celular. Em paralelo, o ensaio de análise do perfil proteômico do MC de normóxia detectou a presença dos seguintes fatores: Angiogenina, Angiopietina 1/2, Artemina, CXCL6, FGF-7, GM-CSF, HGF, IGFBP-1/2/3, IL-8, MCP-1, MMP9, Pentraxina-3, Persefina, PIGF, VEGF, DPPIV, Endostatina, Endotelina, PF4, Prolactina, Serpin E1/F1, TIMP 1/4, Trombospondina 1/2 e uPA, descritos na literatura (PARK et al, 2010/ REHMAN et al, 2004/ GUO et al, 2016). MC de normóxia apresentou maiores expressões de angiogenina (potente estimulador de crescimento de vasos sanguíneos – se liga a actina em células endoteliais e ativa a cascata proteolítica, está também associada a genes que suprimem a apoptose), MMP-9 (envolvida na quebra da matriz extracelular, importante para angiogênese e migração), IL-8 (atua em vários sítios-alvo, podendo promover a sinalização angiogênica em células

endoteliais), IGFBP-3 (inibidor de IGF-1 e IGF-2, potencial anti-proliferativo), Pentraxina-3 (estimula a neurogênese e angiogenese), MCP-1 (quimiocina angiogênica), TIMP-1 (inibidor de metaloproteinases, inibe a migração da MMP-9), Trombospondina, uPA (ativa o plasminogênio, relação direta com o mecanismo de trombólise) e VEGF (estimula vasculogênese e angiogênese)(CAPPUZELLO et al, 2015/KONALA et al, 2016). Estes resultados explicam que os efeitos pro-angiogênicos e proliferativos dos MC normóxia sobre HUVEC ocorreu devido a presença de tais fatores de reparo tecidual.

Com base nos resultados observados, o MC de normóxia manteve a viabilidade das ilhotas, a expressão de insulina em células beta e preservou a integridade das células endoteliais intra ilhota. Os meios condicionados reduziram o índice de morte celular e promoveram a manutenção das nas ilhotas pancreáticas, sem significância quando comparadas ao meio controle CMRL 1066. No entanto, ilhotas cultivadas com MC normóxia exibiu maior expressão de insulina quando comparada a ilhota cultivada com meio controle CMRL 1066. MC normóxia preservou a expressão de marcadores CD31 células endoteliais intra-ilhota, todavia, a morfologia característica dos vasos sanguíneos não foi preservada. Estes dados demonstraram que o MC normóxia apresentou efeito protetor, mantendo a viabilidade das células endoteliais. Contudo, novos experimentos deverão ser realizados com o objetivo de avaliar sua ação sobre a mudança do padrão morfológico dos vasos sanguíneos e uma possível indução da migração celular. Os fatores de crescimento detectados no MC de CTM-AD e o seu potencial efeito na ativação da via Akt em células endoteliais provavelmente contribuíram para a manutenção da viabilidade e manutenção de células endoteliais nas ilhotas pancreáticas (LI et al, 2014/ FIGLIUZZI et al, 2014/ REKITTKE et al, 2016/ GUO et al, 2016).

Estudos recentes indicam que as ilhotas pancreáticas isoladas reduziram a expressão de CD31 e de insulina após 24h de cultivo em condições controle (CMRL 1066) através de um mecanismo de sinalização mediado por ALK5 (CLARKIN et al, 2013; KING et al., 2015). Nossos resultados no entanto demonstram que o cultivo de ilhotas pancreáticas em MC

produzido por CTM-AD pode representar uma alternativa satisfatória para preservar a expressão de insulina, e a viabilidade da ilhotas antes de serem destinadas ao transplante enxertadas. O MC de CTM-AD contribuiria para melhores resultados no transplante pois promoveria ilhotas com maior viabilidade e maior potencial de angiogênese. Os fatores proteicos identificados no MC de CTM-AD estariam envolvidos no suporte a manutenção da viabilidade das células da ilhota pancreática.

