UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo comparativo entre células estromais mesenquimais
derivadas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de
indivíduos saudáveis em relação ao potencial terapêutico
no diabetes experimental

Juliana Navarro Ueda Yaochite

Ribeirão Preto

2014

JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE

Estudo comparativo entre células estromais mesenquimais derivadas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos saudáveis em relação ao potencial terapêutico no diabetes experimental

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Yaochite, Juliana Navarro Ueda

Estudo comparativo entre células estromais mesenquimais derivadas de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e de indivíduos saudáveis em relação ao potencial terapêutico no diabetes experimental/Juliana Navarro Ueda Yaochite; orientador Eduardo Antônio Donadi - Ribeirão Preto, 2014.

178 páginas; 30 cm

Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, 2014.

1. Células estromais mesenquimais; 2. Diabetes *mellitus* tipo 1; 3. Terapia celular; 4. Diabetes experimental; 5. Doenças autoimunes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Navarro Ueda Yaochite

Estudo comparativo entre células estromais mesenquimais derivadas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e de indivíduos saudáveis em relação ao potencial terapêutico no diabetes experimental

Tese apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Imunologia Básica e
Aplicada

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico esta Tese ao saudoso Professor Júlio César Voltarelli, exemplo de ser humano,
médico, docente, mentor e pesquisador.
Fonte de constante inspiração...*

Agradeço imensamente:

- Ao Prof. Júlio Voltarelli. Obrigada pela oportunidade de poder acompanhá-lo durante esses anos. Um gênio da pesquisa, um ser humano incomparável. Nada vai apagar os ensinamentos que deixou, levarei para sempre seus atos e sua missão, que servirão de exemplo e inspiração para toda a minha vida. Muito obrigada por tudo meu querido Mestre! Obrigada por ter me tornado uma "menina Voltarelli"...

- Aos pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e indivíduos saudáveis pela doação das amostras de medula óssea para as pesquisas, sem vocês nosso trabalho seria impossível.

- Aos profissionais do setor de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pela coleta das amostras e por toda ajuda prestada;

- Ao Prof. Donadi, um verdadeiro anjo, que surgiu em um momento difícil e de tristeza e estendeu sua mão pronto para nos ajudar. Professor, obrigada pela ajuda e por ter me orientado, no sentido literal da palavra!

- À Kelen, por todos os ensinamentos, pela paciência e tempo concedido para me ajudar sempre que foi preciso. Obrigada pela confiança depositada em mim e por não ter desistido do grupo, sempre se esforçando pela nossa união;

- Às agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES que permitiram a realização desse trabalho. Obrigada pelo suporte financeiro necessário para aquisição de reagentes, importações e matérias permanentes essenciais para o desenvolvimento e conclusão do trabalho. Em especial à FAPESP que me concedeu a bolsa de doutorado, permitindo que eu desenvolvesse meu trabalho em tempo integral e ainda, proporcionou minha participação em importantes eventos científicos para divulgação dos resultados obtidos neste trabalho.

- Aos funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto (Compras, Almoxarifado, Transporte, Comunicação, Recursos Audio-Visuais, Biblioteca, Limpeza, Gestão de

Projetos, Rotina, Design Gráfica, Copa) e ao Dr. Dimas Tadeu Covas por possibilitarem a realização deste trabalho em suas instalações. Obrigada por todo apoio oferecido durante meus anos de pós-graduação;

- Ao Prof. Lourenço Sbragia pela ajuda inicial com as cirurgias dos camundongos para administração das MSCs;

- À Fabiana Rosseto de Moraes da FFCRP pelas análises de CBA;

- Ao laboratório de Citometria de Fluxo: à Carmem pela presteza, à Camila e Daiane pelo auxílio nos experimentos e em especial à Paty por compreender a importância do meu trabalho e permitir a realização dos inúmeros experimentos;

- Aos laboratórios de Biologia Molecular (Dra. Simone e funcionárias) e Terapia Celular (Dra. Maristela e funcionárias) pela ajuda e suporte sempre que foi necessário;

- À Dani e Josi do laboratório de Histologia/Imunofluorescência pela amizade, boa vontade e pela ajuda nos experimentos;

- Aos funcionários Rodrigo e Marjorie, da Biblioteca do Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo apoio sempre que foi necessário e disposição em me ajudar;

- À Dalvinha, pela amizade, pelas palavras doces e sorriso acolhedor;

- Ao Luizinho, Marquito e Nice, Funcionários da Limpeza, pelas palavras de carinho logo nas primeiras/últimas horas do dia;

- À Alê e a Fer, sempre prontas a ajudar nas traduções e correções de textos;

- Ao laboratório de Transferência Gênica, em especial aos amigos Lucas e Ricardo, por todos os bons momentos compartilhados. Lucas (Craudinho) obrigada por ser essa pessoa única e gentil, amigo para todas as horas, e pela imensa ajuda nos experimentos com o IVIS;

- Ao Prof. João Santana pelo profissionalismo e dedicação ao Programa de Imunologia Básica e Aplicada da FMRP;
- À Ana, secretária do Programa de Imunologia Básica e Aplicada, por toda ajuda prestada durante esses 7 anos de pós-graduação;
- Aos excelentes professores do Programa de Imunologia Básica e Aplicada da FMRP que fizeram com que eu me apaixonasse cada vez mais pela Imunologia;
- À Dani Carlos, pelo carinho e ajuda, pela boa vontade e presteza sempre que foi necessário;
- Aos amigos da Imuno, em especial ao Rafa e Elyara que mesmo de longe sempre estiveram por perto;
- Aos funcionários dos biotérios do Hemocentro, Central, FCFRP e Imunologia FMRP pelo fornecimento dos camundongos e por toda ajuda prestada, em especial à Cris, Cleide, Reinaldo, Júlio e Rubilan;
- À Fabiana Rosseto de Moraes da FCFRP pelo auxílio com os experimentos de CBA;
- Às queridas Lilian, Luiza, Aline e Marcela, e ao Everton pelo companheirismo e momentos alegres compartilhados;
- Aos amigos de laboratório Carol, Gislane, Júlia, Lucas, Kalil, Bel, Rosane, Monize, Giu, Kamilla, Mario, Robson, Amanda, Angelo e Rafael, pelo convívio agradável, risadas e aflições compartilhadas. Vocês fizeram meus dias mais felizes!
- Aos amigos de todas as horas e de longa data: Furos, Amanda, André, Má, Pri, Flávio, Craudio, Baiano, Julinha, Careca e Rafa. Sem vocês a minha vida em Ribeirão Preto teria sido triste e solitária. Obrigada por me mostrarem o verdadeiro significado da palavra amizade!

- À Má (Neuza) pela amizade, companheirismo e pela ajuda desde o mestrado. Obrigada por ser essa amiga tão especial que sempre torceu pelo meu sucesso e me incentivou.
- À Furos pela amizade incondicional, por toda ajuda profissional e sentimental nesses sete anos de pós-graduação. Obrigada por ser essa amiga tão cuidadosa e preocupada. Obrigada por ter sido meu braço direito, por não me deixar fraquejar e por me fazer acreditar que existem pessoas verdadeiramente boas no mundo. Foi uma honra conviver com você!
- Aos amigos de Santo André, em especial à Bia, Simone e Maíra, pela amizade e apoio;
- À minha segunda família, D.Edna, Sr.Vanderlei, Nara, Jana, Wanderley e agregados, pelo carinho, pelo conforto e incentivo durante todos esses anos;
- Aos meus pais, Julio e Tereza, e minha família, pelo amor incondicional, pela distância suportada, pela torcida, pela confiança, pelo conforto. Obrigada por serem meu porto seguro, meu verdadeiro lar.
- Ao amor da minha vida, que mesmo tão longe esteve tão perto em meu coração durante essa trajetória. Já, eu não conseguiria sem você, essa conquista é nossa! Obrigada por seu meu ouvinte, meu amante, meu melhor amigo, meu chão. Obrigada pela paciência, pelo incentivo, pelas broncas, puxões de orelha, mas, principalmente, por acreditar em mim.
- À Deus, por tornar tudo isso possível. Por ter colocado em meu caminho pessoas muito especiais, verdadeiros anjos. Obrigada pela saúde e disposição concedidas em todos os dias dessa caminhada. Obrigada pela força e esperança durante os momentos de desespero. Obrigada por me fazer uma pessoa melhor a cada dia!

Estudo comparativo entre células estromais mesenquimais derivadas de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e de indivíduos saudáveis em relação ao potencial terapêutico no diabetes experimental

O diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM-1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição seletiva de células pancreáticas produtoras de insulina. O tratamento convencional é feito com insulina e existe atualmente a necessidade de desenvolver alternativas terapêuticas para o DM-1, como por exemplo o tratamento com células-tronco. As células estromais mesenquimais multipotentes (*multipotent mesenchymal stromal cells*-MSCs) representam uma fonte de células ideal para terapias celulares em virtude de seu fácil isolamento, expansão e capacidades imunomoduladora e regenerativa. Ainda não está esclarecido se MSCs isoladas de indivíduos com doenças autoimunes possuem alterações funcionais que poderiam limitar seu uso no contexto do transplante autólogo. Já foi descrito que MSCs de pacientes com esclerose múltipla, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico possuem alterações fenotípicas e/ou funcionais. No entanto, pouco se sabe acerca das características das MSCs de pacientes com DM-1. Desse modo, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a eficácia da infusão de MSCs derivadas de pacientes com DM-1 no tratamento do diabetes experimental e comparar os resultados obtidos com o tratamento feito com MSCs isoladas de indivíduos saudáveis. Além disso, investigamos os efeitos da hiperglicemia *in vitro* sobre as MSCs, estabelecemos a melhor via de administração das MSCs em camundongos diabéticos e caracterizamos fenotipicamente e funcionalmente as MSCs de pacientes com DM-1. O diabetes experimental foi induzido em camundongos C57BL/6 por meio da administração de estreptozotocina. MSCs isoladas de tecido adiposo murino (ADMSCs) foram administradas em camundongos diabéticos pelas vias intravenosa, intraperitoneal, intrapancreática ou intraesplênica. MSCs foram isoladas da medula óssea de pacientes com DM-1 recém-diagnosticado (DM1-MSCs) e de indivíduos saudáveis (C-MSCs). A morfologia, tamanho celular, perfil imunofenotípico, diferenciação em adipócitos, migração e capacidade imunossupressora foram avaliados. 1×10^6 DM1-MSCs ou C-MSCs foram injetadas pela via intraesplênica em camundongos diabéticos 20 dias após indução do diabetes. A glicemia foi monitorada periodicamente. Após sacrifício dos camundongos, avaliamos a histologia do tecido pancreático, níveis de insulina circulante, a população de células T reguladoras no baço e linfonodos pancreáticos, o perfil de citocinas no soro e homogeneizado pancreático. A migração das ADMSCs Luc^+ injetadas foi avaliada por meio de processamento de

imagem baseado em bioluminescência. Sete dias após cultivo com diferentes concentrações de glicose, as MSCs não apresentaram alterações nos parâmetros avaliados. A injeção de MSCs em camundongos diabéticos por meio da via intraesplênica foi a mais eficiente, promovendo reversão da hiperglicemia em cerca de 70-100% dos camundongos tratados. As DM1-MSCs apresentaram morfologia, tamanho celular, perfil imunofenotípico, diferenciação *in vitro* em adipócitos e capacidade imunossupressora *in vitro* semelhante às MSCs de indivíduos saudáveis. No entanto, as DM1-MSCs apresentaram maior migração *in vitro* em relação às C-MSCs. Não houve diferenças significantes do tratamento de camundongos diabéticos feito com DM1-MSCs ou C-MSCs, uma vez que ambas MSCs foram capazes de reverter a hiperglicemia, promover aumento da massa de células pancreáticas, bem como diminuir os níveis de IL-2 e IFN- no pâncreas dos camundongos tratados. Considerando-se que as MSCs de pacientes com DM-1 recém-diagnosticados não apresentaram alterações fenotípicas ou funcionais, elas poderiam ser transplantadas de forma autóloga nesses pacientes, representando uma nova alternativa terapêutica para o DM-1.

Comparative analysis of mesenchymal stromal cells derived from patients with type 1 diabetes mellitus and healthy individuals regarding the therapeutic potential in experimental diabetes

Type 1 diabetes mellitus (DM-1) is an autoimmune disease characterized by a selective destruction of insulin-producing pancreatic β cells. The conventional treatment for DM-1 patients is the administration of insulin and new therapeutic approaches are needed, such as stem cell therapies. Mesenchymal stromal cells (MSCs) represent an important stem cell source for cell therapies because they are easy to isolate, present good capacity of expansion and they exhibit immunomodulatory and regenerative properties. However, it is not fully understood if MSCs from autoimmune patients are functionally defective or not, limiting their use in the autologous transplantation setting. There are some reports in the literature showing that MSCs from patients with multiple sclerosis, rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus exhibit phenotypical and/or functional alterations. However, little is known about MSCs isolated from DM-1 patients (DM1-MSCs). Taking this into account, the aim of this work was to evaluate the efficacy of DM1-MSCs transplantation in diabetic mice and to compare this treatment with the treatment using MSCs isolated from healthy individuals. We also evaluated the influence of *in vitro* hyperglycemia on MSCs and we established the best route of MSCs administration in diabetic mice. The phenotypical and functional characteristics of DM1-MSCs were analyzed. The experimental diabetes model was induced in C57BL/6 male mice by the administration of streptozotocin. MSCs were isolated from mouse adipose tissue (ADMSCs) and injected in diabetic mice by intravenous, intraperitoneal, intrapancreatic or intrasplenic routes. DM1-MSCs were isolated from bone marrow aspirates of newly-diagnosed type 1 diabetes patients and C-MSCs were obtained from healthy individuals. The morphology, immunophenotypic profile, cell size, adipocyte differentiation (*in vitro*), migration (*in vitro*) and immunosuppressive capacity (*in vitro*) were evaluated. 1×10^6 DM1-MSCs or C-MSCs were injected by intrasplenic route in diabetic mice 20 days after diabetes induction. Glycemia was frequently monitored. The pancreatic tissue (histology and immunohistochemistry), serum insulin levels, the regulatory T cells population in spleen and pancreatic lymph nodes, the serum and pancreatic homogenate cytokine profiles were evaluated after MSCs administration. The homing of ADMSCs Luc^+ was analyzed by bioluminescence based image processing. MSCs cultured for seven days with different glucose concentrations did not exhibit alterations in all evaluated

parameters. The intravenous, intraperitoneal, intrapancreatic or intrasplenic routes of MSCs administration were tested. The intrasplenic route was the most efficient and promoted diabetes reversion in about 70-100% of MSCs-treated mice. No differences in morphology, cell size, immunophenotypic profile, adipocyte differentiation and immunosuppressive capacity were found for DM1-MSCs when compared with C-MSCs. However, the migration capacity of DM1-MSCs was higher than C-MSCs. The intrasplenic administration of DM1-MSCs or C-MSCs in diabetic mice similarly promoted a decrease in blood glucose levels, improved insulin-producing cell mass and modulated the production of IL-2 e IFN- in pancreatic tissue. Taking into account that MSCs from newly-diagnosed DM-1 patients did not show phenotypical and functional alterations, these cells could be isolated from diabetic patients representing a new therapeutic approach for DM-1 patients (autologous transplantation).

Lista de siglas e abreviaturas

- ADMSCs: *adipose-derived mesenchymal stem cells*
- AIRE: *autoimmune regulator*
- BB rats: ratos *BioBreeding*
- BMCs: *bone marrow cells*
- CBA: *cytometric bead array*
- CD: *cluster of differentiation*
- CFSE: *carboxyfluorescein succinimidyl ester*
- CTLA-4: *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*
- D+1: um dia após transplante
- DAB: diaminobenzidina
- DAIs: doenças autoimunes
- DM-1: *diabetes mellitus* tipo 1
- DM-2: diabetes tipo 2
- EAE: encefalomielite autoimune experimental
- ELISA: *enzyme linked immuno sorbent assay*
- FACs: *fluorescence-activated cell sorting*
- FGF2: *fibroblast growth factor 2*
- Foxp3: *forkhead box 3*
- GAD: *glutamate decarboxylase*
- G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*
- GFP: *green fluorescent protein*
- GLUT2: *Glucose transporter 2*
- GVHD: *graft-versus-host disease*
- HE; H&E: hematoxilina & eosina
- HGF: *hepatocyte growth factor*

- *HLA: human leukocyte antigen*
- *hMSCs: MSCs humanas*
- *ICAM: inter-cellular adhesion molecule 1*
- *IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase*
- *IFN- γ : interferon gamma*
- *IGF-1: insulin-like growth factor 1*
- *IL: interleucina*
- *ISCT: International Society for Cell Therapy*
- *IVIS: in vivo image system*
- *KDR: kinase insert domain receptor*
- *LFA-3: lymphocyte function-associated antigen-3*
- *LNP: linfonodo pancreático*
- *Luc: luciferase*
- *MHC: major histocompatibility complex*
- *MSC: multipotent mesenchymal stromal cells*
- *ND: não detectado*
- *NK: natural killer*
- *NO: óxido nítrico*
- *NOD: non obese diabetic*
- *PBMC: peripheral blood mononuclear cells*
- *PBS: phosphate buffered saline*
- *PLN: linfonodos pancreáticos*
- *PD-L1: programmed death ligand 1*
- *PDX-1: pancreatic and duodenal homeobox 1*
- *PGE2: prostaglandina E-2*
- *PHA: phytohemagglutinin*
- *PIBB: processamento de imagem baseado em bioluminescência*

- PTPN22: *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*
- SCID: *severe combined immunodeficiency*
- SFB: soro fetal bovino
- STZ: estreptozotocina
- Tregs: células T reguladoras
- Tx: Transplante
- VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule-1*
- ZnT8: *zinc transporter 8*
- MEM: *-minimum essential medium*

Lista de Tabelas

Tabela 1. Efeito da hiperglicemia <i>in vitro</i> sobre as MSCs.	31
Tabela 2. Administração intraperitoneal de MSCs em camundongos diabéticos.	33
Tabela 3. Pannel de marcadores utilizados para imunofenotipagem de MSCs	124

Lista de Figuras

Figura 1. Procedimento cirúrgico para administração das ADMSCs pelas vias intrapancreática e intraesplênica.....	22
Figura 2. Análise morfológica das MSCs cultivadas com diferentes concentrações de glicose no meio de cultura.....	29
Figura 3. Avaliação do tamanho, viabilidade celular, taxas de proliferação e apoptose das MSCs cultivadas por 168 horas em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose..	30
Figura 4. Perfil imunofenotípico das MSCs cultivadas por 168 horas em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose.	31
Figura 5. Caracterização das ADMSCs isoladas de tecido adiposo de camundongos Balb/c..	34
Figura 6. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos tratados com ADMSCs pela via intrapancreática (35 dias).....	36
Figura 7. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 35 dias após a infusão de ADMSCs pela via intrapancreática.....	36
Figura 8. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos após transplante de ADMSCs pela via intrapancreática (70 dias).....	38
Figura 9. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 70 dias após infusão de ADMSCs pela via intrapancreática.....	38
Figura 10. Teste de tolerância à glicose dos camundongos C57BL/6 diabéticos 65 dias após transplante de ADMSCs pela via intrapancreática.....	40
Figura 11. Histologia do pâncreas e avaliação da massa de células beta produtoras de insulina 70 dias após transplante de ADMSCs pela via intrapancreática.....	41
Figura 12. Avaliação da população de células T reguladoras Foxp3+ presentes nos linfonodos pancreáticos e baço 70 dias após transplante das ADMSCs pela via intrapancreática..	43
Figura 13. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 presentes no soro dos camundongos 70 dias após administração intrapancreática das ADMSCs.....	43

Figura 14. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4, IL-10 e TGF- β presentes no homogeneizado pancreático dos camundongos 70 dias após administração intrapancreática das ADMSCs..	44
Figura 15. Caracterização e avaliação da atividade biológica da luciferase das ADMSCs Luc ⁺ .	46
Figura 16. Biodistribuição das ADMSCs Luc ⁺ após administração intrapancreática em camundongos diabéticos..	47
Figura 17. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica (30 dias)..	49
Figura 18. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 30 dias após infusão de ADMSCs pela via intraesplênica..	50
Figura 19. Teste de tolerância à glicose dos camundongos C57BL/6 diabéticos 28 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica..	51
Figura 20. Análise da população de células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes no baço e nos linfonodos pancreáticos 30 dias após administração das ADMSCs pela via intraesplênica.....	52
Figura 21. Histologia do pâncreas e avaliação da massa de células beta produtoras de insulina 30 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica	53
Figura 22. Expressão de Ki-67 no pâncreas dos camundongos C57BL/6 diabéticos 30 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica..	54
Figura 23. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 presentes no soro dos camundongos 30 dias após administração intraesplênica das ADMSCs.....	55
Figura 24. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4, IL-10 e TGF- β presentes no homogeneizado pancreático 30 dias após administração intraesplênica das ADMSCs.....	56
Figura 25. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica (70 dias)..	57
Figura 26. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 70 dias após infusão de ADMSCs pela via intraesplênica..	58
Figura 27. Teste de tolerância à glicose dos camundongos C57BL/6 diabéticos 65 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica..	59
Figura 28. Histologia do pâncreas e avaliação da massa de células beta produtoras de insulina 70 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica..	60
Figura 29. Expressão de Ki-67 no pâncreas dos camundongos C57BL/6 diabéticos 70 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica.	61
Figura 30. Avaliação da população de células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes no baço e linfonodos pancreáticos 70 dias após transplante das ADMSCs pela via intraesplênica.....	62

Figura 31. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 presentes no soro dos camundongos 70 dias após administração intraesplênica das ADMSCs.....	62
Figura 32. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4, IL-10 e TGF- β presentes no homogeneizado pancreático dos camundongos 70 dias após administração intraesplênica das ADMSCs.....	63
Figura 33. Biodistribuição das ADMSCs Luc ⁺ após administração intraesplênica em camundongos diabéticos..	64
Figura 34. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos após transplante de hMSCs pela via intraesplênica (30 dias).....	66
Figura 35. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 30 dias após infusão de hMSCs pela via intraesplênica..	66
Figura 36. Análise morfológica das MSCs isoladas de medula óssea de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1.....	68
Figura 37. Comparação do diâmetro das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1.....	68
Figura 38. Perfil imunofenotípico das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1.....	69
Figura 39. Potencial de diferenciação em adipócitos das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1..	70
Figura 40. Migração <i>in vitro</i> das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1. ...	71
Figura 41. Efeito supressor de MSCs isoladas de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM1 sobre linfócitos estimulados.....	72
Figura 42. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos tratados com C-MSCs ou DM1-MSCs.....	76
Figura 43. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 35 dias após infusão de C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica..	77
Figura 44. Teste de tolerância à glicose dos camundongos C57BL/6 diabéticos 30 dias após transplante das C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica.....	78
Figura 45. Avaliação da população de células T reguladoras Foxp3 ⁺ presentes no baço e linfonodos pancreáticos 35 dias após transplante das C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica.....	79
Figura 46. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 presentes no soro dos camundongos 35 dias após administração intraesplênica das C-MSCs ou DM1-MSCs.....	79
Figura 47. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4, IL-10 e TGF- β presentes no homogeneizado pancreático dos camundongos 35 dias após administração intraesplênica das C-MSCs ou DM1-MSCs.....	80

Figura 48. Análises histológicas do pâncreas dos camundongos C57BL/6 diabéticos 35 dias após transplante de C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica.....	81
Figura 49. Avaliação da massa de células beta pancreáticas produtoras de insulina 35 dias após transplante de C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica.	82
Figura 50. Expressão de Ki-67 no pâncreas dos camundongos C57BL/6 diabéticos 35 dias após transplante de C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica.	83

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 <i>Diabetes mellitus tipo 1</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Células estromais mesenquimais</i>	<i>5</i>
1.2.1 <i>Terapia do DM-1 com MSCs.....</i>	<i>10</i>
1.2.2 <i>MSCs de pacientes com doenças autoimunes</i>	<i>12</i>
2. Objetivos	14
2.1 <i>Objetivo geral</i>	<i>14</i>
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>14</i>
3. Materiais e Métodos	16
4. Resultados	28
4.1 <i>Parte I. Efeito da hiperglicemia in vitro e estabelecimento da melhor via de administração das MSCs no modelo de diabetes experimental.....</i>	<i>28</i>
4.2 <i>Parte II. Comparação das características fenotípicas e funcionais das MSCs isoladas de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1</i>	<i>67</i>
4.3 <i>Resumo dos resultados obtidos no presente trabalho</i>	<i>84</i>
5. Discussão	85
6. Conclusões.....	106
7. Referências.....	107
8. Anexos	124
9. Manuscrito	126

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Diabetes mellitus tipo 1*

As doenças autoimunes (DAIs) constituem grupo heterogêneo de doenças que afetam cerca de 3-5% da população. Essas doenças decorrem de defeitos nos mecanismos que medeiam a tolerância imune aos antígenos próprios, resultando na ativação de mecanismos efetores celulares e humorais, e subsequente destruição tecidual. As DAIs são determinadas pela interação de fatores genéticos com fatores ambientais, produzindo alterações nos mecanismos de imunorregulação. As DAIs são classificadas como “órgão-específicas” (por exemplo, diabetes *mellitus* tipo 1, tireoidite de Hashimoto e doença de Crohn) ou como “sistêmicas” (por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose sistêmica), dependendo se a resposta autoimune é dirigida a antígenos que são particulares de um determinado órgão ou se são amplamente distribuídos por todo o corpo, respectivamente (Sakaguchi, 2000).

O diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM-1) é uma doença autoimune órgão-específica, mediada por células T e caracterizada pela destruição seletiva de células β pancreáticas produtoras de insulina. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, em 2011, foram contabilizadas cerca de 366 milhões de pessoas diabéticas ao redor do mundo, sendo que a estimativa para o ano de 2030 será de 552 milhões de pessoas afetadas (Canivell e Gomis, 2014). O DM-1 compreende cerca de 5-10% de todos os casos de diabetes em adultos e 90% dos casos em crianças, sendo que sua incidência vem crescendo em todo mundo a uma taxa de 3-5% por ano (Forlenza e Rewers, 2011). Esse número elevado e crescente de pessoas diabéticas contribui de forma significativa para gastos sócio-econômicos referentes à intervenção médica necessária para tratamento e prevenção das complicações crônicas associadas ao diabetes (Waldron-Lynch e Herold, 2009).

O início dos sinais clínicos do DM-1 ocorre quando cerca de 80-95% das células já foram destruídas (Klinke, 2008). A morte das células β leva à falta do hormônio insulina, que resulta em estado de hiperglicemia devido à diminuição da captura de glicose da circulação e aumento da produção hepática de glicose. Na ausência de insulina, ocorre aumento da quebra de gordura e oxidação de ácidos graxos, resultando em produção excessiva de cetonas. Se não tratados, os distúrbios metabólicos levam

progressivamente à depressão do sistema nervoso central, coma e morte. Assim, pacientes com DM-1 necessitam de tratamento permanente com insulina exógena para sobrevivência. Algumas complicações crônicas do diabetes não controlado incluem os problemas vasculares que levam à insuficiência renal, cegueira, doença cardíaca, neuropatias e úlceras crônicas (Inzucchi e Sherwin, 2008).

A suscetibilidade ao DM-1 é determinada por fatores genéticos, ambientais e falhas nos processos de imunorregulação. O loco do sistema HLA (*human leukocyte antigen*), localizado no cromossomo 6, compreende genes altamente polimórficos, e muitos deles têm sido associados com susceptibilidade ao DM-1. Alguns alelos do HLA de classe II, ou a combinação deles (haplótipo), exibem forte associação com o desenvolvimento de DM-1, enquanto que outros haplótipos são considerados de proteção (Notkins, 2002). Duas combinações de haplótipos de HLA são de particular importância, DR3-DQ2 e DR4-DQ8, uma vez que 90% das crianças com DM-1 apresentam pelo menos um desses haplótipos. Por outro lado, o haplótipo DR15-DQ6 é considerado protetor (Caillat-Zucman *et al.*, 1992; Gillespie, 2006). Dentre os genes relacionados à molécula de HLA de classe I, uma das associações mais fortes com DM-1 é reportada para os alelos B*39 e A*02, os quais aumentam significativamente o risco de desenvolvimento de DM-1 (Nejentsev *et al.*, 2007). Outros genes não relacionados ao sistema HLA são relacionados ao aparecimento do DM-1. No início dos anos 80, a região do gene da insulina, localizada no cromossomo 11, foi correlacionada com o desenvolvimento do DM-1, sendo considerado o segundo fator genético mais importante, representando cerca de 10% da suscetibilidade genética ao DM-1 (Bell, Horita e Karam, 1984; Gillespie, 2006). Além disso, polimorfismos em outros genes associados com diferentes síndromes ou doenças autoimunes, tais como *AIRE*, *Foxp3*, *CTLA-4*, *PTPN22*, receptor IL-2 (*IL-2R* - CD25), podem favorecer/desencadear a reação autoimune contra as células pancreáticas (Daneman, 2006; Gillespie, 2006).

Dentre os fatores ambientais suspeitos de desencadear e/ou potencializar o DM-1 estão: ingredientes presentes na dieta durante a infância (por exemplo proteínas do leite de vaca, cereais, glúten), vacinação, exposição a toxinas, carência de vitamina D, entre outros. Infecções virais têm sido correlacionadas com a etiologia do DM-1 há mais de 100 anos, sendo que infecções por enterovírus, rubéola, caxumba, rotavírus, parvovírus ou citomegalovírus podem desencadear a autoimunidade contra células pancreáticas (Atkinson e Eisenbarth, 2001; Daneman, 2006; Gillespie, 2006; Dotta *et al.*, 2007; Van Der Werf *et al.*, 2007; Eringsmark Regnéll e Lernmark, 2013; Zóka *et al.*, 2013).

A etiologia autoimune do DM-1 é primeiramente confirmada pela presença de autoanticorpos circulantes e específicos contra diversos antígenos das células β pancreáticas (GAD-*Glutamic Acid Decarboxylase*, insulina, ZnT8-*zinc transporter-8*), sendo detectados em cerca de 85-90% dos indivíduos com DM-1 ao diagnóstico. Além disso, há inúmeras evidências em humanos e em camundongos NOD (*non-obese diabetic*) indicativas de que os linfócitos T exercam papel central e fundamental no desenvolvimento e progressão da doença (Notkins, 2002).

O estágio precoce do DM-1 é caracterizado por processo de insulite (inflamação), resultado da infiltração das ilhotas pancreáticas por células mononucleares, incluindo linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$), linfócitos B e macrófagos (Itoh *et al.*, 1993). Nesse cenário, macrófagos e células dendríticas são as primeiras células a se infiltrarem nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD, onde, além de apresentarem antígenos provenientes das células β aos linfócitos, produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- β) e óxido nítrico, que em conjunto contribuem para a destruição das células β (Mathis, Vence e Benoist, 2001). Logo em seguida, linfócitos T potencialmente patogênicos são detectados ao redor das ilhotas pancreáticas (peri-insulite), após ativação nos linfonodos pancreáticos por células apresentadoras de antígenos (Bluestone, Herold e Eisenbarth, 2010).

Embora ambas as células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ sejam importantes na patogênese do DM-1, há evidências que as células T $CD8^+$ citotóxicas sejam as principais células efetoras na destruição direta das células β pancreáticas (Itoh *et al.*, 1993; Coppieters *et al.*, 2012). Os linfócitos T $CD8^+$ podem reconhecer antígenos das células diretamente, via molécula de MHC classe I (contato célula-célula), sinalizar via Fas/FasL ou liberar perforina/granzima, induzindo apoptose nas células pancreáticas. Além disso, os linfócitos T $CD8^+$ podem ser ativados por células apresentadoras de antígenos, carregando antígenos das células e promovendo a morte celular via contato célula-célula ou liberação de citocinas/óxido nítrico (Mathis, Vence e Benoist, 2001; Van Belle, Coppieters e Von Herrath, 2011).

As células T reguladoras (Tregs) têm papel central no controle de respostas autoimunes em humanos e em modelos animais (Suri-Payer e Fritzsching, 2006). Foi observada atividade supressora reduzida nas células Tregs isoladas de pacientes com esclerose múltipla, psoríase, miastenia grave, artrite reumatoide, artrite idiopática juvenil e lúpus eritematoso sistêmico (Baecher-Allan e Hafler, 2006; Randolph e

Fathman, 2006). A maioria dos trabalhos que avaliou as células Tregs no contexto do DM-1 não encontrou diferenças na frequência dessas células no sangue periférico de pacientes em comparação com indivíduos saudáveis. Já com relação à capacidade funcional das células Tregs de pacientes com DM-1, os dados são contraditórios, uma vez que foi reportado tanto a presença de defeitos funcionais como atividade supressora normal (Alonso *et al.*, 2009). Em camundongos NOD, o defeito das células Tregs parece ser simplesmente problema numérico, uma vez que essas funcionam normalmente e conferem proteção após transferência adotiva (Salomon *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002; D'Alise *et al.*, 2008; Tonkin *et al.*, 2008).

Os modelos animais de DM-1 representam ferramenta de extrema importância, tanto para o estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença, bem como para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Existem, de forma geral, dois tipos de modelos animais para o estudo do DM-1: o modelo de diabetes espontâneo e o modelo de diabetes induzido por agentes químicos. Dentre os roedores que desenvolvem o diabetes de forma espontânea, os mais comumente usados são os camundongos NOD e os ratos *Biobreeding* (*BB rats*). Desde o seu estabelecimento há mais de 20 anos, a linhagem de camundongos NOD tem sido amplamente usada para estudar as características do diabetes autoimune, uma vez que se assemelha clinicamente ao DM-1. Uma diferença relevante é que a doença em camundongos NOD é totalmente determinada por fatores genéticos. O início do diabetes ocorre entre 12 e 14 semanas após o nascimento em fêmeas e um pouco mais tarde nos machos, no entanto, a proporção de machos que desenvolve a doença é significativamente menor em relação às fêmeas. A maioria das células dos infiltrados inflamatórios são células T CD4⁺, mas células T CD8⁺, células NK, células B, células dendríticas e macrófagos também são observados (Anderson e Bluestone, 2005; Acharjee *et al.*, 2013).

Com relação aos modelos experimentais cujo diabetes é induzido pela administração de substâncias químicas, o mais utilizado é o modelo induzido por estreptozotocina (STZ). Camundongos machos da linhagem C57BL/6 são mais suscetíveis ao desenvolvimento do diabetes induzido por múltiplas doses de STZ em comparação com camundongos Balb/c, que são relativamente resistentes (Müller *et al.*, 2002).

A STZ é um análogo da N-acetilglucosamina e foi primeiramente isolada do microorganismo *Streptomyces achromogenes*, sendo que em altas doses induz, quase que de imediato, hiperglicemia. Esse composto químico é similar à molécula de glicose,

e pode ser transportado para o interior das células via proteína transportadora de glicose-2 (GLUT2), não sendo reconhecida pelos demais transportadores de glicose. Dessa forma, há toxicidade sítio-específica, sem comprometimento importante de outros tipos celulares. Entretanto, altas doses de STZ promovem lesão grave nos rins que pode ser evitada pela administração de pequenas e múltiplas doses de STZ, induzindo hiperglicemia cerca de uma semana após a primeira dose da droga (Tesch e Nikolic-Paterson, 2006).

A evolução do diabetes induzido por STZ é mediada por infiltrado precoce de macrófagos nas ilhotas pancreáticas, apresentação dos antígenos diabetogênicos liberados pela ação da STZ e recrutamento de células T. Macrófagos desempenham sua função patogênica por meio da síntese de óxido nítrico e pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- (Mensah-Brown *et al.*, 2006). As doses de STZ afetam diferentemente os níveis de citocinas do padrão Th1 e Th2, bem como as populações de células Tregs e células T produtoras de IL-17 (Th17 e Tc17) (Müller *et al.*, 2002; Yaochite *et al.*, 2013).

O DM-1 é tratado pela terapia convencional com insulina ou terapia intensiva com insulina. Ensaios clínicos utilizando ciclosporina, azatioprina/corticoides ou anticorpo monoclonal anti-CD3, visando à preservação funcional das células β , vêm sendo realizados com bons resultados, mas insuficientes para aplicação clínica rotineira (Palmer *et al.*, 2004). O transplante de pâncreas e de ilhotas pancreáticas vem sendo proposto como alternativa terapêutica para o DM-1, entretanto, há limitações nesse tipo de terapia, as quais incluem a baixa quantidade de doadores para transplantes alogênicos, dificuldade de obtenção das ilhotas pancreáticas e a necessidade de imunossupressão constante (Atkinson e Eisenbarth, 2001; Notkins, 2002). Sendo assim, esse cenário estimula novas pesquisas em busca de alternativas terapêuticas, tais como a diferenciação *in vitro* de células-tronco em células pancreáticas humanas, tratamento com células tronco-hematopoéticas ou células-tronco mesenquimais (Hussain e Theise, 2004; Voltarelli *et al.*, 2007; Couri e Voltarelli, 2008).