## 7 CONCLUSÃO

- As células isoladas de lipoaspirado preencheram os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para uma CTM-AD.
- Os meios condicionados obtidos em condições de normóxia e hipóxia apresentaram fatores solúveis capazes de aumentar a viabilidade, proliferação, induzir a migração e brotamento angiogênico em HUVEC.
- O meio condicionado de normóxia apresentou maior capacidade angiogênica em HUVEC comparado ao meio condicionado em hipóxia.
- Os seguintes fatores estavam presentes em alta concentração no MC normóxia: Angiogenina, MMP-9, IL-8, IGFBP-3, Pentraxina-3, MCP-1, TIMP-1, Trombospondina, uPA e VEGF.
- MC normóxia manteve a viabilidade das células endoteliais intra ilhota e expressão de insulina, contudo não preservou a morfologia dos vasos sanguíneos.
- Dados indicam que as CTM-AD em ambiente de normóxia responderam de forma satisfatória a todos os ensaios realizados no presente estudo, não precisando passar por um acondicionamento com baixa tensão de oxigênio para modulação de sua atividade secretória.

## REFERÊNCIAS

- Abbas A.K; et al. Cellular and Molecular Immunology. **Elsevier**, 8<sup>o</sup> edição, 2015.
- Abbas A.K; et al. Cellular and Molecular Immunology. **Elsevier**, 6<sup>o</sup> edição, 2009.
- Armulik A.; et al. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. **Developmental Cell**, 2011.
- Akyurekli, C.; et al. A Systematic Review of Preclinical Studies on the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Microvesicles. **Stem Cell Rev and Rep**, 2014;
- Baer P.C; Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype *in vivo* and *in vitro*. **World Journal of Stem Cells**, 2014.
- Balamurugan, A. N.; et al. "Islet Product Characteristics and Factors Related to Successful Human Islet Transplantation From the Collaborative Islet Transplant Registry ( CITR ) 1999 – 2010." **American Journal of Transplantation**, 2014.
- Ballian, N. & Brunicardi, F.; Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. **In World Journal of Surgery**(Vol. 31, pp. 705–714), 2007.
- Bhang S. H.; et al. Mutual effect of subcutaneously transplanted human adipose-derived stem cells and pancreatic islets within fibrin gel. **Biomaterials**, 2013.
- Bourin P.; et al. Stromal cells from adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the international federation for adipose therapeutics and science (IFATS) and the international society cellular therapy (ISCT). **Cytotherapy**. 2013
- Bronckaers A.; et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. **Pharmacology & Therapeutics**, **181–196**, 2014.
- Bruni A.; et al. Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**,2014.
- Buravkova L.B.; et al. Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? **Mitochondrion**, 2014.
- Cabrera O.; et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2006.
- Cappuzzello C.; et al. Mesenchymal stromal cell-derived PTX3 promotes wound healing via fibrin remodeling. **Journal of Investigative Dermatology**, 2015;
- Choi J.R.; et al. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2014.
- Crisan M.; et al. Perivascular cells for regenerative medicine. **J. Cell. Mol. Med.**, 2012

Davey G. C.; et al. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of Diabetes mellitus. **Frontiers in Endocrinology**, June 2014, Volume 5, Article 86.

Davis, J.; et al. Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). **J. Vis. Exp. (3)**, 2007.

Derakhshan B.; et al. Chapter 1 Approaches for studying angiogenesis-related signal transduction. **Methods in Enzymology**, 2008.

Dib S. A. Heterogeneidade do Diabetes Mellito Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 2008.

Dietrich I.; et al. Trophic effects of adipose derived stem cells on Langerhans islets viability. **Transplantation Reviews**, 2015.

Ding D. C.; et al. Human Adipose-derived stem cells cultured in keratinocyte serum free medium: donors age does not affect the proliferation and differentiation capacities. **Journal of biomedical science**, 2013.

Dominici M.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy**, 2006.

Duda, DG. Kenneth S Cohen, David T Scadden & Rakesh K Jain. **Nature Protocols**, 2007.

Edwards S.; et al. Functional analysis reveals angiogenic potential of human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in dermal regeneration. **Angiogenesis**, 2014.