1.2 Células estromais mesenquimais multipotentes

Além das células-tronco hematopoéticas, a medula óssea contém precursores de linhagens não-hematopoéticas, entre elas as células-tronco mesenquimais,

caracterizadas pela primeira vez há mais de 40 anos por Friedenstein e colaboradores, em amostras de medula óssea de cobaias. As células-tronco mesenquimais foram caracterizadas como sendo uma população de células raras, de morfologia fibroblastoide, aderentes ao plástico e apresentam grande capacidade de proliferação *in vitro*, formação de colônias de células fibroblastoides e geração de tecido ósseo *in vivo* (Friedenstein *et al.*, 1968; Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina, 1970). Após descoberta e caracterização das células-tronco mesenquimais, observou-se que elas contribuíam para a homeostase tecidual, para regeneração de tecidos mesenquimais, tais como ósseo, cartilagenoso, adiposo, além de exercerem papel fundamental de suporte à hematopoese (Pittenger *et al.*, 1999). Ao longo dos anos, alguns trabalhos mostraram a capacidade dessas células de se diferenciarem em células de linhagens endodérmica e neuroectodérmica, incluindo neurônios, cardiomiócitos, hepatócitos e células endoteliais (Bernardo, Locatelli e Fibbe, 2009; Nombela-Arrieta, Ritz e Silberstein, 2011). No ano de 2005, uma nova nomenclatura para as células-tronco mesenquimais foi proposta pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT-*International Society for Cell Therapy*), tendo em vista que, as popularmente chamadas células-tronco mesenquimais, compreendiam uma população de células bastante heterogênea, sendo que, somente a minoria delas possuía as características típicas de uma célula-tronco. Sendo assim, o termo células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs- *multipotent mesenchymal stromal cells*) foi introduzido para se referir à população de células que crescem aderentes ao plástico, de morfologia fibroblastoide e capacidade multipotencial de diferenciação (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006).

As MSCs humanas foram primeiramente identificadas na medula óssea pós-natal e, desde então, as MSCs foram isoladas de uma variedade de outros tecidos adultos incluindo músculo, tecido adiposo, veias e artérias, polpa dentária, entre outros (Bianco, Robey e Simmons, 2008; Bernardo, Locatelli e Fibbe, 2009). Além disso, as MSCs podem também ser isoladas de tecidos e fluídos fetais, como o líquido amniótico, sangue, parede, veias e artérias do cordão umbilical e placenta (Barachini *et al.*, 2009; Murphy e Atala, 2013). Essa ampla diversidade de locais de onde as MSCs podem ser isoladas pode ser explicada pela possível localização perivascular das MSCs *in vivo*, uma vez que já foram identificadas células expressando marcadores de MSCs na parede dos vasos sanguíneos da medula óssea e da polpa dentária (Shi e Gronthos, 2003; Corselli *et al.*, 2010). Dessa forma, a localização perivascular das MSCs pode

representar um reservatório sistêmico de células multipotentes a fim de promover reparo tecidual imediato em casos de lesões (Da Silva Meirelles, Chagastelles e Nardi, 2006).

Apesar de serem obtidas de diferentes tecidos, as MSCs não estão presentes em grandes quantidades nesses locais. Na medula óssea, por exemplo, as MSCs compreendem somente cerca de 0,01 a 0,001% do número total de células. Sendo assim, o estabelecimento de marcadores fenotípicos se faz muito importante para o isolamento e caracterização das MSCs (**Tabela 3-Anexo 8.1**). No entanto, a expressão de alguns marcadores parece ser dependente do tecido e espécie animal de onde as MSCs são isoladas, bem como pode variar de acordo com diferentes protocolos de isolamento e cultivo, e ainda, do número de passagens que as MSCs sofreram (Calloni *et al.*, 2013). De forma geral, as MSCs caracterizam-se por: *i*) ausência ou baixa expressão de marcadores de linhagens hematopoética e endotelial, tais como CD34, CD45, CD14, CD31; *ii*) expressão de CD44, CD29, CD51/61, CD13, CD90, CD49e, CD73, CD105, CD166, CD271, CD140b e STRO; *iii*) expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1, e LFA-3 (revisado por Covas e Zago, 2006; de Carvalho e Goldenberg., 2012). As MSCs expressam MHC de classe I e não expressam MHC de classe II e moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86) em condições de homeostase, apresentando, portanto, fenótipo hipoinmunogênico (Le Blanc, Tammik, Rosendahl, *et al.*, 2003; Le Blanc e Ringdén, 2005). Desse modo, é sugerido que as MSCs escapem da vigilância do sistema imune por possuírem antígenos de superfície que são pobremente reconhecidos pelas células T alorreativas. Diferentes trabalhos da literatura sugerem que elas possam ser transplantadas de forma autóloga, alogênica, e até mesmo xenogênica, uma vez que a infusão de MSCs humanas em modelos experimentais imunocompetentes não levou à rejeição das mesmas e proporcionou bons resultados terapêuticos (Zhang *et al.*, 2005; Kerkis *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008).

As MSCs têm sido alvo de diversos estudos nos últimos anos em virtude de sua habilidade de modular a função de diversas células do sistema imune. As MSCs apresentam propriedades importantes de imunossupressão e imunorregulação, tanto em *in vitro* quanto *in vivo* (Uccelli, Moretta e Pistoia, 2006; 2008; Le Blanc e Mougiakakos, 2012). Le Blanc e colaboradores mostraram que as MSCs exerceram efeito imunossupressor em culturas mistas de linfócitos, nas quais em elevadas proporções as MSCs não só suprimiram a alorreatividade das células T como também reduziram a proliferação dos linfócitos estimulados por fitohemaglutinina (Le Blanc, Tammik, Sundberg, *et al.*, 2003). Além de atuarem sobre linfócitos T, outros trabalhos

mostraram que as MSCs exercem regulação geral sobre a resposta imune, atuando também sobre outras células do sistema imune inato e adaptativo (Aggarwal e Pittenger, 2005; Kaplan, Youd e Lodie, 2011; Le Blanc e Mougiakakos, 2012). Alguns estudos têm demonstrado que MSCs interferem na diferenciação, maturação e ativação de células dendríticas (Maccario *et al.*, 2005; Nauta *et al.*, 2006; Melief *et al.*, 2013). As MSCs regulam também a atividade de células NK (Sotiropoulou *et al.*, 2006; Spaggiari *et al.*, 2006; Casado, Tarazona e Sanchez-Margallo, 2013), proliferação de células B e produção de imunoglobulinas (Deng *et al.*, 2005; Corcione *et al.*, 2006; Tabera *et al.*, 2008). Estudos recentes relataram que as MSCs modulam também a diferenciação de células Th17 (Luz-Crawford *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013; Luz-Crawford *et al.*, 2013).

Os mecanismos responsáveis pela imunossupressão promovida pelas MSCs ainda não foram completamente elucidados, mas já foi demonstrado que tanto o contato célula-célula como a produção de fatores solúveis estão envolvidos. Dentre os fatores solúveis produzidos pelas MSCs, envolvidos na imunossupressão, destacam-se: IDO (*indoleamina 2,3-dioxigenase*), óxido nítrico, TGF- β 1, IL-10, HGF (*hepatocyte growth factor*), prostaglandina E2 (PGE2), PD-L1 e molécula HLA-G (Meirelles *et al.*, 2009; Atoui e Chiu, 2012; Dorronsoro *et al.*, 2013). Outro mecanismo pelo qual as MSCs modulam a resposta imune é por intermédio da indução/expansão de células Tregs, sendo relatado aumento da população de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em coculturas de células mononucleares de sangue periférico com MSCs (Nauta e Fibbe, 2007), e ainda, após administração *in vivo* em modelos experimentais de doenças autoimunes (Liu *et al.*, 2009; Bassi *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2012).

As MSCs, apesar de expressarem moléculas imunorreguladoras de forma constitutiva, necessitam ser ativadas para exercerem sua função imunossupressora de forma eficaz, sendo esse processo chamado de licenciamento (*licensing*). Assim, um ambiente inflamatório, com presença de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β), ativação de TLR (*toll-like receptor*) nas MSCs, se faz necessário para promover o licenciamento (Marigo e Dazzi, 2011; De Miguel *et al.*, 2012; Van Den Akker, De Jager e Sluijter, 2013). MSCs murinas cultivadas na presença de IFN- γ aumentaram significativamente a expressão das moléculas PGE-2, IDO e PD-L1 (English *et al.*, 2007; Sheng *et al.*, 2008) envolvidas na supressão da proliferação de linfócitos. Desta forma, o período de progressão da doença em que as MSCs serão administradas (profilaxia x doença estabelecida) e a natureza da doença a ser tratada (presença x

ausência de inflamação) devem ser levados em consideração para obtenção de bons resultados terapêuticos (Ren *et al.*, 2012).

Os efeitos imunomoduladores das MSCs têm sido estudados e comprovados em ampla variedade de modelos experimentais como: rejeição de enxerto/órgão, doença do enxerto contra hospedeiro (GVHD- *graft-versus-host disease*) e diversas doenças inflamatórias e autoimunes (EAE- encefalomielite autoimmune experimental, artrite reumatoide, colite, diabetes tipo 1 e sepse) (Delarosa, Dalemans e Lombardo, 2012). Atualmente, existem mais de 290 protocolos clínicos utilizando MSCs (*clinicaltrials.gov*), sendo que grande parte deles se baseia nas propriedades imunomoduladoras das MSCs. A maioria desses protocolos ainda não está finalizada, mas os dados obtidos até agora indicam que a administração de MSCs é uma prática segura, apresentando poucos efeitos indesejáveis (Lalu *et al.*, 2012; Dorronsoro *et al.*, 2013).

Além da modulação da resposta imune, as MSCs possuem capacidade de migrar para o sítio de lesão e promover reparo tecidual decorrente de inflamação ou de isquemia. Diversas moléculas envolvidas na migração celular são requeridas durante a migração das MSCs para o local de lesão, dentre elas estão os receptores das quimiocinas CCL12 (CXCR4) e CCL2 (CCR2), moléculas de adesão P-selectina e VCAM-1, e ainda, as metaloproteases MMP-1 e MMP-2. Citocinas pró-inflamatórias (TNF- e IL-1) promovem o aumento da expressão dessas moléculas, favorecendo a migração das MSCs para regiões inflamadas (Ren *et al.*, 2012). As capacidades de migração e reparo das MSCs possibilitam sua utilização como agente terapêutico em diversas doenças, como infarto do miocárdio, falência renal e hepática, entre outras (Uccelli, Moretta e Pistoia, 2008).

A escolha da via de administração mais adequada das MSCs é um fator crucial para o sucesso da terapia e deve ser escolhida de acordo com as características do processo patológico a ser tratado. A administração das MSCs por vias sistêmicas (venosa e arterial) é amplamente utilizada, uma vez que permite mais dispersão das células injetadas (Nystedt *et al.*, 2013). Diversos trabalhos avaliaram o perfil de distribuição de MSCs isoladas de diferentes fontes (medula óssea, placenta e tecido adiposo) e injetadas intravenosamente. Todos os estudos relataram, sem exceção, ocorrência de aprisionamento das MSCs nos pulmões (Gao *et al.*, 2001; Barbash *et al.*, 2003; Meyerrose *et al.*, 2007), sendo esse fenômeno resultado do diâmetro das MSCs (maior do que o dos capilares pulmonares), bem como da expressão de moléculas de

adesão pelas MSCs. Ainda não se sabe quais são os possíveis efeitos adversos do aprisionamento das MSCs nos pulmões e outras vias de administração devem ser testadas na tentativa de evitar esse fenômeno (Schrepfer *et al.*, 2007; Toma *et al.*, 2009; Nystedt *et al.*, 2013).

De forma geral, o interesse crescente na utilização das MSCs na medicina regenerativa e para a engenharia de tecidos deve-se a seu fácil isolamento, multipotencialidade, perfil hipoinmunogênico, capacidade de migração *in vivo* para locais lesados e propriedade imunomoduladora (Dorrnsoro *et al.*, 2013). Além disso, as MSCs secretam amplo espectro de moléculas bioativas como citocinas, fatores de crescimento e fatores angiogênicos que auxiliam o reparo e regeneração de regiões lesadas, na maioria das vezes pelo recrutamento e ativação de outras células- efeito parácrino (Caplan e Dennis, 2006; Meirelles *et al.*, 2009; Khubutiya *et al.*, 2014).

1.2.1 Terapia do DM-1 com MSCs

Os tratamentos convencionais para o DM-1 não estão focados na regeneração/preservação das células pancreáticas, visando somente o controle dos níveis de glicose no sangue dos pacientes. Dessa forma, o tratamento ideal para o DM-1 deveria promover o reestabelecimento das funções pancreáticas e renais, bem como controlar a resposta autoimune, na tentativa de preservar as células residuais ou neoformadas (Abdi *et al.*, 2008). Nesse cenário, as MSCs representam uma possível alternativa terapêutica no tratamento do DM-1, tendo em vista suas propriedades regenerativa e imunorreguladora. Um dos primeiros trabalhos que testou o potencial das MSCs no diabetes experimental foi conduzido por Lee e colaboradores, em 2006, utilizando MSCs humanas (hMSCs) em camundongos diabéticos imunodeficientes (NOD/scid + STZ). Os autores observaram que as hMSCs migraram e promoveram reparo tecidual no pâncreas e glomérulos renais. A glicemia dos camundongos diabéticos diminuiu e a concentração de insulina murina aumentou após a terapia (Lee *et al.*, 2006). Nos anos seguintes, diversos trabalhos investigaram o potencial terapêutico das MSCs em modelos experimentais imunocompetentes. Ezquer e colaboradores mostraram que a administração sistêmica de uma única dose de $0,5 \times 10^6$ MSCs, por via intravenosa, reverteu a hiperglicemia e preveniu nefropatia em camundongos com diabetes induzido por STZ (Ezquer *et al.*, 2008). Também no ano de

2008, foi demonstrado que as MSCs têm capacidade de cooperar com células da medula óssea (BMCs- *bone marrow cells*) no tratamento do diabetes. Após uma única injeção contendo 1×10^6 BMCs + 1×10^5 MSCs em camundongos diabéticos, a glicose sanguínea e a concentração de insulina no soro voltaram aos níveis normais, acompanhados por eficiente regeneração do tecido pancreático (Urbán *et al.*, 2008).

Com relação ao potencial imunomodulador das MSCs *in vivo*, Zhao e colaboradores mostraram que a expressão de TGF- β por MSCs murinas foi responsável pela modulação das subpopulações de células T CD4⁺ (diminuição de células Th17 e aumento de células Tregs) em camundongos NOD, resultando em reversão da hiperglicemia (Zhao *et al.*, 2008). O tratamento de ratos diabéticos com MSCs singênicas resultou em aumento da expressão de insulina e PDX-1 (*pancreas duodenum homeobox-1*) nas ilhotas pancreáticas, bem como aumentou a frequência de células Tregs (Boumaza *et al.*, 2009). Nesse mesmo sentido, Madec e colaboradores observaram que uma única dose de 1×10^5 MSCs foi capaz de reduzir a capacidade de células T diabetogênicas de se infiltrarem nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD. Além disso, as MSCs migraram para os linfonodos pancreáticos e promoveram a indução de células Tregs produtoras de IL-10 (Madec *et al.*, 2009). Ezquer e colaboradores observaram que as MSCs injetadas em camundongos diabéticos migraram preferencialmente para órgãos linfoides (placas de Peyer e linfonodos), promoveram diminuição de citocinas de padrão Th1 e aumento de citocinas Th2, bem como aumento das células Tregs. Nesse estudo, os autores correlacionaram a melhora clínica observada após a infusão de MSCs com a modulação da resposta imune ao invés da transdiferenciação das MSCs em células β pancreáticas (Ezquer *et al.*, 2012). Diferentes trabalhos mostraram que a imunomodulação promovida pelas MSCs no modelo experimental de diabetes parece ser dependente da molécula PD-L1 expressa nessas células que interage com PD-1 nos linfócitos (Jurewicz *et al.*, 2010; Bassi *et al.*, 2012).

Um estudo interessante utilizando MSCs isoladas de camundongos NOD diabéticos, conduzido por Fiorina e colaboradores em 2009, demonstrou que MSCs alogênicas (derivadas de linhagens de camundongos não diabéticos- Balb/c) retardaram o desenvolvimento da doença em camundongos NODs pré-diabéticos e reverteram, temporariamente, a hiperglicemia em 90% dos camundongos já diabéticos. Entretanto, quando utilizaram MSCs derivadas de camundongos NODs (singênicas), essas foram incapazes de produzir o mesmo efeito das MSCs alogênicas. Além disso, as MSCs

alogênicas apresentaram maior capacidade de migração para os linfonodos pancreáticos em relação às singênicas. Ainda, nesse trabalho os autores relatam que cerca de 20% dos camundongos NODs tratados com MSCs singênicas apresentaram tumores em diferentes órgãos (Fiorina *et al.*, 2009).

Na maioria dos estudos utilizando MSCs no modelo experimental de diabetes, o efeito terapêutico não parece estar associado com a transdiferenciação das MSCs em células pancreáticas, mas relacionado com as outras propriedades das MSCs, incluindo potencial imunomodulador e efeito parácrino das citocinas e dos fatores de crescimento produzidos por elas, aumentando a sobrevivência e a proliferação de células progenitoras residentes (Choi *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008).

Com base nos bons resultados provenientes da utilização das MSCs em modelos experimentais de diabetes, pelo menos seis protocolos clínicos com MSCs estão em andamento em diferentes países para tratamento do DM-1. Dentre esses, a minoria utiliza MSCs autólogas e os demais empregam MSCs alogênicas isoladas de medula óssea, sangue menstrual ou cordão umbilical (Bhonde *et al.*, 2014).

1.2.2 MSCs de pacientes com doenças autoimunes

De modo geral, o transplante de células autólogas em pacientes com doenças autoimunes e inflamatórias possui a vantagem de essas células não serem rejeitadas pelo sistema imunológico do receptor. No entanto, fatores relacionados à doença podem influenciar ou mesmo alterar as funções dessas células, dificultando o seu uso de maneira autóloga (Bhonde *et al.*, 2014). Pouco se sabe acerca das características e do potencial terapêutico das MSCs isoladas de pacientes com doenças autoimunes, sendo importante estudos detalhados acerca de suas propriedades antes da utilização em transplantes autólogos (Mazzanti *et al.*, 2008).

Considerando a hipótese da localização perivascular das MSCs no organismo e suas propriedades imunomoduladoras, sugere-se uma possível atuação das MSCs no controle da resposta imune em nível sistêmico em condições homeostáticas ou patológicas. Assim, defeitos na capacidade imunossupressora das MSCs podem resultar em doenças como esclerose múltipla e DM-1 (Da Silva Meirelles, Caplan e Nardi, 2008).