Ejtehadifar M.; et al. The effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology. **Adv. Pharm Bull**, 2015;

Fang B.; et al. Using human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as salvage therapy for hepatic graft-versus-host disease resembling acute hepatitis. **Transplant Proc.**, 2007.

Ferris W.F. & Crowther N.J.; Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue. **Cardiovascular Journal Of Africa**, 2011.

François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. **Mol Ther**, 2012.

Fransoon M.; et al. Mesenchymal stromal cells support endothelial cell interactions in an intramuscular islet transplantation model. **Regenerative Medicine Research**, 2015.

Fraser J.K.; et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends Biotechnol**, 2006.

Figliuzzi M.; et al. Mesenchymal stem cells help pancreatic islet transplantation to control type 1 diabetes. **World Journal of Stem Cells**, 2014.

Fotia C.; et al. Hypoxia Enhances proliferation and stemness of human adipose-

derived mesenchymal stem cells. **Cytotechnology**,2015.

Fuggle S. V.; et al. Factors affecting graft and patient survival after live donor kidney transplantation in the UK. **Transplantation**,2010.

Geevarghese, A., & Herman, I. M.; Pericyte-endothelial crosstalk: Implications and opportunities for advanced cellular therapies. **Translational Research**,2014.

Gimble J.M.; et al. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circ Res.**, 2007.

Gleason, C.E.; et al. Determinants of glucose toxicity and its reversibility in the pancreatic islet beta-cell line, HIT-T15. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 2000.

Gu N.; et al. Anti-inflammatory and Antiapoptotic Effects of Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Rat Brain with Cerebral Ischemia. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, 2014.

Guo L. Z.; et al. Angio-Vasculogenic Properties of Endothelial –Induced Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Adipose Tissue. **Circulation Journal**, 2016;

Haque N.; et al. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. **The Scientific World Journal**, 2013.

Hartree E.; Determination of protein: a modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**,1972.

Hass R & Otte Anna; Mesenchymal stem cells as all-around supporters in a normal and neoplastic microenvironment. **Cell Communication & Signaling**, 2012.

Haasters, F.; et al. Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing. **Journal of Anatomy**, 2009.

He J.; et al. Hypoxic adipose mesenchymal stem cells derived conditioned medium protects myocardial infarct in rat. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 2015

Hoogduijn MJ. Are mesenchymal stromal cells immune cells? **Arthritis Res Ther**, 2015.

Hossini A. M.; et al. PI3K/AKT Signaling Pathway Is Essential for Survival of Induced Pluripotent Stem Cells. **Plos One**, 2016.

Kakudo N.; et al. Hypoxia Enhances Proliferation of Human Adipose-Derived Stem Cells via HIF-1 $\alpha$  Activation. **Plos One**, 2014.

Kalinina N.; et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. **Stem Cell Research & Therapy**, 2015.

Kang S.; et al. Cellular and molecular stimulation of adipose-derived stem cells under hypoxia. **Cell Biology International**, 2014.

Kern S.; et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells.**, 2006.