Diferentes estudos avaliaram as características de MSCs isoladas de pacientes com artrite reumatoide, esclerose sistêmica, esclerose múltipla e lúpus eritematoso sistêmico. As MSCs de pacientes com esclerose sistêmica apresentaram taxa de proliferação celular, diferenciação em adipócitos e osteócitos, formação de colônias fibroblastoides e inibição da proliferação de linfócitos ativados semelhantes às MSCs de indivíduos saudáveis (Bocelli-Tyndall *et al.*, 2007; Larghero *et al.*, 2008). As MSCs de pacientes com artrite reumatoide apresentaram capacidade reduzida de suportar a hematopoese, bem como produção de grandes quantidades TNF- α , diminuição da taxa de proliferação e perda prematura do comprimento do telômero em comparação às células isoladas de indivíduos saudáveis. Por outro lado, o potencial de diferenciação, sobrevivência e perfil imunofenotípico se mostraram semelhantes às MSCs controle (Papadaki *et al.*, 2002; Kastrinaki *et al.*, 2008; Dudics *et al.*, 2009). O transplante autólogo de MSCs de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico se mostrou seguro, promoveu aumento da frequência de células Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) nos pacientes, mas não foi observada melhora na atividade da doença (Carrion *et al.*, 2010). Com relação às MSCs de pacientes com esclerose múltipla, dados acerca da capacidade imunossupressora dessas células são controversos (Mazzanti *et al.*, 2008; De Oliveira *et al.*, 2013; Kassis *et al.*, 2013). Embora não existam trabalhos na literatura que investigaram as características de MSCs isoladas de pacientes com DM-1, MSCs isoladas de ratos diabéticos expostas ao microambiente diabético (ratos com três meses de diabetes) apresentaram dificuldade de expansão (senescência) em relação às MSCs de ratos não-diabéticos (Stolzing *et al.*, 2010).

Tendo em vista a escassez de trabalhos acerca das propriedades fenotípicas e funcionais das MSCs de pacientes com DM -1 e, considerando que a hiperglicemia e outros fatores relacionados a doença possam influenciar as características das MSCs, estudos adicionais avaliando essas variáveis são necessários para propor a utilização de MSCs como possível estratégia de tratamento do diabetes.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Considerando que ainda não está totalmente esclarecido se as MSCs isoladas de indivíduos com doenças autoimunes possuem alterações funcionais que impossibilitariam seu uso no contexto do transplante autólogo, o objetivo central do presente estudo foi: Avaliar a eficácia da infusão MSCs isoladas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM-1) recém-diagnosticado no tratamento do diabetes experimental e comparar os resultados obtidos dessa terapia com o tratamento feito com MSCs isoladas de indivíduos saudáveis.

2.2 *Objetivos específicos*

1) Estabelecer a melhor via de administração das MSCs nos camundongos diabéticos:

- Administração das MSCs em camundongos diabéticos pela via intravenosa;
- Administração das MSCs em camundongos diabéticos pela via intraperitoneal;
- Administração das MSCs em camundongos diabéticos pela via intrapancreática;
- Administração das MSCs em camundongos diabéticos pela via intraesplênica.

2) Avaliar após infusão das ADMSCs nos camundongos diabéticos:

- A evolução da glicemia;
- A massa de células pancreáticas produtoras de insulina e a concentração de insulina circulante;
- A população de células T reguladoras no baço e linfonodos pancreáticos;
- Perfil de citocinas no soro e homogeneizado pancreático;
- Perfil de migração das MSCs *in vivo*.

3) Comparar as MSCs de pacientes com DM-1 com as MSCs de indivíduos saudáveis, quanto:

- Características morfológicas;
- Perfil imunofenotípico;

- Potencial de diferenciação em adipócitos *in vitro*;
- Potencial de migração *in vitro*;
- Atividade imunossupresora *in vitro*;
- Potencial terapêutico no diabetes experimental induzido por estreptozotocina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

a) Sujeitos

As MSCs de indivíduos com DM-1 foram isoladas de pacientes submetidos ao transplante autólogo de células tronco hematopoéticas, precedido de tratamento com imunossupressão em altas doses, realizado na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. O protocolo de transplante específico para o DM-1 foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (Proc. # 10095/02) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP – RG # 7160). Todos pacientes incluídos no estudo eram recém- diagnosticados (<6 semanas), apresentando autoanticorpos anti-GAD (*anti-glutamic acid decarboxylase*) e não apresentando episódios de cetoacidose prévia. Foram colhidas amostras de medula óssea dos pacientes com DM-1 antes do transplante (pré-mobilização) e 180 dias após o transplante, para isolamento de células tronco hematopoéticas CD34⁺ e de MSCs. No presente estudo, utilizamos somente as amostras de medula óssea referente ao período de pré-mobilização e, a partir delas, isolamos as células estromais mesenquimais para compor o grupo de MSCs obtidas de pacientes diabéticos (DM1-MSCs). Foram também colhidas amostras de medula óssea de indivíduos saudáveis, não diabéticos (doadores voluntários de medula, sem histórico de diabetes na família) para isolamento das MSCs controle (C-MSCs), pareadas quanto à idade e gênero dos pacientes. A média de idade dos doadores saudáveis foi de $33,1 \pm 4,9$ anos e de $23,2 \pm 2,9$ anos nos pacientes com DM-1 ($P=0,190$), todos do sexo masculino.

b) Isolamento das MSCs de medula óssea humana

Cerca de 15 mL de medula óssea foram aspirados da crista ilíaca posterior direita de homens saudáveis (n=10) e de pacientes com DM-1 recém-diagnosticado (n=10), após consentimento assinado. A separação das células mononucleares da medula óssea foi feita utilizando gradiente de densidade Ficoll-HypaqueTM (densidade =1.077; Amersham-Pharmacia, Uppsala, Suécia). Após centrifugação, cerca de 1×10^7 células foram suspensas em meio de cultura -MEM (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA), suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB- Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), 100 µg/ml penicilina (Gibco), 100 µg/ml estreptomicina (Gibco) e 2 mM L-glutamina (Gibco). Em seguida, as células foram colocadas em

frascos de cultura de poliestireno (frascos T, área superficial de 75 cm²) e cultivadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após sete dias de cultivo, as células não-aderentes foram removidas e, adicionados 20 mL de meio de cultura fresco. O meio de cultura foi trocado a cada três dias, as células foram tripsinizadas (1% tripsina-EDTA- Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) após atingirem 80% de confluência e repicadas, consecutivamente, até a terceira/quarta passagem.

c) Caracterização morfológica das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1

MSCs de pacientes e de indivíduos saudáveis, das terceira ou quarta passagens, foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico com contraste de fase. Para facilitar a visualização da morfologia, as MSCs foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços sobre lamínulas de vidro. Após atingirem cerca de 70% de confluência, as lamínulas foram coradas com Leishman, montadas em lâminas de histologia, visualizadas e fotografadas em microscópio óptico convencional (Carl Zeiss, Alemanha).

O tamanho das MSCs foi determinado pela medida do diâmetro (Vi-Cell XR Beckman Coulter), avaliando cerca de 1600-2000 células de cada amostra.

d) Imunofenotipagem das MSCs por citometria de fluxo

Alíquotas de 1×10^5 MSCs foram incubadas com 5 µL de anticorpos monoclonais ou isotipos controle diretamente conjugados a fluorocromos por 30 minutos. Foram realizadas marcações simples ou duplas para a análise dos diversos antígenos de superfície presentes ou não nas MSCs. Após a incubação com os anticorpos, as células foram centrifugadas por 5 minutos, lavadas duas vezes com PBS, ressuspendidas em 200 µL de PBS e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSsort (Becton-Dickson-BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). Foram adquiridos 20.000 eventos/amostra com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). As análises foram realizadas utilizando o software *Cellquest* (BD). Para a caracterização imunofenotípica das MSCs humanas, foram utilizados os anticorpos monoclonais (BD) contra os seguintes marcadores: CD45, CD14, CD29, CD51/61, CD44, CD90, CD105, CD54, CD73, CD106, CD34, HLA-CLASSE I (HLA-A/B/C), HLA- CLASSE II (HLA-DRB1), CD166, CD49e, CD13, STRO-1 e KDR.

e) Diferenciação *in vitro* das MSCs em adipócitos e osteócitos

Para avaliação do potencial de diferenciação *in vitro* das MSCs em adipócitos, cerca de 3×10^4 MSCs foram colocadas em placa de cultura de 24 poços, contendo 1 mL de meio de cultivo cultura -MEM suplementado com 7,5% de SFB. Após 48 horas, o meio de cultivo foi substituído pelo meio indutor de diferenciação de adipócitos. Células cultivadas em meio -MEM com 7,5% de SFB serviram como controle do protocolo de diferenciação.

Para diferenciação em adipócitos, o meio de cultura -MEM com 7,5% de SFB foi suplementado com 100 mM de dexametasona (Prodome, Campinas, SP, Brazil), 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich) e 100 µM de indometacina (Sigma-Aldrich), pH 7,2. Durante a diferenciação, os meios indutores foram renovados a cada três dias e as células foram mantidas em cultura por 21 dias. Para verificar a ocorrência de diferenciação adipocítica após esse período, as células foram fixadas em paraformaldeído 10% durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas em álcool 70% por 3 minutos e, posteriormente, coradas com Sudan II-Escarlate e Hematoxilina de Harris. As células foram observadas em microscópio óptico para avaliação da diferenciação das MSCs em adipócitos, evidenciados pela presença de gotículas de gordura no citoplasma das células.

O meio indutor de osteogênese foi composto de -MEM com 7,5% SBF, 1 µM de dexametasona (Prodome), 200 µM de ácido ascórbico e 10 mM de -glicerolfosfato (Sigma-Aldrich). A diferenciação em osteócitos foi avaliada por meio da coloração de von Kossa. Resumidamente, as ADMSCs foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada, as células foram incubadas em solução de nitrato de prata 5% no escuro durante 30 minutos e em seguida, expostas à luz branca de uma lâmpada de 100 Watts por 60 minutos. Após esse período, as células foram incubadas por 5 minutos com solução de tiosulfato de sódio 5%, lavadas com água destilada e, por fim, coradas com Hematoxilina de Harris. As células foram observadas em microscópio óptico para avaliação da diferenciação das MSCs em osteócitos, evidenciados pela presença de depósitos de cálcio.

f) Migração *in vitro* das MSCs humanas

A migração *in vitro* foi realizada em câmaras (insertos) contendo membrana porosa de 8 µm acopladas à placa de cultura de 24 poços. Cerca de 1×10^4 MSCs na

quarta passagem, obtidas de pacientes com DM-1 e indivíduos saudáveis, foram tripsinizadas e colocadas na parte superior da câmara/inserto em meio de cultura livre de SFB (volume final 100 μ L). Na câmara inferior, foram adicionados 600 μ L de meio de cultura contendo 50% de SFB que atuou como substância quimioatraente da migração. As células foram incubadas por 6 horas, a 37°C em estufa de CO₂. Após o tempo de incubação, as membranas foram retiradas do inserto e o material fixado com paraformaldeído 10% durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Com o auxílio de haste flexível de algodão, as células presentes na face superior da membrana (células que não migraram através dos poros) foram removidas. As membranas foram coradas com Giemsa, montadas em lâminas de vidro, visualizadas e fotografadas em microscópio. No total, foram fotografados sete campos diferentes de cada membrana (para cada amostra de MSCs o ensaio foi feito em duplicata) e o número de células presentes na face inferior da membrana foi contabilizado manualmente.

g) Avaliação do potencial imunossupressor das MSCs: Cocultivo de linfócitos humanos com MSCs humanas

MSCs humanas de pacientes com DM-1 ou de indivíduos saudáveis, na terceira passagem, foram tripsinizadas e colocadas em placa de cultura de 24 poços em diferentes concentrações. Após 6 horas de incubação das MSCs, tempo necessário para total adesão das células ao fundo dos poços da placa, as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas foram adicionadas. Os PBMCs foram previamente separados do sangue periférico de doadores saudáveis por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque™ e marcados com 5 μ M de CFSE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* - Invitrogen LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA). Como estímulo para proliferação dos linfócitos, foi utilizado fitohemaglutinina-M (PHA-M) na concentração de 5 mg/mL (Sigma-Aldrich). As seguintes proporções de MSCs/PBMCs foram testadas: 1/2; 1/5; 1/10; 1/20; 1/50 e 1/100. Após 5 dias de cultivo, os linfócitos foram colhidos, marcados com anticorpo monoclonal anti-CD3 Cy-5 (BD) e a proliferação celular analisada por citometria de fluxo quanto à marcação de CFSE na população de células CD3⁺.

h) Indução do diabetes por estreptozotocina (STZ) em camundongos C57BL/6

O diabetes foi induzido quimicamente em camundongos machos da linhagem C57BL/6 (8-10 semanas de idade), após administração intraperitoneal de cinco doses

(40 mg/kg) diárias e consecutivas de estreptozotocina-STZ (Sigma-Aldrich). A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,0), mantida em gelo e utilizada dentro de 15 minutos após preparo.

i) *Isolamento das células estromais mesenquimais de tecido adiposo (ADMSCs) de camundongos Balb/c e FVB Luc⁺*

As ADMSCs (*adipose-derived mesenchymal stem cells*) foram isoladas de camundongos machos Balb/c e FVB Luc⁺ (geneticamente modificados para o gene da luciferase), de 10 semanas de idade, submetidos à remoção cirúrgica do tecido adiposo da região inguinal e epididimal após sacrifício em câmara de CO₂. O tecido foi lavado duas vezes com PBS, cortado em pequenos fragmentos e digerido com colagenase Tipo 1A na concentração de 1mg/mL (Sigma-Aldrich), durante 60 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de meio de cultura D-MEM suplementado com 15% de SFB. A suspensão celular foi filtrada em peneira de 100 µm e centrifugada por 10 minutos. A gordura em suspensão e o sobrenadante foram descartados. Em seguida, o botão de células foi ressuspensionado e as células foram colocadas em frascos T (área de 25 cm²), contendo meio de cultura D-MEM *low glucose* (Gibco), suplementado com 15% de SFB e cultivadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 72 horas, as células não-aderentes foram removidas, a garrafa foi lavada com PBS para remover as células residuais e foi adicionado meio de cultura fresco. O meio foi trocado a cada três dias até as células apresentarem confluência adequada para o repique. As células foram cultivadas até a terceira/quarta passagem e utilizadas nos experimentos *in vivo*.

j) *Administração das MSCs em camundongos diabéticos: Vias intravenosa e intraperitoneal*

Na terceira passagem, as MSCs foram tripsinizadas, lavadas com RPMI + Pulmozyme (DNase, Roche, Abbott Park, IL, USA) para evitar formação de grumos celulares e colhidas para infusão. O botão de células foi ressuspensionado em 200 µL de PBS e mantido em gelo até o momento do transplante. Para realização do transplante intravenoso, as MSCs foram injetadas lentamente no plexo orbital dos camundongos diabéticos anestesiados. Já na administração intraperitoneal, os animais foram imobilizados na ausência de sedação e as células injetadas na cavidade peritoneal. Diferentes fontes de MSCs, número de doses, quantidade de MSCs e período da doença foram testadas (**Tabela 2**, Sessão 4.1 Resultados).

k) Administração das MSCs em camundongos diabéticos: Via intrapancreática e intraesplênica

Os camundongos foram anestesiados com solução contendo 1 mL de ketamina (Ketamina-Agener União, Brasil) e 0,5 mL de xilasina (Dopaser-Hertape Calier, Minas Gerais, Brasil) diluídas em 3,5 mL de PBS, utilizada na concentração 50 µL/10 gramas de peso. A solução foi injetada por via subcutânea e os animais foram mantidos aquecidos durante o procedimento cirúrgico até a recuperação total dos efeitos da anestesia. Os animais foram mantidos isolados, onde cada gaiola continha somente um camundongo transplantado (operado), para evitar possíveis brigas e estresse.

Na quarta passagem, as ADMSCs foram tripsinizadas, lavadas com meio de cultura suplementado com Pulmozyme, peneiradas em filtro de 40 µm e colhidas para infusão nos camundongos diabéticos. O botão de células foi ressuscitado em PBS+Pulmozyme e mantido em gelo até o momento do transplante. Foi transplantada uma única dose de 1×10^6 ADMSCs nos camundongos diabéticos 20 dias após administração da última dose de STZ.

Após a anestesia, foi realizada, em ambiente asséptico, incisão no quadrante superior esquerdo na pele e peritônio dos camundongos diabéticos. Com a ajuda de pinça e compressas de gaze, o órgão de interesse (pâncreas ou baço) foi totalmente exposto para administração das ADMSCs (grupo tratado) ou PBS (grupo controle). Durante a injeção intrapancreática (**Figura 1A**), as ADMSCs ou PBS (volume final de 100 µL) foram administradas em diferentes locais ao longo da extensão do órgão. Já na injeção intraesplênica (**Figura 1B**), as ADMSCs/PBS (volume final 70 µL) foram administradas em um único local. O sangramento do baço foi estancado com haste de algodão e sobre o orifício deixado pela agulha foi colocado selante de fibrina para auxiliar no processo de coagulação e cessamento da hemorragia. Após administração das células ou PBS, os órgãos foram reposicionados na cavidade abdominal e as incisões suturadas com fio de nylon 5-0 (Bioline Fios Cirúrgicos Ltda, Goiás, Brasil). Como tratamento analgésico pós-operatório, foi utilizado Cloridrato de Tramadol (Tramal, 50 mg/mL- Medley, Campinas, Brasil), na concentração de 30 mg/kg, por via intraperitoneal (a cada 12 horas), por três dias consecutivos.

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação dos camundongos e administração de substâncias foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolos # 157/2010; # 021/2013-01- **Anexo 8.2**).

Figura 1. Procedimento cirúrgico para administração das ADMSCs pelas vias intrapancreática e intraesplênica. Os camundongos C57BL/6 diabéticos foram anestesiados com solução de ketamina e xilasina. Incisões na pele e peritônio foram feitas para exposição completa do órgão de interesse. As células estromais mesenquimais alogênicas isoladas de tecido adiposo murino (ADMSCs) foram injetadas em vários locais ao longo do pâncreas (A: via intrapancreática) ou em um único ponto no baço (B: via intraesplênica). Após administração das ADMSCs, os órgãos foram reposicionados na cavidade abdominal e os cortes suturados com fio de nylon.

1) Administração das MSCs derivadas de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1 em camundongos diabéticos: Via intraesplênica

MSCs de indivíduos saudáveis ou de pacientes com DM-1 na quarta passagem foram tripsinizadas, lavadas com meio de cultura RPMI suplementado com Pulmozyme (Roche) e colhidas para infusão nos camundongos diabéticos. O botão de células foi

ressuspendido em 70 μ L de PBS+Pulmozyme e mantido em gelo até o momento do transplante. Foi transplantada uma única dose de 1×10^6 MSCs (pool de três doadores diferentes de MSCs) nos camundongos diabéticos 20 dias após administração da última dose de STZ pela via intraesplênica (como descrito anteriormente).

m) Monitoramento da glicose sanguínea dos camundongos diabéticos

As taxas glicêmicas dos camundongos foram monitoradas periodicamente e os animais foram considerados diabéticos quando os níveis de glicemia apresentaram-se acima de 250 mg/dL, por mais de duas medições consecutivas. Para tanto, uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal e a glicemia foi avaliada usando o glicosímetro Accu-Check Active (Roche), pela manhã, na ausência de jejum. A determinação da glicemia de jejum foi realizada durante o período da manhã, após jejum de 10 horas.

n) Teste de tolerância à glicose

Após 10 horas de jejum, foi realizado o teste de tolerância à glicose nos animais diabéticos que receberam ou não as infusões de MSCs. Uma solução de glicose foi administrada na cavidade peritoneal, na concentração de 1,5 mg/kg, e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após a administração. Para isso, uma gota de sangue foi retirada da extremidade da cauda de cada animal nos determinados períodos de tempo e a taxa de glicose sanguínea foi avaliada utilizando o glicosímetro Accu-Check Active (Roche).

o) Imunofenotipagem de células T reguladoras presentes no baço e linfonodos pancreáticos

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, sendo o baço colocado em placas de cultura contendo 3 mL de meio de cultura RPMI (sem SFB). Em seguida, o tecido foi divulsionado até obtenção de suspensão celular turva. Essa suspensão foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o botão de células ressuspendido em 4 mL de tampão de lise Tris 0,17M e NH₄Cl 0,16M por 4 minutos. Para evitar a lise dos esplenócitos, foram acrescentados 10 mL de meio de cultura (RPMI + 10% de SFB). Os linfonodos pancreáticos dos animais foram colhidos e colocados em placas de cultura, contendo 3 mL de meio RPMI + 10% de SFB. Os linfonodos foram triturados sobre peneira de 100 μ m até obtenção da suspensão celular.

Alíquotas de 1×10^6 esplenócitos ou células dos linfonodos pancreáticos foram incubadas com 100 μ L de soro de coelho a 5% por 30 minutos para minimizar a possibilidade de ligação inespecífica dos anticorpos. Após esse período, as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro, com 1 μ L de anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD25 ou isotipos controle (BD) diretamente conjugados aos fluorocromos (FITC, PE, PERCP). Após a marcação com os anticorpos contra os antígenos de superfície, fixação (*FACs lysing solution*, BD) e lavagens, as células foram permeabilizadas por 10 minutos com 500 μ L de solução de permeabilização (*FACS permeabilizing solution*, BD) e, então, incubadas com o anticorpo monoclonal contra o fator de transcrição Foxp3 ou isotipo controle intracelular (BD), por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas no citômetro de fluxo.

p) Análises histológicas do pâncreas

Os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂, sendo o pâncreas colhido, fixado em solução tamponada de formaldeído 10%, incluído em parafina e cortado no micrótomo com espessura de 7 μ m. Após montagem das lâminas, os cortes foram corados por hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram observadas em microscópio óptico para análise morfológica das ilhotas pancreáticas.

q) Reações de imunoistoquímica do pâncreas

Porções do pâncreas incluídas em parafina ou congeladas em Tissue-Tek O.C.T (Sakura) foram cortadas no micrótomo a 7 μ m para realização das reações de imunoistoquímica. O material cortado, montado em lâminas de vidro, foi mantido em forno seco a 60 °C por 1 hora para adesão do tecido à lâmina. Em seguida, o material foi desparafinado e hidratado em bateria de xilol, álcool e água. A recuperação antigênica foi feita por meio da fervura dos cortes, em tampão citrato pH 6.0, por 7 minutos, no micro-ondas. Após recuperação, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com o reagente Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO Cytomation, Fort Collins, CO). Posteriormente, os cortes foram incubados com PBS+BSA 1% por 20 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas. O anticorpo primário purificado *rabbit anti-mouse* anti-insulina (diluição 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ou *rabbit anti-mouse* anti-Ki-67 (diluição 1:100; Abcam, Cambrige, UK) foi incubado por 1h. Após, foi usado o anticorpo secundário biotinilado, seguido da adição de

estreptavidina/peroxidase (kit Universal LSAB™+ Kit/HRP, DAKO Cytomation). A reação foi revelada com DAB (3,3'-diaminobenzidine - DAKO Cytomation) e contracorada com hematoxilina de Harris. As lâminas foram observadas em microscópio óptico para avaliação da massa de células produtoras de insulina e células positivas para Ki-67.

r) Dosagem de citocinas no homogeneizado pancreático e soro

Após sacrifício dos animais, porções do pâncreas foram colhidas, pesadas e congeladas a -70 °C, na presença de 700 µL de inibidor de proteases (Complete -Roche). O material foi descongelado e triturado com o auxílio do Politron (Kinematica, Lucerna, Suíça) para obtenção do homogeneizado pancreático. Após homogeneização, a preparação foi centrifugada, sendo o sobrenadante colhido e peneirado para quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-17, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-10 (Cytometric Bead Array - CBA Th1/Th2/Th17 kit - BD). As citocinas presentes no soro dos animais também foram dosadas utilizando a mesma metodologia de CBA. A concentração de TGF- β 1 no homogeneizado pancreático foi determinada por ensaio de ELISA, utilizando o kit Human/Mouse TGF- β 1 ELISA Ready-Set-Go (eBioscience, San Diego, CA).

s) Dosagem de insulina no soro

A concentração de insulina murina no soro dos camundongos foi determinada por ensaio de ELISA, utilizando o kit Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA (Alpco Diagnostics, Salem, USA).

t) Processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB)

A migração das ADMSCs administradas pelas vias intrapancreática ou intraesplência foi determinada utilizando células de camundongos geneticamente modificados para o gene da luciferase (camundongos FVB Luc⁺). As ADMSCs que expressavam a luciferase constitutivamente puderam ser localizadas utilizando a metodologia de processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB), utilizando o equipamento IVIS ("In vivo Image System") Lumina System (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA).

A luciferase em contato com a luciferina (exógena), na presença de oxigênio e ATP, converte a luciferina em oxiluciferina. A oxiluciferina é um composto altamente

energizado e instável, e tende a liberar a energia excedente sob a forma de fótons de luz (de Carvalho e Goldenberg., 2012).

No ensaio *in vitro*, foi adicionada D-luciferina (Caliper Life Sciences), na concentração de 150 µg/mL, à placa de cultura contendo as ADMSCs Luc⁺ em diferentes concentrações. Em seguida, a placa foi submetida à captura de imagens por tempo de exposição que variou de 10 segundos a 5 minutos, dependendo da intensidade do sinal bioluminescente.

Para os ensaios de migração das ADMSCs *in vivo*, foram injetadas 1×10^6 ADMSCs Luc⁺ pela via intrapancreática ou $0,5 \times 10^6$ ADMSCs Luc⁺ pela via intraesplência nos camundongos diabéticos, 20 dias após a última dose de STZ. O PIBB foi realizado após anestesia dos camundongos com 2,5% de isoflurano (Forane-Laboratórios Abbot, Abbott Park, Illinois, USA) e administração intraperitoneal de 150 mg/kg de D-luciferina. Os camundongos foram posicionados no interior do IVIS e mantidos em constante sedação com 1,5% de isoflurano durante a captura de imagens, cujo tempo de exposição variou de 10 segundos a 5 minutos. A intensidade do sinal bioluminescente foi quantificada logo após a administração das células (D+0) e após um (D+1), três (D+3), cinco (D+5), oito (D+8) e onze (D+11) dias.

Para o PIBB *ex vivo*, os animais receberam 150 mg/kg de D-luciferina intraperitonealmente e, após 10 minutos, o pâncreas, o baço e o fígado foram retirados e colocados individualmente em placa de cultura de 35 mm, contendo solução de D-luciferina (300 µg/mL). Em seguida, as placas foram submetidas à captura de imagens com tempo de exposição de 5 minutos. A intensidade do sinal bioluminescente nos órgãos foi quantificada dois dias (D+2) após administração das células.

A intensidade do sinal bioluminescente foi quantificada por meio da ferramenta ROI (*region of interest*) do software Living Image 3.0 (Caliper Life Sciences). Para isso, uma região de interesse foi manualmente desenhada para abranger o sinal luminescente, cuja unidade de intensidade é o fluxo de fóton, expresso em fótons/segundo.

u) Efeito da hiperglicemia sobre as MSCs

Os meios de cultura foram preparados com diferentes concentrações de glicose para avaliação dos possíveis efeitos que a hiperglicemia exerce sobre as MSCs. Para isso, meio de cultura -MEM suplementado com 15% de SFB foi enriquecido com D-glicose (Merck) e as seguintes concentrações de glicose foram usadas: 100 mg/dL, 250

mg/dL, 350 mg/dL e 500 mg/dL. Após a terceira passagem, as MSCs foram tripsinizadas e colocadas em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose. Todo o meio de cultura foi trocado em dias alternados. A morfologia foi acompanhada por 48, 96 e 168 horas por meio de imagens obtidas no microscópio. Após 168 horas (sete dias) de cultivo, as células foram tripsinizadas e alguns parâmetros foram avaliados. O diâmetro celular e a viabilidade celular (coloração Azul de Trypan) foram avaliados no equipamento ViCell XR (Beckman Coulter). A taxa de apoptose foi quantificada por meio da marcação para anexina V e iodeto de propídeo (BD) e analisada por citometria de fluxo. A proliferação celular foi avaliada por citometria de fluxo, por meio da utilização de anticorpo anti-Ki-67 (BD). Além disso, a expressão de diversos marcadores de superfície (CD106, HLA-DR, CD73, CD90, CD105, CD13 e CD29) foi avaliada frente às diferentes condições de cultivo por citometria de fluxo.

v) *Análises estatísticas dos dados*

Após avaliação das distribuições das diversas variáveis foram aplicados testes paramétricos ou não paramétricos. Nos casos em que se observou distribuição Gaussiana, foram utilizados os seguintes testes: i) teste *T* (*pareado* ou *não-pareado*) para avaliar as diferenças existentes entre dois grupos experimentais e ii) One-way Anova, seguido do pós-teste de Tukey para as análises de comparação com mais de dois grupos experimentais. Nos outros casos, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis, com a aproximação de Dunn, para comparação de três grupos experimentais. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de *P* foi menor do que 5% ($P < 0,05$). Os testes estatísticos e os gráficos foram realizados com o auxílio do programa *Graph Pad*.

4. RESULTADOS

4.1 Parte I. Efeito da hiperglicemia *in vitro* e estabelecimento da melhor via de administração das MSCs no modelo de diabetes experimental

a) *Influência da hiperglicemia in vitro nas MSCs humanas*

Considerando que os altos níveis de glicose podem ser prejudiciais para a sobrevivência e funções de algumas células do organismo, antes de estudar as vias mais adequadas de infusão das MSCs, avaliamos a influência da hiperglicemia nas MSCs humanas, uma vez que, em nosso estudo, essas células seriam injetadas nos camundongos diabéticos (hiperglicêmicos), na ausência de insulina exógena. Já foi relatado que a exposição de células endoteliais, células pancreáticas, células mesangiais glomerulares e células da retina a concentrações elevadas de glicose promove alterações deletérias significativas, tanto no que diz respeito à funcionalidade e à sobrevivência celular (Kolm-Litty *et al.*, 1998; Federici *et al.*, 2001; Risso *et al.*, 2001; Kusner, Sarthy e Mohr, 2004).

Para mimetizar *in vitro* o ambiente hiperglicêmico que as MSCs encontrariam quando administradas nos camundongos diabéticos (*in vivo*), o meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de glicose: 100 mg/dL, 250 mg/dL, 350 mg/dL e 500 mg/dL. Nesse cenário, a concentração de 100 mg/dL representou a concentração normal de glicose no sangue de um camundongo saudável (não diabético) e as concentrações superiores a essa simularam a quantidade de glicose presente no sangue de camundongos diabéticos (concentração > 250 mg/dL).

Diferentes amostras de MSCs derivadas de medula óssea humana (4 doadores diferentes), na quarta passagem, foram cultivadas com os meios de cultura contendo diferentes concentrações de glicose por sete dias. Acompanhamos a morfologia das células e a taxa de crescimento por 48, 96 e 168 horas e, ao final dos sete dias de cultivo, avaliamos nas MSCs a expressão de alguns antígenos de superfície, taxa de proliferação celular (Ki-67), apoptose (anexina V e iodeto de propídeo) e diâmetro celular.

Podemos observar na **Figura 2** que as MSCs apresentaram morfologia e taxa de confluência semelhantes nas diferentes concentrações de glicose, em todos os períodos avaliados.

Figura 2. Análise morfológica das MSCs cultivadas com diferentes concentrações de glicose no meio de cultura. Células estromais mesenquimais (MSCs) isoladas de medula óssea humana, na terceira passagem, cultivadas em meio com baixa concentração de glicose, foram tripsinizadas e plaqueadas em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose (100 mg/dL; 250 mg/dL; 350 mg/dL e 500 mg/dL). As MSCs foram fotografadas 48 (painel superior), 96 (painel central) e 168 (painel inferior) horas após cultivo para avaliação da morfologia e confluência. Imagens representativas de uma amostra de MSCs cultivada em diferentes concentrações de glicose. Aumento 100X.

Após sete dias na presença de diferentes concentrações de glicose, as MSCs foram avaliadas quanto ao tamanho celular, viabilidade celular, proliferação celular e taxa de apoptose (**Tabela 1, Figura 3**). Como podemos observar na **Figura 3A**, não encontramos diferenças significantes em relação ao tamanho das MSCs em todas as condições de cultivo. A porcentagem de MSCs viáveis, avaliada pela coloração de Azul de Trypan, não foi modificada independente da concentração de glicose no meio de cultura (**Figura 3B**). De forma semelhante, a taxa de proliferação celular (frequência de células Ki-67 positivas) também não foi afetada pelo aumento da concentração de glicose (**Figura 3C**). Por fim, as MSCs cultivadas com diferentes concentrações de glicose não apresentaram alterações na taxa de apoptose, ou seja, a porcentagem de

células positivas para anexina V e iodeto de propídeo foi semelhante nas diferentes condições de cultivo (**Figura 3D**).

Avaliamos também a expressão de alguns marcadores fenotípicos de MSCs frente às diferentes concentrações de glicose no meio de cultura. Como pode ser observado na **Figura 4**, não observamos diferenças significantes na expressão dos marcadores CD106, HLA-DR, CD73, CD90, CD105, CD13 e CD29 pelas MSCs cultivadas com diferentes concentrações de glicose.

De acordo com esses experimentos realizados *in vitro*, podemos sugerir que as MSCs humanas não sofreram prejuízos frente à hiperglicemia, uma vez que as células exibiram morfologia e tamanho típicos, não apresentaram aumento na taxa de apoptose, não houve alterações na expressão de antígenos de superfície e a proliferação celular se manteve constante, independentemente da concentração de glicose no meio de cultura. Dessa forma, a hiperglicemia presente nos camundongos diabéticos não representaria uma barreira na utilização das MSCs no diabetes experimental.

Figura 3. Avaliação do tamanho, viabilidade celular, taxas de proliferação e apoptose das MSCs cultivadas por 168 horas em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose. Células estromais mesenquimais (MSCs; n=4), na terceira passagem, cultivadas em meio com baixa concentração de glicose, foram tripsinizadas e plaqueadas em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose (100 mg/dL; 250 mg/dL; 350 mg/dL e 500 mg/dL). Após 168 horas de cultivo, as MSCs foram tripsinizadas, sendo: (A) o diâmetro celular determinado pelo equipamento ViCell XR; (B) viabilidade celular analisada pela contagem de células utilizando Azul de Trypan; (C) proliferação celular (células positivas para Ki-67) e (D) a taxa de apoptose (células positivas para anexina V e iodeto de propídeo) determinadas por citometria de fluxo.

Tabela 1. Efeito da hiperglicemia *in vitro* sobre as MSCs.

	100 mg/dL	250 mg/dL	350 mg/dL	500 mg/dL
Diâmetro celular (μm)	$16 \pm 0,33$	$15,91 \pm 0,27$	$16,09 \pm 0,62$	$16,10 \pm 0,13$
Viabilidade celular (% Células viáveis)	$85,06 \pm 3,45$	$86,06 \pm 4,03$	$86,10 \pm 3,83$	$85,40 \pm 4,38$
Proliferação celular (% Células Ki-67 ⁺)	$17,52 \pm 5,83$	$16,90 \pm 6,94$	$13,56 \pm 2,58$	$21,43 \pm 9,25$
Taxa de Apoptose (% Células Anexina V ⁺ PI ⁺)	$10,47 \pm 3,64$	$12,11 \pm 3,56$	$10,43 \pm 6,13$	$12,01 \pm 6,98$

Células estromais mesenquimais (MSCs; n=4), na terceira passagem, cultivadas em meio com baixa concentração de glicose, foram tripsinizadas e plaqueadas em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose (100 mg/dL; 250 mg/dL; 350 mg/dL e 500 mg/dL). Após 168 horas de cultivo, as MSCs foram tripsinizadas, sendo a taxa de apoptose (% de células positivas para anexina V e iodeto de propídeo) e proliferação celular (% de células positivas para Ki-67) determinadas por citometria de fluxo. A viabilidade celular (%) foi analisada pela contagem de células utilizando Azul de Trypan e o diâmetro celular (μm) determinado pelo equipamento ViCell XR. As porcentagens estão representadas pela média $\pm$ desvio padrão.

Figura 4. Perfil imunofenotípico das MSCs cultivadas por 168 horas em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose. Células estromais mesenquimais (MSCs; n=4), na terceira passagem, cultivadas em meio com baixa concentração de glicose, foram tripsinizadas e plaqueadas em meio de cultura com diferentes concentrações de glicose (100 mg/dL; 250 mg/dL; 350 mg/dL e 500 mg/dL). Após 168 horas de cultivo, as MSCs foram tripsinizadas e as porcentagens de células positivas para os marcadores CD106, HLA-DR, CD73, CD90, CD105, CD13 e CD29 foram determinadas por citometria de fluxo.

b) Infusão de MSCs em camundongos diabéticos: Vias intravenosa e intraperitoneal

O diabetes foi induzido em camundongos C57BL/6 machos, pela administração intraperitoneal de cinco doses diárias e consecutivas de estreptozotocina (STZ). A glicemia foi monitorada periodicamente e os camundongos foram considerados diabéticos quando apresentaram glicemia >250 mg/dL, por duas medições consecutivas.