- Khan W. & Mildmay-White. Cell Surface Markers On Adipose-Derived Stem Cells: A Systematic Review. **Curr Stem Cell Res Ther**, 2016;
- Kido, Y.; et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. **J Clin Invest.**, 2000.
- Kim, J.H.; et al. The pivotal roles of reactive species generation in the hypoxia induced stimulation of adipose-derived stem cells. **Stem Cells and Development**, 20(10), 2011.
- Kim WS & Sung JH. Hypoxic Culturing Enhances the Wound-Healing Potential of Adipose-Derived Stem Cells. **Advances In Wound Care, Volume 1, number 4**, 2012.
- King, A. J. F.; et al. ALK5 Inhibition Maintains Islet Endothelial Cell Survival but does not Enhance Islet Graft Revascularisation or Function. **Horm Metab Res**, 2015.
- Konala V.; et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: a new paradigm for cell-free regeneration. **Cytotherapy**, 2016.
- Labriola, L.; et al. Beneficial Effects of Prolactin and Laminin on primary cultures of human pancreatic islets. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2007.
- Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes.**, 1967.
- Laschke M. W. & Menger M. D. Vascularization in Tissue Engineering: Angiogenesis versus Inosculation. **Eur Surg Res**, 2012.
- Lee, S.; et al. Slowed progression in models of Huntington disease by adipose stem cells transplantation. **Ann Neurol**, 2009.
- Li, J.; et al. Transcriptional Profiling Reveals Crosstalk Between Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Cells Promoting Prevascularization by Reciprocal Mechanisms. **Stem Cells And Development**, 2014.
- Liu L.; et al. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. **Cell Biology International**, 2013.
- LV F. J.; et al. The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, 2014.
- Ma S.; et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death and Differentiation**, 2014.
- Maredziak M.; et al. The influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, 15 pages, 2016.
- Maumus M.; et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. **Int J Obes (Lond)** 2011;
- McCloy R.; et al. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. **Cell Cycle**, 2014;
- Mundra, V., Wu, H., & Mahato, R. I. Genetically modified human bone marrow derived mesenchymal stem cells for improving the outcome of human islet transplantation. **PloS One**, 2013.

- Murry C.E.; et al. Cell-based cardiac repair. Reflections at the 10-year point. **Circulation.**, 2005.
- Nakatsu, M. N., & Hughes, C. C. W. An Optimized Three-Dimensional In Vitro Model for the Analysis of Angiogenesis. **Methods in Enzymology**, 2008.
- Najar M.; et al. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. **Cytotherapy**, 2016.
- Nelson D.L. & Cox M. M.; Princípios de Bioquímica de Lehninger. **Artmed, 5<sup>o</sup> edição**, 2009.
- Neri S.; et al. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001.
- Newman A.; et al. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. **Molecular Biology of the Cell**, 2011.
- Nyqvist, D.; et al. Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts. **Diabetes**, 2005.
- Nyqvist D.; et al. Donor Islet Endothelial Cells in Pancreatic Islet Revascularization. **Diabetes**, 2011.
- Ooi Y.; et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells-conditioned medium on microglial cytokines expression and nitric oxide production. **Neuroimmunomodulation**, 2015.
- Ong K. & Shigeki S. Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2013.
- Park, K.-S.; et al. Trophic Molecules Derived From Human Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival, Function, and Angiogenesis of Isolated Islets After Transplantation. **Transplantation**, 2010.
- Peng L.; et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. **Stem Cells**, 2008.
- Pfaff M.; A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, 2001.
- Pham P. V.; et al. Hypoxia promotes adipose-derived stem cell proliferation via VEGF. **Biomedical Research and Therapy**, 2016.
- Pittenger M.F.; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science.**, 1999.
- Qin H.; et al. Hypoxic preconditioning potentiates the trophic effects of mesenchymal stem cells on co-cultured human primary hepatocytes. **Stem Cell Res Ther.** 2015
- Rackham C. L.; et al. Pre-culturing islets with mesenchymal stromal cells using a direct contact configuration is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. **Cytotherapy**, 2013.
- Rasmussen J.; et al. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-

angiogenic potential of human adipose tissue derived stem cells. **Cytotherapy**. 2011

Rekittke N.; et al. Regenerative therapy of type 1 diabetes mellitus: from pancreatic islet transplantation to mesenchymal stem cells. **Stem Cells International**, 2016;

Ricordi C.; Automated method for isolation of human pancreatic islets. **Diabetes**, 1988;

Rosova I.; et al. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, 2008.

Ryan, E.A., et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. **Diabetes**, 2005.

Scharfmann, R.; et al. Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors. **PLoS ONE**, 2008.

Sigma. Substrate Systems for Enzymes Detection. **Life Science**, 2002.

Song S.; et al. The pivotal role of VEGF in adipose-derived-stem-cell-mediated regeneration. **Expert Opin Biol Ther**, 2010.