A injeção de MSCs pela via intravenosa é amplamente utilizada e relatada por diversos trabalhos na literatura (Chamberlain *et al.*, 2007). No entanto, em nossos experimentos, a administração das MSCs por essa via (plexo orbital) ocasionou número elevado de óbitos em virtude da embolização pulmonar que as MSCs causaram logo após administração. Sendo assim, vias alternativas de administração foram testadas para minimizar o problema de aprisionamento das MSCs e embolização pulmonar observado na via intravenosa, incluindo as vias intraperitoneal, intrapancreática e intraesplênica.

Em um primeiro momento, escolhemos a via intraperitoneal para administração das MSCs por se tratar de via de fácil acesso e por não ocasionar embolia pulmonar e consequentemente óbitos após administração das células. Além disso, diversos trabalhos na literatura relataram boa resposta terapêutica utilizando MSCs administradas por essa via em diferentes modelos experimentais, como encefalomielite autoimune experimental, pancreatite e diabetes (Gordon *et al.*, 2008; Bassi *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013). Utilizando a via de administração intraperitoneal, experimentamos diversas fontes de MSCs (medula óssea humana, cordão umbilical humano e tecido adiposo murino), diferentes números de injeções (de 1 a 5), diferentes períodos da doença (8 a 27 dias após a última dose de STZ) e diferentes quantidades de células ($0,5 \times 10^6$ a $2,0 \times 10^6$ MSCs). Não observamos nenhuma melhora nos níveis de glicose no sangue dos camundongos diabéticos em todos os grupos tratados com as MSCs pela via intraperitoneal (**Tabela 2**), indicando que essa não era a via de administração mais adequada para nosso modelo experimental.

Tabela 2. Administração intraperitoneal de MSCs em camundongos diabéticos.

Número de infusões	Número de MSCs	Período após indução diabetes	Fonte MSCs
1	$0,5 \times 10^6$	8 dias	Medula óssea humana
2	$0,5 \times 10^6 / 0,8 \times 10^6$	8 e 11 dias	Medula óssea humana
3	$1,3 \times 10^6 / 1,8 \times 10^6 / 1,5 \times 10^6$	3, 8 e 12 dias	Cordão umbilical humano
4	$2 \times 10^6 / 1,3 \times 10^6 / 2 \times 10^6 / 1 \times 10^6$	8, 14, 22, 29 dias	Cordão umbilical humano
5	$1,2 \times 10^6 / 1,5 \times 10^6 / 1,5 \times 10^6 / 1,1 \times 10^6 / 1,7 \times 10^6$	6, 13, 16, 19, 22 dias	Tecido adiposo murino
5	$1,2 \times 10^6 / 1,5 \times 10^6 / 1,5 \times 10^6 / 1,1 \times 10^6 / 1,7 \times 10^6$	11, 18, 21, 24, 27 dias	Tecido adiposo murino
5	$1,2 \times 10^6 / 1,5 \times 10^6 / 1,5 \times 10^6 / 1,1 \times 10^6 / 1,7 \times 10^6$	14, 21, 24, 27, 30 dias	Tecido adiposo murino

Células estromais mesenquimais (MSCs) foram isoladas de diferentes fontes: medula óssea humana, cordão umbilical humano e tecido adiposo murino. As MSCs foram cultivadas até a terceira/quarta passagens e injetadas em camundongos diabéticos em diferentes períodos de tempo após a última dose de STZ. Diferentes números de infusões e quantidades de MSCs foram testadas.

c) Infusão de MSCs em camundongos diabéticos: Via intrapancreática

A via intrapancreática foi escolhida por ser um tipo de via de administração local, na qual a maioria das MSCs ficaria retida no pâncreas, dificultando o aprisionamento das MSCs nos pulmões e favorecendo sua manutenção no órgão de interesse. Para avaliar a eficácia da administração das MSCs pela via intrapancreática, foram utilizadas MSCs alogênicas derivadas de tecido adiposo (ADMSCs) de camundongos Balb/c, em virtude de seu fácil isolamento e ampla disponibilidade. Primeiramente, as ADMSCs foram caracterizadas quanto à morfologia, perfil imunofenotípico, potencial de diferenciação *in vitro* em adipócitos e osteócitos. Como podemos observar na **Figura 5**, as ADMSCs apresentaram todas as características típicas das células estromais mesenquimais, podendo ser utilizadas nos experimentos seguintes.

Figura 5. Caracterização das ADMSCs isoladas de tecido adiposo de camundongos Balb/c. As células estromais mesenquimais foram isoladas a partir de tecido adiposo (ADMSCs) de camundongos machos Balb/c. O tecido foi digerido com collagenase tipo I e as células plaqueadas em meio de cultura D-MEM+15% SFB. As ADMSCs foram cultivadas até as terceira e quarta passagens e caracterizadas quanto: (A) Morfologia; aumento 100X (B) Perfil imunofenotípico (% de células positivas); (C) Potencial de diferenciação *in vitro* em adipócitos, coloração Sudan II-Escarlate (100X) e (D) osteócitos, coloração von Kossa (200X). (C,D) Pannel esquerdo: meio de cultura controle; pannel direito: meio indutor de diferenciação.

ADMSCs derivadas de tecido adiposo de camundongos Balb/c foram isoladas e cultivadas até a quarta passagem. As células (1×10^6 ADMSCs diluídas em 100 μ L de PBS) foram transplantadas por via intrapancreática nos camundongos C57BL/6 diabéticos (n=12) vinte dias após o término da indução do diabetes por STZ. Nesse

primeiro momento, todos os camundongos receberam ADMSCs, não havendo, portanto, grupo controle (camundongos diabéticos tratados com PBS).

A glicemia (ausência de jejum) dos camundongos diabéticos que receberam o transplante de ADMSCs pela via intrapancreática foi acompanhada ao longo do tempo. Primeiramente, acompanhamos os animais por 35 dias após a infusão das ADMSCs, e observamos que em cerca de 50% dos camundongos houve a reversão da hiperglicemia (“Respondedores ADMSCs”; n=6), isto é, os camundongos apresentaram níveis de glicemia inferiores a 250 mg/dL. Por outro lado, a outra metade dos camundongos transplantados não apresentou mudanças nos níveis de glicose sanguínea (“Não Respondedores ADMSCs”; n=6), sugerindo que a terapia com ADMSCs se mostrou efetiva para apenas uma parcela dos animais (**Figura 6A**). A área sob a curva (*area under the curve* - AUC) da glicemia do grupo “Respondedores ADMSCs” ($8961 \pm 426,1$) foi significativamente menor ($P < 0,0001$) em relação à AUC dos camundongos “Não Respondedores ADMSCs” ($12310 \pm 330,1$) ao final dos 35 dias de acompanhamento (**Figura 6B**).

O grupo “Respondedores ADMSCs” apresentaram glicemia significativamente menor 35 dias após o transplante ($201,8 \pm 12,79$ mg/dL) em comparação com a glicemia antes do transplante ($313,5 \pm 6,96$ mg/dL; $P < 0,0001$; **Figura 7**). Por outro lado, não observamos diferenças significantes da glicemia antes e após o transplante nos camundongos “Não Respondedores ADMSCs” ($349,5 \pm 8,62$ mg/dL *versus* $334,0 \pm 17,23$ mg/dL, respectivamente).

Figura 6. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos tratados com ADMSCs pela via intrapancreática (35 dias). As células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) foram cultivadas até a quarta passagem. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante (Tx) de 1×10^6 ADMSCs, aplicadas em diversos pontos ao longo do pâncreas. (A) A glicemia foi acompanhada por 35 dias, na ausência de jejum, pela manhã. (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, $n=6$); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, $n=6$).

* $P < 0,05$ (Respondedores ADMSCs x Não Respondedores ADMSCs).

Figura 7. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 35 dias após a infusão de ADMSCs pela via intrapancreática. As células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) foram cultivadas até a quarta passagem. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante (Tx) de 1×10^6 ADMSCs, aplicadas em diversos pontos ao longo do pâncreas. A glicemia dos animais foi avaliada antes da infusão das ADMSCs (Pré) e 35 dias após o tratamento (Pós), na ausência de jejum, pela manhã. Cada barra representa a média da glicemia de um determinado grupo experimental, com o respectivo desvio padrão. Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, $n=6$); Não Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, $n=6$).

* $P < 0,05$ (Pré-tratamento x Pós-tratamento).

De forma semelhante, realizamos em outro grupo de animais diabéticos a infusão das ADMSCs pela via intrapancreática (n=12) e acompanhamos a resposta dos camundongos por um período de tempo maior após a terapia celular (70 dias após administração das células). Nesse experimento, incluímos o grupo controle (“Controles-PBS”; n=5) que foi composto por camundongos diabéticos que receberam apenas injeção de 100 µL de PBS por via intrapancreática. A administração das ADMSCs ou de PBS foi realizada 20 dias após a última dose de STZ.

O acompanhamento da glicemia dos camundongos diabéticos após a injeção intrapancreática das ADMSCs (**Figura 8A**) mostrou mais uma vez a presença de um grupo de animais que responderam à terapia (“Respondedores ADMSCs”; n=5; 42%), e outro que não apresentou melhora na hiperglicemia (“Não Respondedores ADMSCs”; n=7; 58%). O grupo controle apresentou-se hiperglicêmico durante todo o período de acompanhamento. A área sob a curva (**Figura 8B**) da glicemia do grupo de camundongos “Respondedores ADMSCs” (16630 ± 1467) foi significativamente menor ($P=0,0009$) quando comparada a AUC do grupo de animais “Não Respondedores ADMSCs” (26880 ± 1298) e dos “Controles-PBS” (26790 ± 2253).

Após jejum de 10 horas, observamos que sete animais tratados com ADMSCs apresentaram níveis de glicose sanguínea inferiores a 250 mg/dL (“Respondedores ADMSCs”) e cinco camundongos apresentaram glicemia superior a esse valor (“Não Respondedores ADMSCs”). A glicemia de jejum se mostrou significativamente menor ($P=0,0002$) no grupo de camundongos “Respondedores ADMSCs” ($166,4 \pm 12,9$ mg/dL) em comparação com o grupo de “Não Respondedores ADMSCs” ($344,8 \pm 35,7$ mg/dL) e “Controles-PBS” ($350,4 \pm 34,9$ mg/dL) 65 dias após a infusão das ADMSCs (**Figura 8C**).

Comparando a glicemia dos camundongos “Respondedores ADMSCs” antes da terapia ($278,4 \pm 8,00$ mg/dL) com a glicemia ao final dos 70 dias de acompanhamento ($183,6 \pm 25,4$ mg/dL), observamos redução significativa ($P=0,007$) nos níveis de glicose presente no sangue dos animais após tratamento (**Figura 9**). De forma contrária, o grupo de animais “Não Respondedores ADMSCs” apresentou glicemia maior ao final do experimento ($398,7 \pm 23,7$ mg/dL) em comparação à glicemia observada antes da infusão das ADMSCs ($318,0 \pm 20,3$ mg/dL; $P=0,024$).

Figura 8. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos após transplante de ADMSCs pela via intrapancreática (70 dias). Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante (Tx) de 1×10^6 ADMSCs, aplicadas em diversos pontos ao longo do pâncreas. (A) A glicemia foi acompanhada por 70 dias, pela manhã, na ausência de jejum. (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia. (C) Glicemia após 10 horas de jejum, 65 dias após administração das ADMSCs ou PBS. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs com glicemia <250 mg/dL); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs com glicemia >250 mg/dL).

* $P < 0,05$ (Respondedores ADMSCs x Controles-PBS/Não Respondedores ADMSCs).

Figura 9. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 70 dias após infusão de ADMSCs pela via intrapancreática. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante (Tx) de 1×10^6 ADMSCs, aplicadas em diversos pontos ao longo do pâncreas. A glicemia foi avaliada antes da infusão das ADMSCs (Pré) e 70 dias após o tratamento (Pós), na ausência de jejum, pela manhã. Cada barra representa a média da glicemia de um determinado grupo experimental, com o respectivo desvio padrão. Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, $n=5$); Não Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, $n=7$).

* $P < 0,05$ (Pré-tratamento x Pós-tratamento).

Com a finalidade de avaliarmos o metabolismo da glicose nos animais tratados ou não com as ADMSCs pela via intrapancreática, realizamos um teste de tolerância à glicose 65 dias após administração das células ou PBS. Após jejum de 10 horas, a glicemia foi monitorada antes da injeção intraperitoneal de glicose e 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após (**Figura 10**). A glicemia dos animais “Respondedores ADMSCs” foi significativamente menor ($P<0,05$) quando comparada com a glicemia do grupo “Não Respondedores ADMSCs” e “Controles-PBS” em todos os pontos avaliados (0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos) após administração da solução de glicose (**Figura 10A**). Quando comparamos a AUC da glicemia durante o teste de tolerância à glicose (**Figura 10B**), observamos que o grupo de camundongos “Respondedores ADMSCs” apresentou AUC significativamente menor (45560 ± 6239 ; $P=0,005$) em relação à AUC dos animais “Não Respondedores ADMSCs” (74350 ± 5289) e “Controles-PBS” (74310 ± 6521).

Setenta dias após a administração de ADMSCs ou PBS pela via intrapancreática, a concentração de insulina circulante (**Figura 10C**) foi semelhante no soro dos camundongos “Controles-PBS” ($0,27 \pm 0,07$ ng/mL), “Respondedores ADMSCs” ($0,29 \pm 0,06$ ng/mL) e “Não Respondedores ADMSCs” ($0,22 \pm 0,05$ ng/mL).

A morfologia e densidade das ilhotas pancreáticas dos camundongos diabéticos que receberam ou não o transplante de ADMSCs pela via intrapancreática foram avaliadas por meio de análises histológicas de porções do pâncreas. Podemos observar na **Figura 11A** que os animais que receberam e responderam ao tratamento com ADMSCs apresentaram ilhotas pancreáticas maiores e em maior densidade em comparação aos animais que receberam apenas infusão de PBS. Avaliamos também a massa de células produtoras de insulina pela técnica de imunoistoquímica. Podemos observar na **Figura 11B** que no grupo de camundongos “Respondedores ADMSCs” a marcação para insulina (marrom) foi evidente em toda extensão da ilhota pancreática, sugerindo presença de células produtoras de insulina. Por outro lado, ao analisarmos os camundongos “Controles-PBS”, a marcação para insulina nas ilhotas pancreáticas desses animais apresentou-se mais fraca do que os animais que receberam as ADMSCs.

Figura 10. Teste de tolerância à glicose dos camundongos C57BL/6 diabéticos 65 dias após transplante de ADMSCs pela via intrapancreática. Após jejum de 10 horas, foi administrado na cavidade peritoneal dos animais 1,5 mg/g de glicose e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após. O teste foi realizado 65 dias após a administração de PBS ou ADMSCs. (A) Monitoramento da glicemia durante o teste de tolerância à glicose. (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia durante o teste de tolerância à glicose. (C) Concentração de insulina no soro dos camundongos 70 dias após administração de PBS ou ADMSCs. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs com glicemia <250mg/dL); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs com glicemia >250mg/dL).

* $P < 0,05$ (Respondedores ADMSCs x Controles-PBS/Não Respondedores ADMSCs).

Figura 11. Histologia do pâncreas e avaliação da massa de células beta produtoras de insulina 70 dias após transplante de ADMSCs pela via intrapancreática. O pâncreas foi colhido, incluído em parafina, cortado a 7 μ m e montado em lâmina de vidro. (A) Coloração de Hematoxilina & Eosina. (B) Imunomarcacão para insulina (reação de imunoistoquímica estreptavidina/peroxidase). Aumento 100X. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs com glicemia <250mg/dL).

Trabalhos na literatura sugerem que a eficácia da terapia de MSCs no diabetes experimental pode ser resultado da modulação da resposta imune induzida pelas MSCs transplantadas. Já foi descrito que as MSCs induzem expansão da população de células T reguladoras (Casiraghi *et al.*, 2008; Gonzalez-Rey *et al.*, 2010; Luz-Crawford *et al.*, 2013) e podem também promover polarização da resposta imune para o perfil Th2. Essas alterações promovidas pelas MSCs poderiam diminuir a agressão autoimune, permitindo preservação ou expansão das células residuais.

Para elucidar se as ADMSCs administradas pela via intrapancreática promoveram alterações no sistema imunológico que poderiam ter favorecido a reversão da hiperglicemia observada em uma parte dos animais transplantados, avaliamos a frequência de células T reguladoras e o perfil de citocinas no soro e no homogeneizado pancreático dos camundongos diabéticos após tratamento.

Estudamos a frequência de células T reguladoras (Tregs; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no baço e linfonodos pancreáticos (LNP) dos camundongos 70 dias após a terapia com as ADMSCs. Podemos observar na **Figura 12** que a frequência desse subtipo celular não foi alterada no baço ou nos LNP após a intervenção com ADMSCs. A frequência de células Tregs nos LNP dos camundongos “Controles-PBS”, “Respondedores ADMSCs” e “Não Respondedores ADMSCs” foi de: $2,30 \pm 0,63\%$; $1,65 \pm 0,44\%$ e $1,74 \pm 0,42\%$; respectivamente. A frequência de células Tregs detectadas no baço dos camundongos “Controles-PBS” foi de $2,34 \pm 0,38\%$; $2,42 \pm 0,46\%$ nos camundongos “Respondedores ADMSCs” e $2,34 \pm 0,48\%$ no grupo de “Não Respondedores ADMSCs”.

As concentrações de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 foram determinadas no soro e no homogeneizado pancreático de todos os grupos experimentais pelo método de CBA. Além disso, determinamos também os níveis de TGF- β no homogeneizado pancreático por ELISA. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, tanto para as citocinas quantificadas no soro (**Figura 13**) quanto no tecido pancreático (**Figura 14**).

Figura 12. Avaliação da população de células T reguladoras Foxp3⁺ presentes nos linfonodos pancreáticos e baço 70 dias após transplante das ADMSCs pela via intrapancreática. Setenta dias após administração intrapancreática das células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) ou PBS, o baço e os linfonodos pancreáticos (LNP) foram colhidos e as células isoladas para imunofenotipagem e análise por FACS. A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada na janela de células T CD4⁺CD25⁺. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=5), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=5); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, n=7).

Figura 13. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 presentes no soro dos camundongos 70 dias após administração intrapancreática das ADMSCs. Setenta dias após administração intrapancreática de células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) ou PBS, as citocinas foram quantificadas no soro utilizando ensaio de CBA. A concentração está representada por picograma (pg) de citocina por mililitro (mL) de soro. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=5), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=5); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, n=7).

Figura 14. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4, IL-10 e TGF- β presentes no homogeneizado pancreático dos camundongos 70 dias após administração intrapancreática das ADMSCs. Setenta dias após administração intrapancreática de células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) ou PBS, porções do pâncreas foram coletadas, homogeneizadas na presença de inibidor de proteases e as citocinas quantificadas no homogeneizado pancreático pelo ensaio de CBA. A citocina TGF- β foi dosada por ELISA. A concentração está representada por picograma (pg) de citocina por grama de tecido pancreático. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=5), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=5); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, n=7).

A migração das ADMSCs após injeção intrapancreática foi avaliada utilizando ADMSCs isoladas de camundongos da linhagem FVB que expressavam constitutivamente a proteína luciferase (ADMSCs Luc⁺). Dessa forma, as células puderam ser detectadas no aparelho IVIS Lumina System (“*In Vivo Image System*”) por processamento de imagem baseado em luminescência (PIBB). As ADMSCs Luc⁺ foram caracterizadas quanto a morfologia (**Figura 15A**), perfil imunofenotípico (**Figura 15B**), e potencial de diferenciação em adipócitos (**Figura 15C**) e osteócitos (**Figura 15D**). As ADMSCs Luc⁺ apresentaram morfologia, imunofenótipo e potencial de diferenciação típicos das células estromais mesenquimais. Podemos observar na **Figura 15E** que, após contato com D-luciferina, as ADMSCs Luc⁺ foram capazes de gerar sinal bioluminescente (presença de luciferase biologicamente ativa), sendo a intensidade do sinal diretamente proporcional ao número de células plaqueadas.

Após confirmação da expressão e atividade da luciferase pelas ADMSCs *in vitro*, cerca de 1×10^6 ADMSCs Luc⁺ foram administradas em camundongos diabéticos 20 dias após a última dose de STZ pela via intrapancreática. A migração das células foi avaliada em diferentes períodos de tempo: logo após a administração das células (D+0), um (D+1), três (D+3), cinco (D+5), oito (D+8) e onze (D+11) dias após o transplante. Podemos observar na **Figura 16A** que as ADMSCs Luc⁺ permaneceram concentradas no local de injeção, ou seja, no pâncreas, por até oito dias após a administração. No período de D+11 não foi possível detectar sinal de bioluminescência, indicando que as ADMSCs Luc⁺ não sobreviveram por um longo período de tempo nos camundongos transplantados (**Figura 16B**). Considerando 100% a intensidade de sinal bioluminescente no período de D+1, podemos observar que o sinal diminuiu cerca de 10% no D+3, 42% no D+5, sendo que no D+8 a intensidade do sinal correspondeu a somente 1,8% da intensidade inicial (**Figura 16C**).

A retenção das ADMSCs Luc⁺ no pâncreas foi confirmada pela análise da bioluminescência nos órgãos *ex vivo*. Dois dias após administração das células, o pâncreas, o fígado e o baço foram colhidos e foi possível observar que a maioria das células estava concentrada no pâncreas. Poucas células foram detectadas no baço e não foi detectado sinal bioluminescente no fígado, indicando que as células ficaram retidas preferencialmente no local de injeção (**Figura 16D**).

Figura 15. Caracterização e avaliação da atividade biológica da luciferase das ADMSCs Luc⁺. As ADMSCs Luc⁺ foram isoladas de camundongos da linhagem FVB geneticamente modificados para expressão do gene da luciferase (FVB Luc⁺). Após terceira passagem, as ADMSCs Luc⁺ foram caracterizadas quanto: (A) morfologia (200X); (B) perfil imunofenotípico; (C) potencial de diferenciação em adipócitos (200X) e (D) osteócitos (100X). (E) As ADMSCs Luc⁺ foram plaqueadas em diferentes concentrações (0; 0,5x10³; 1x10⁴; 2x10⁴; 5x10⁴ e 1x10⁵ células) e o sinal bioluminescente foi avaliado após adição de 150 µg/mL de D-luciferina ao meio de cultura. A placa foi submetida à captura das imagens pelo equipamento IVIS Lumina System. As imagens foram obtidas por processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB) *in vitro* e as cores representam a intensidade de bioluminescência, conforme escala posicionada à direita da imagem.

Figura 16. Biodistribuição das ADMSCs Luc⁺ após administração intrapancreática em camundongos diabéticos. Cerca de 1×10^6 ADMSCs Luc⁺ foram injetadas pela via intrapancreática em camundongos diabéticos (n=5). O controle negativo (primeiro camundongo direita) refere-se a um camundongo diabético que recebeu PBS somente. (A) A detecção da bioluminescência foi realizada logo após a administração das células (D+0), um (D+1), três (D+3), cinco (D+5), oito (D+8) e onze (D+11) dias após. (B,C) Quantificação da bioluminescência emitida após infusão intrapancreática das ADMSCs Luc⁺. (D) Detecção das ADMSCs Luc⁺ por PIBB *ex vivo*. A detecção da bioluminescência foi realizada dois dias após o transplante das ADMSCs Luc⁺. Após sacrifício, o pâncreas, fígado e baço foram colhidos para análise da bioluminescência *ex vivo* por PIBB. As imagens foram obtidas por processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB) e as cores representam a intensidade de bioluminescência, conforme escala posicionada à direita das imagens.

d) Infusão de MSCs em camundongos diabéticos: via intraesplênica

A injeção das ADMSCs diretamente no interior do baço (intraesplênica) foi testada em virtude da circulação sanguínea do baço e sua relação com o pâncreas. À medida que a veia esplênica corre ao longo do estômago, ela envia pequenos ramos que percorrem a extensão de todo o pâncreas (veia pancreática dorsal e a veia pancreática magna), auxiliando o suprimento sanguíneo desse órgão. Sendo assim, ao injetar as MSCs no interior do baço elas conseguiriam, teoricamente, atingir o pâncreas de forma eficiente.

As ADMSCs foram novamente isoladas a partir de tecido adiposo de camundongos Balb/c e cultivadas até a terceira/quarta passagem. Cerca de 1×10^6 ADMSCs, diluídas em 70 μ L de PBS, foram transplantadas por via intraesplênica nos camundongos (n=11) 20 dias após o término da indução do diabetes por STZ. O grupo controle foi composto por camundongos diabéticos (n=6) que receberam injeção de 70 μ L de PBS por via intraesplênica.

Primeiramente, acompanhamos a glicemia (ausência de jejum) dos camundongos tratados com PBS (“Controles-PBS”) e tratados com ADMSCs (“Tratados ADMSCs”) por um período de 30 dias. Observamos que 100% dos animais que receberam as ADMSCs pela via intraesplênica apresentaram reversão da hiperglicemia, enquanto os animais “Controles-PBS” permaneceram diabéticos. No período de seis dias após a infusão das células, já foi possível observar redução significativa da glicemia dos camundongos tratados em comparação aos camundongos “Controles-PBS”, e essa diferença se manteve significativa ($P < 0,05$) durante todo período avaliado (**Figura 17A**). O grupo de camundongos “Tratados MSCs” apresentou AUC significativamente menor ($5668 \pm 277,6$) do que a AUC dos “Controles-PBS” ($9628 \pm 732,8$; $P < 0,0001$) (**Figura 17B**). Avaliando a glicemia após 10 horas de jejum, o grupo de camundongos tratados com ADMSCs ($165,7 \pm 13,33$ mg/dL) apresentou níveis de glicose sanguínea menores ($P = 0,007$) do que os animais tratados apenas com PBS ($260,8 \pm 31,59$ mg/dL; **Figura 17C**) 28 dias após tratamento.

Figura 17. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica (30 dias). As células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) foram cultivadas até a quarta passagem. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante de 1×10^6 ADMSCs alogênicas (Tx) ou de PBS aplicadas no interior do baço. (A) A glicemia foi acompanhada ao longo do tempo, na ausência de jejum, pela manhã. (B) Área sob a curva da glicemia (AUC). (C) A glicemia foi determinada após 10 horas de jejum, 28 dias após administração das ADMSCs ou PBS. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Tratados ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, $n=11$); Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados PBS, $n=6$).

* $P < 0,05$ (Tratados ADMSCs x Controles-PBS).

Trinta dias após a administração intraesplênica de ADMSCs nos camundongos diabéticos (“Tratados ADMSCs”), observamos que a glicemia foi significativamente menor ($169,8 \pm 12,8$ mg/dL) em comparação à glicemia apresentada antes da terapia celular ($337,3 \pm 14,7$ mg/dL; $P < 0,0001$; **Figura 18**).

Figura 18. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 30 dias após infusão de ADMSCs pela via intraesplênica. As células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) foram cultivadas até a quarta passagem. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam 1×10^6 ADMSCs alógenicas aplicadas no interior do baço. A glicemia foi avaliada antes da infusão das ADMSCs (Pré) e 30 após o tratamento (Pós), na ausência de jejum, pela manhã. As barras representam as médias da glicemia do grupo tratado com ADMSCs, com o respectivo desvio padrão.

* $P < 0,05$ (Pré-tratamento x Pós-tratamento).

Podemos observar na **Figura 19A** que os animais “Tratados ADMSCs” apresentaram glicemia significativamente menor ($P < 0,05$) do que os “Controles-PBS” em todos os pontos avaliados no teste de tolerância a glicose realizado 28 dias após tratamento. Além disso, a área sob a curva glicêmica do grupo “Tratados ADMSCs” (43350 ± 5124) também foi significativamente menor ($P = 0,007$) do que a AUC do grupo “Controles-PBS” (7990 ± 7947) durante o teste de tolerância à glicose (**Figura 19B**). A concentração de insulina circulante foi significativamente maior no grupo “Tratados ADMSCs” ($0,51 \pm 0,07$ ng/mL) em relação ao grupo “Controles-PBS” ($0,18 \pm 0,03$ ng/mL; $P = 0,009$; **Figura 19C**) 30 dias após administração das células.

A reversão da hiperglicemia dos camundongos “Tratados ADMSCs” não pode ser explicada por uma possível expansão das células Tregs, uma vez que eles apresentaram frequência de células Tregs semelhante ao grupo “Controles-PBS”, tanto no baço quanto nos linfonodos pancreáticos. As porcentagens de células Tregs presentes no baço dos animais “Tratados ADMSCs” e “Controles-PBS” foram de $0,97 \pm 0,16\%$ e $0,97 \pm 0,24\%$, respectivamente. Já nos linfonodos pancreáticos foram detectadas $1,35 \pm 0,19\%$ células Tregs no grupo “Tratados ADMSCs” e $1,40 \pm 0,23\%$ células Tregs no grupo “Controles-PBS” (**Figura 20**).

Figura 19. Teste de tolerância à glicose dos camundongos C57BL/6 diabéticos 28 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica. Após jejum de 10 horas, foi administrado na cavidade peritoneal dos animais 1,5 mg/g de glicose, diluída em PBS, e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após. O teste foi realizado 28 dias após a administração de PBS ou ADMSCs. (A) Monitoramento da glicemia durante o teste de tolerância à glicose. (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia durante teste de tolerância à glicose. (C) Concentração de insulina no soro 30 dias após administração de PBS ou ADMSCs. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=6), Tratados ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=11).

* $P < 0,05$ (Tratados ADMSCs x Controles-PBS).

Figura 20. Análise da população de células T reguladoras Foxp3⁺ presentes no baço e nos linfonodos pancreáticos 30 dias após administração das ADMSCs pela via intraesplênica. Trinta dias após administração intraesplênica das células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) ou PBS, o baço e os linfonodos pancreáticos (LNP) foram colhidos e as células isoladas para imunofenotipagem e análise por FACS. A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada na janela de células T CD4⁺CD25⁺. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=6), Tratados ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=11).

Análises histológicas do pâncreas evidenciaram que os camundongos “Tratados ADMSCs” apresentaram ilhotas pancreáticas com morfologia típica (arredondadas/ovaladas). Já as ilhotas pancreáticas dos camundongos do grupo “Controles-PBS” apresentaram-se com morfologia alterada, ou seja, formato “estrelado”, e com presença de células inflamatórias infiltradas (**Figura 21A**). Além disso, as ilhotas dos camundongos que receberam as ADMSCs apresentaram imunomarcagem para insulina mais intensa em comparação às ilhotas do grupo controle (**Figura 21B**).

Realizamos também imunomarcagem para a molécula Ki-67 no tecido pancreático para detecção das células em estágio de proliferação. No momento em que foi feita a análise (30 dias após a administração das ADMSCs/PBS) não observamos diferenças significantes na quantidade de células em proliferação nas ilhotas pancreáticas dos animais dos dois grupos experimentais (**Figura 22**).

Figura 21. Histologia do pâncreas e avaliação da massa de células beta produtoras de insulina 30 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica. O pâncreas foi colhido, incluído em parafina, cortado a 7 μm e montado em lâmina de vidro. (A) Coloração de Hematoxilina & Eosina. (B) Imunomarcagem para insulina (reação de imunoistoquímica estreptavidina/peroxidase). Aumento 100X. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs).

Figura 22. Expressão de Ki-67 no pâncreas dos camundongos C57BL/6 diabéticos 30 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica. O pâncreas foi coletado, congelado em Tissue-Tek e cortado a 7 μm . Os cortes foram montados em lâminas e a reação de imunoistoquímica (estreptavidina/peroxidase) foi realizada para detecção de Ki-67 (nuclear). As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico. Aumento 100x. Painel esquerdo e central: ilhotas pancreáticas; painel direito: parênquima pancreático.

Não observamos diferenças significantes nas concentrações de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 tanto no soro (**Figura 23**) quanto no homogeneizado pancreático (**Figura 24**) dos dois grupos experimentais.

Figura 23. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 presentes no soro dos camundongos 30 dias após administração intraesplênica das ADMSCs. Trinta dias após administração intraesplênica de células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) ou PBS, as citocinas foram quantificadas no soro pelo ensaio de CBA. A concentração está representada por picograma (pg) de citocina por mililitro (mL) de soro. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=6), Tratados ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=11).

Figura 24. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4, IL-10 e TGF- β presentes no homogeneizado pancreático 30 dias após administração intraesplênica das ADMSCs. Trinta dias após administração intraesplênica de células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) ou PBS, porções do pâncreas foram coletadas, homogeneizadas na presença de inibidor de proteases e as citocinas foram quantificadas no homogeneizado pancreático pelo do ensaio de CBA. A citocina TGF- β foi dosada por ELISA. A concentração está representada por picograma (pg) de citocina por grama de tecido pancreático. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=6), Tratados ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=11).

Um novo grupo experimental foi transplantado com ADMSCs pela via intraesplênica (n=10) para que a glicemia e possíveis alterações induzidas pela terapia celular pudessem ser avaliadas e detectadas por período de tempo mais prolongado (70 dias). O grupo controle foi composto por cinco camundongos diabéticos que receberam PBS por via intraesplênica. Podemos observar na **Figura 25A** que cerca de seis dias após a infusão das ADMSCs, sete camundongos apresentaram reversão da hiperglicemia (“Respondedores ADMSCs”; 70%). Por outro lado, três camundongos não responderam à terapia com ADMSCs (“Não Respondedores ADMSCs”; 30%). Os animais “Respondedores ADMSCs” apresentaram níveis de glicose no sangue significativamente menores do que os camundongos “Controles-PBS” e “Não Respondedores ADMSCs” em todo período de tempo de acompanhamento após o

tratamento ($P<0,05$). A AUC dos animais transplantados que retornaram aos níveis normais de glicose ($12390 \pm 316,3$) foi menor ($P=0,0001$) em relação à AUC dos “Controles-PBS” (23150 ± 1892) e dos camundongos “Não Respondedores ADMSCs” (25960 ± 2547 , **Figura 25B**). Ao avaliarmos a glicemia de jejum 65 dias após tratamento, observamos que 100% dos animais que receberam as infusões de ADMSCs (denominados “Tratados ADMSCs”) apresentaram níveis de glicose sanguínea inferiores a 250 mg/dL (**Figura 25C**). No grupo de camundongos “Controles-PBS” a glicemia de jejum foi significativamente maior ($277,0 \pm 41,49$ mg/dL) em relação aos grupo de camundongos “Tratados ADMSCs” ($170,1 \pm 13,44$ mg/dL; $P=0,017$).

Figura 25. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica (70 dias). As células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) foram cultivadas até a quarta passagem. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante (Tx) de 1×10^6 ADMSCs ou PBS, aplicadas no interior do baço. (A) A glicemia foi acompanhada por 70 dias, pela manhã, na ausência de jejum. (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia. (C) A glicemia foi determinada após 10 horas de jejum, 65 dias após administração das ADMSCs ou PBS. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; $n=5$), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, $n=7$); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, $n=3$); Tratados ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs e com glicemia <250 mg/dL, $n=10$).

* $P<0,05$ (Respondedores ADMSCs x Controles-PBS/Não Respondedores ADMSCs).

No grupo de camundongos “Respondedores ADMSCs”, observamos que a glicemia antes da infusão de ADMSCs era de $329,6 \pm 16,25$ mg/dL, e cerca de setenta dias após a terapia ela reduziu significativamente para $169,1 \pm 7,327$ mg/dL ($P < 0,0001$; **Figura 26**). Já no grupo de camundongos “Não Respondedores ADMSCs”, a glicemia após infusão ($401,3 \pm 78,80$ mg/dL) manteve-se semelhante à inicial ($408,5 \pm 20,16$ mg/dL).

Figura 26. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 70 dias após infusão de ADMSCs pela via intraesplênica. As células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) foram cultivadas até a quarta passagem. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante (Tx) de 1×10^6 ADMSCs, aplicadas no interior do baço. A glicemia foi avaliada antes da infusão das ADMSCs (Pré) e 70 dias após o tratamento (Pós), na ausência de jejum, pela manhã. As barras representam as médias da glicemia de um determinado grupo experimental, com o respectivo desvio padrão. Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, $n=7$); Não Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, $n=3$).

* $P < 0,05$ (Pré-tratamento x Pós-tratamento).