Silveira, R.; et al. Influence of the laboratory protocol on the in yield of bone marrow mesenchymal stem cells. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 2010;

Strem B.M.; et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med.**, 2005.

Sun B; et al. Concentrated hypoxia-predonditioned adipose mesenchymal stem cell-conditioned medium improves wound healing in full-thickness skin defect model. **Int Sch Res Notices**. 2014

Terra L.F.; et al. Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. **Diabetologia**, 2011.

Traktuev D.; et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. **Circ Res**, 2008;

Valorani M.; et al. Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogênica differentiation potentials. **Cell Prolif**, 2012.

Watt S.M.; et al. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. **British Medical Bulletin**, 2013.

Wittig, C.; et al. Incorporation of Bone Marrow Cells in Pancreatic Pseudoislets Improves Posttransplant Vascularization and Endocrine Function. **PloS One**, 2013.

Yamada S.; Trophic effect of adipose tissue-derived stem cells on porcine islet cells. **J Surg Res**, 2014.

Yamamoto Y.; et al. Low oxygen tension enhances proliferation and maintains stemness of adipose tissue-derived stromal cells. **Biores Open Access**, 2013.

Yousefi F.; et al. In vivo immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned médium in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Immunology Letters**, 2016.

Yu, B.; et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells; **Int. J. Mol. Sci.**, 2014.

Zuk, P.; et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, 2001.

Disponível em: <http://www.doubling-time.com/compute.php>, 05.11.2016.

disponível em: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>, 22.07.2016.

disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>, 22.07.2016.

## ANEXO 1:



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOFUNÇÃO



Universidade de São Paulo  
Instituto de Química

Departamento de Bioquímica

São Paulo, 27 de novembro de 2014.

### Declaração

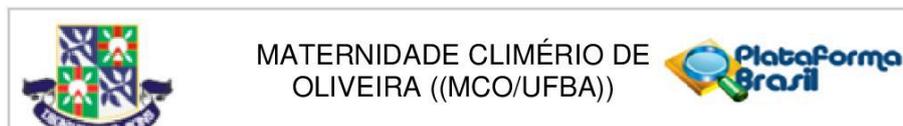
Declaro, para fins de direito, que o Professor Vitor Antonio Fortuna, lotado no departamento de Biofunção, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, mat. 01221606 participa como Pesquisador Colaborador no projeto " Uso de células tronco mesenquimais multipotentes visando a otimização do transplante de ilhotas pancreáticas humanas" (AUX-PE-PROBITEC-908/2012) que foi aprovado pelo comitê técnico-científico da CAPES, CNPQ e MS, com vigência entre 05.Jul.2013 e 31.Dez.2016.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Mari Cleide Sogayar ([mcsoga@iq.usp.br](mailto:mcsoga@iq.usp.br))  
Professora Titular  
Departamento de Bioquímica  
Coordenadora do NUCEL  
Núcleo de Terapia Celular e Molecular (<http://www.usp.br/nucel>)  
Fone: (11) 3091-8514 - Fax: (11) 3091-3820

Mari Cleide Sogayar  **nucel**  
Coordenadora  
NUCEL - Núcleo de Terapia Celular e Molecular  
Universidade de São Paulo

## ANEXO 2:



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

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

**Pesquisador:** Vitor Antonio Fortuna

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 24991814.5.0000.5543

**Instituição Proponente:** Maternidade Climério de Oliveira/UFBA

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

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 625.059

**Data da Relatoria:** 23/04/2014

**Apresentação do Projeto:**

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

Não há outras mudanças na submissão da emenda.

**Objetivo da Pesquisa:**

Não muda.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Aperfeiçoa/melhora a forma de coleta de autorização.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não muda.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE: Contêm todos os elementos da RES466/12.

**Recomendações:**

Não muda.

<b>Endereço:</b> Rua do Limoeiro, 137	<b>CEP:</b> 40.005-150
<b>Bairro:</b> Nazaré	
<b>UF:</b> BA	<b>Município:</b> SALVADOR
<b>Telefone:</b> (71)3283-9210	<b>E-mail:</b> cepmco@ufba.br