No teste de tolerância à glicose (65 dias após terapia), dividimos os camundongos em dois grupos experimentais somente: “Controles-PBS” e “Tratados ADMSCs”. Aqueles camundongos que se comportaram anteriormente como “Não Respondedores” na glicemia de “não jejum” apresentaram valores de glicemia de jejum semelhante aos “Respondedores ADMSCs” e foram agrupados em um único grupo: “Tratados ADMSCs”. Podemos observar na **Figura 27A** que o grupo de camundongos “Tratados ADMSCs” apresentou glicemia significativamente reduzida em comparação ao grupo “Controles PBS” em todos os períodos do teste de tolerância à glicose, exceto aos 60 minutos. Além disso, a AUC durante o teste (**Figura 27B**) foi significativamente

menor nos camundongos “Tratados ADMSCs” (54760 ± 2135) em relação à AUC dos camundongos “Controles PBS” (78260 ± 8214 ; $P=0,008$). A concentração de insulina no soro dos camundongos “Respondedores ADMSCs” ($1,43 \pm 0,2$ ng/mL) foi significativamente maior em relação à dos “Controles-PBS” ($0,73 \pm 0,1$ ng/mL, $P=0,04$; **Figura 27C**), setenta dias após a administração de ADMSCs.

Figura 27. Teste de tolerância à glicose dos camundongos C57BL/6 diabéticos 65 dias após transplante de ADMSCs pela via intrapaesplênica. Após jejum de 10 horas, foi administrado na cavidade peritoneal dos animais 1,5 mg/g de glicose, diluída em PBS, e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após. O teste foi realizado 65 dias após a administração de PBS ou ADMSCs. (A) Monitoramento da glicemia durante o teste de tolerância à glicose, (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia durante o teste de tolerância à glicose. (C) Concentração de insulina no soro dos camundongos 70 dias após administração de ADMSCs ou PBS. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS, $n=5$), Tratados ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs com glicemia <250 mg/dL, $n=10$); Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, $n=7$); Não Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, $n=3$).

* $P<0,05$ (Tratados ADMSCs x Controles-PBS; Respondedores ADMSCs x Controles-PBS/Não Respondedores ADMSCs).

Podemos observar na **Figura 28** que o grupo de camundongos “Respondedores ADMSCs” apresentou ilhotas pancreáticas maiores, em maior densidade (**Figura 28A**) e com marcação para insulina mais intensa (**Figura 28B**) quando comparadas às do grupo “Controles-PBS”.

Figura 28. Histologia do pâncreas e avaliação da massa de células beta produtoras de insulina 70 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica. O pâncreas foi colhido, incluído em parafina, cortado a 7 μm e montado em lâmina de vidro. (A) Coloração de Hematoxilina & Eosina. (B) Imunomarcagem para insulina (reação de imunoistoquímica estreptavidina/peroxidase). As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico. Aumento 100X. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia).

Setenta dias após tratamento, não observamos diferenças significativas na quantidade de células em proliferação (Ki-67⁺) nas ilhotas dos camundongos “Controles-PBS” e Respondedores ADMSCs” (**Figura 29**).

Figura 29. Expressão de Ki-67 no pâncreas dos camundongos C57BL/6 diabéticos 70 dias após transplante de ADMSCs pela via intraesplênica. O pâncreas foi coletado, congelado em Tissue-Tek e cortado a 7 µm. Os cortes foram montados em lâminas e a reação de imunistoquímica (estreptavidina/peroxidase) foi realizada para detecção de Ki-67 (nuclear). As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico. Aumento 100X.

Com relação às células Tregs, não observamos diferenças significantes na frequência dessa população celular, tanto no baço quanto nos linfonodos pancreáticos, dos diferentes grupos experimentais (**Figura 30**). As porcentagens de células Tregs no baço dos camundongos “Controles-PBS”, “Respondedores ADMSCs” e “Não Respondedores ADMSCs” foram de, respectivamente: $0,82 \pm 0,06\%$; $0,71 \pm 0,06\%$ e $0,79 \pm 0,007\%$ ($P=0,496$). Já nos linfonodos pancreáticos, as porcentagens de células Tregs dos camundongos “Controles-PBS”, “Respondedores ADMSCs” e “Não Respondedores ADMSCs” foram de, respectivamente: $1,42 \pm 0,22\%$; $1,01 \pm 0,46\%$ e $0,58 \pm 0,01\%$ ($P=0,526$).

Não observamos diferenças significantes nas concentrações das citocinas quantificadas no soro e no homogeneizado dos grupos experimentais (**Figuras 31 e 32**), com exceção dos níveis de TNF- no soro ($P=0,004$) e de TGF- no tecido pancreático ($P=0,02$) que se apresentaram elevados no grupo “Respondedores ADMSCs” ($7,50 \pm 2,76$ pg/mL; $974,3 \pm 213,3$ pg/g) em comparação com os grupos “Controles-PBS” ($3,97 \pm 1,61$ pg/mL; $441,3 \pm 86,4$ pg/g) e “Não Respondedores ADMSCs” ($0,89 \pm 1,08$ pg/mL; ND).

Figura 30. Avaliação da população de células T reguladoras Foxp3⁺ presentes no baço e linfonodos pancreáticos 70 dias após transplante das ADMSCs pela via intraesplênica. Setenta dias após administração intraesplênica das células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) ou PBS, o baço e os linfonodos pancreáticos (LNP) foram colhidos e as células isoladas para imunofenotipagem e análise por FACS. A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada na janela de células T CD4⁺CD25⁺. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=5), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=7); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, n=3).

Figura 31. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 presentes no soro dos camundongos 70 dias após administração intraesplênica das ADMSCs. Setenta dias após administração intraesplênica de células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) ou PBS, as citocinas foram quantificadas no soro utilizando ensaio de CBA. A concentração está representada por picograma (pg) de citocina por mililitro (mL) de soro. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=5), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=7); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, n=3).

Figura 32. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4, IL-10 e TGF- β presentes no homogeneizado pancreático dos camundongos 70 dias após administração intraesplênica das ADMSCs. Setenta dias após administração intraesplênica de células estromais mesenquimais de tecido adiposo murino (ADMSCs) ou PBS, porções do pâncreas foram coletadas, homogeneizadas na presença de inibidor de proteases e as citocinas quantificadas no homogeneizado pancreático pelo ensaio de CBA. TGF- β foi dosado por ELISA. A concentração está representada por picograma (pg) de citocina por grama de tecido pancreático. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=5), Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que responderam à terapia, n=7); Não Respondedores ADMSCs (Camundongos diabéticos tratados com ADMSCs que não responderam à terapia, n=3). ND: Não detectado.

A migração das ADMSCs após injeção intraesplênica foi avaliada por PIBB (**Figura 33A**). Logo após a injeção das ADMSCs Luc⁺ (D+0) foi possível observar que as células se concentraram no baço e no fígado dos camundongos transplantados. Com o passar dos dias, a localização das células injetadas não foi alterada e após oito dias não foi possível observar sinal bioluminescente. De forma interessante, o sinal bioluminescente aumentou no período D+1 em relação ao D+0, mas com o passar do tempo a intensidade foi diminuindo rapidamente (**Figura 33B**). Considerando 100% a intensidade do sinal bioluminescente no período D+1, observamos queda de 56% no período D+3, 88% em D+5 e no período D+8 a intensidade do sinal era de apenas 5% em relação à inicial (**Figura 33C**). Com a utilização do PIBB *ex vivo*, observamos que

dois dias após a injeção intraesplênica das ADMSCs Luc⁺ as células permanecem no baço e uma parcela migrou para o fígado (**Figura 33D**).

Figura 33. Biodistribuição das ADMSCs Luc⁺ após administração intraesplênica em camundongos diabéticos. Cerca de $0,5 \times 10^6$ ADMSCs Luc⁺ foram injetadas pela via intraesplênica em camundongos diabéticos (n=5). O controle negativo (primeiro camundongo esquerda) refere-se a um camundongo diabético que recebeu PBS somente. (A) A detecção da bioluminescência foi realizada logo após a administração das células (D+0), um (D+1), três (D+3), cinco (D+5) e oito (D+8) dias após. (B,C) Quantificação da bioluminescência emitida após infusão intrapancreática das ADMSCs Luc⁺. (D) Detecção das ADMSCs Luc por PIBB *ex vivo*. A detecção da bioluminescência foi realizada dois dias após o transplante das ADMSCs Luc⁺. Após sacrifício, o pâncreas (esquerda), fígado (centro) e baço (direita) foram colhidos para análise da bioluminescência *ex vivo* por PIBB. As imagens foram obtidas por processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB) e as cores representam a intensidade de bioluminescência, conforme escala posicionada à direita das imagens.

A injeção de MSCs alogênicas (Balb/c) pela via intraesplênica se mostrou eficiente na reversão da hiperglicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos. No entanto, foi preciso testar se as MSCs humanas (xenogênicas) seriam capazes de proporcionar boa resposta terapêutica, para assim serem feitos os ensaios de comparação das características funcionais das MSCs de indivíduos saudáveis com as MSCs de pacientes com DM-1.

Para isso, as MSCs humanas foram isoladas a partir de amostra de medula óssea de indivíduos saudáveis (hMSCs) e cultivadas até terceira passagem. Em seguida, as células foram tripsinizadas e injetadas (1×10^6 hMSCs) em camundongos diabéticos (20 dias após indução do diabetes) pela via intraesplênica. Oito camundongos diabéticos foram transplantados e observamos que 75% ($n=6$) dos animais apresentaram reversão da hiperglicemia (“Respondedores hMSCs”), enquanto que os demais se mantiveram com glicemia superior a 250 mg/dL (“Não Respondedores hMSCs”). Camundongos diabéticos receberam somente injeção de PBS pela via intraesplênica (“Controles-PBS”, $n=6$) e serviram como controle do experimento.

Podemos observar na **Figura 34A** que os camundongos “Respondedores hMSCs” apresentaram glicemia significativamente menor ($P<0,05$) em relação aos “Controles-PBS” e “Não Respondedores hMSCs” durante todo período de acompanhamento (30 dias). A AUC dos camundongos “Respondedores hMSCs” ($7994 \pm 435,2$) também foi significativamente menor em comparação com as AUC dos “Controles-PBS” ($11240 \pm 646,1$; $P=0,001$). A diferença entre a AUC dos camundongos “Respondedores hMSCs” e dos “Não Respondedores hMSCs” não foi significativa, apesar de a primeira ser menor que a segunda (**Figura 34B**). A glicemia de jejum do grupo “Respondedores hMSCs” ($188,2 \pm 17,02$ mg/dL; $P<0,05$) foi significativamente menor do que a observada nos demais grupos ($283,8 \pm 29,5$ mg/dL “Controles-PBS”; $296,5 \pm 25,5$ mg/dL “Não Respondedores hMSCs”: **Figura 34C**), 28 dias após tratamento.

A glicemia dos camundongos “Respondedores hMSCs” foi significativamente menor 30 dias após o transplante das hMSCs ($205,0 \pm 22,4$ mg/dL) em comparação com a glicemia antes da terapia celular ($373,7 \pm 19,6$ mg/dL; $P=0,0002$). Os animais “Não Respondedores hMSCs” não apresentaram alterações nos níveis de glicose sanguínea antes ($351,5 \pm 16,5$ mg/dL) e após ($294,5 \pm 45,5$ mg/dL; $P=0,360$) a infusão das células (**Figura 35**).

Figura 34. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos após transplante de hMSCs pela via intraesplênica (30 dias). As células estromais mesenquimais de medula óssea humana (hMSCs) foram cultivadas até a terceira passagem. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante (Tx) de 1×10^6 hMSCs ou PBS, aplicadas no interior do baço. (A) A glicemia foi acompanhada por 30 dias, pela manhã, na ausência de jejum. (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia. (C) A glicemia foi determinada após 10 horas de jejum, 28 dias após administração das hMSCs ou PBS. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=6), Respondedores hMSCs (Camundongos diabéticos tratados com hMSCs que responderam à terapia, n=6); Não Respondedores hMSCs (Camundongos diabéticos tratados com hMSCs que não responderam à terapia, n=2).

* $P < 0,05$ (Respondedores hMSCs x Controles-PBS/Não Respondedores hMSCs).

Figura 35. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 30 dias após infusão de hMSCs pela via intraesplênica. As células estromais mesenquimais de medula óssea humana (hMSCs) foram cultivadas até a terceira passagem. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante (Tx) de 1×10^6 hMSCs ou PBS, aplicadas no interior do baço. A glicemia foi avaliada antes da infusão das hMSCs (Pré) e 30 dias após o tratamento (Pós), na ausência de jejum, pela manhã. As barras representam as médias da glicemia de um determinado grupo experimental, com o respectivo desvio padrão. Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com hMSCs que responderam à terapia, n=6); Não Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com hMSCs que não responderam à terapia, n=2).

* $P < 0,05$ (Pré-tratamento x Pós-tratamento).

Tendo em vista que as hMSCs reduziram os níveis de glicose sanguínea dos camundongos diabéticos nesse ensaio preliminar, partirmos para a caracterização das MSCs derivadas de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1 e, finalmente, para os ensaios *in vivo* com as MSCs de ambas as fontes.

4.2 Parte II. Comparação das características fenotípicas e funcionais das MSCs isoladas de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1

a) Análise morfológica das MSCs isoladas de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1

Células estromais mesenquimais (MSCs) foram isoladas a partir de amostras de medula óssea de indivíduos saudáveis (C-MSCs) e de pacientes com DM-1 recém-diagnosticado (DM1-MSCs). Na terceira passagem, as células foram coradas, visualizadas em microscópio e fotografadas para análise morfológica.

Podemos observar na **Figura 36** que as MSCs isoladas de indivíduos saudáveis (**Figura 36A**) apresentaram as mesmas características morfológicas das MSCs de pacientes com DM-1 (**Figura 36B**), ou seja, ambas MSCs exibiram morfologia fibroblastoide típica, com crescimento de forma aderente ao plástico.

Para uma análise mais detalhada das características morfológicas das MSCs, o diâmetro das células em suspensão foi mensurado, utilizando o equipamento ViCell XR. Podemos observar que as MSCs compreendem uma população de células heterogêneas quanto o tamanho, sendo que dois picos foram evidentes em relação à distribuição do diâmetro, um compreendendo células de menor diâmetro (cerca de 10 μm) e o outro de células maiores (20 μm). Esse perfil de distribuição foi observado nas C-MSCs e nas DM1-MSCs (**Figura 37A**) e não observamos diferenças significantes no diâmetro das MSCs estudadas ($15,35 \pm 0,71 \mu\text{m}$ C-MSC *versus* $15,32 \pm 0,56 \mu\text{m}$ DM1-MSC; **Figura 37B**).

Figura 36. Análise morfológica das MSCs isoladas de medula óssea de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1. As células estromais mesenquimais (MSCs) foram isoladas a partir de aspirado de medula óssea de indivíduos saudáveis (C-MSCs; painel superior) e de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs; painel inferior), separadas por gradiente de densidade e cultivadas em meio de cultura -MEM com 15% de soro bovino fetal. Na terceira passagem, as células foram visualizadas em microscópio de contraste de fase e coradas com Leishman. Aumentos: 40X, 100X, 200X, respectivamente.

Figura 37. Comparação do diâmetro das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1. (A) Perfil de distribuição do diâmetro das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1. Células estromais mesenquimais (MSCs) de indivíduos saudáveis (C-MSCs; painel esquerdo) e de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs; painel direito), na quarta passagem, foram tripsinizadas e o diâmetro celular determinado pelo do equipamento ViCell XR. As barras representam o número de MSCs que possuem um determinado diâmetro. (B) Comparação do diâmetro das MSCs. O diâmetro das C-MSCs (n=5) e DM1-MSCs (n=5) em suspensão foi determinado pelo do equipamento ViCell XR. As barras representam o valor médio do diâmetro de cada grupo, com o respectivo desvio padrão.

b) Perfil imunofenotípico das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1

As MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1 foram caracterizadas na terceira passagem quanto à presença/ausência de marcadores de superfície comumente utilizados para imunofenotipagem dessas células, ou seja, aqueles de alta expressão (80%), CD90, CD73, CD105, CD44, CD29, CD49e e CD13; os de expressão intermediária CD54, HLA-CLASSE I, CD166, CD106 e STRO-1, e ainda, os de baixa expressão CD45, CD14, CD34, HLA-CLASSE II, CD51/61 e KDR.

As comparações entre as percentagens de C-MSCs e DM1-MSC expressando os antígenos de alta expressão (**Figura 38A**), de expressão intermediária (**Figura 38B**), ou ainda, os de baixa expressão (**Figura 38C**) não mostraram diferenças significantes.

Figura 38. Perfil imunofenotípico das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1. Na terceira passagem, as MSCs de indivíduos saudáveis (C-MSCs) e de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs) foram tripsinizadas e marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos contra diversos antígenos de superfície e analisadas por citometria de fluxo (C-MSCs/ n=12; DM1-MSCs/ n=12). Para análise, foi desenhada uma janela na população de células viáveis, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho e granularidade. As barras representam o valor médio das porcentagens de células positivas para um determinado antígeno de superfície, com o respectivo desvio padrão.

c) Avaliação do potencial de diferenciação em adipócitos das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1

Está bem estabelecido que as MSCs diferenciam-se em células da linhagem mesodérmica, isto é, adipócitos, condrócitos e osteócitos. Assim, investigamos a capacidade de as MSCs isoladas de pacientes com DM-1 em se diferenciarem em adipócitos, utilizando meio de cultura indutor de adipogênese. Após cultivo, verificamos que as C-MSCs e as DM1-MSCs foram capazes de se diferenciaram em adipócitos *in vitro*, não sendo observadas diferenças na intensidade de diferenciação de ambas as MSCs (**Figura 39**).

Figura 39. Potencial de diferenciação em adipócitos das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1. As MSCs foram isoladas a partir de medula óssea de indivíduos saudáveis (C-MSCs) e de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs), separadas por gradiente de densidade e cultivadas em meio de cultura -MEM com 15% de soro bovino fetal. Na terceira passagem, as células foram cultivadas em -MEM com 15% de soro bovino fetal (meio controle) ou em meio indutor de adipogênese. Após 21 dias de cultivo, as células foram coradas com SudanII-Escarlate e H&E e observados em microscópio óptico. Imagens representativas de MSCs cultivadas em meio indutor de diferenciação. Aumentos 100X, 200X e 400X.

d) Avaliação do potencial de migração *in vitro* das MSCs de indivíduos saudáveis e pacientes com DM-1

Com intuito de avaliar a migração *in vitro* das MSCs de pacientes com DM-1 e de indivíduos saudáveis, foi realizado ensaio clássico de migração celular, utilizando soro fetal bovino (SFB) como quimioatraente. Podemos observar na **Figura 40** que um número mais elevado de DM1-MSCs ($789,1 \pm 106,8$) migrou através dos poros da membrana de nylon em direção ao SFB em relação às C-MSCs ($385,8 \pm 61,02$, $P=0,006$).

Figura 40. Migração *in vitro* das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1. MSCs na quarta passagem, isoladas de indivíduos saudáveis (C-MSCs) e de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs), foram plaqueadas na parte superior do inserto em meio de cultura livre de soro fetal bovino. As MSCs foram estimuladas a migrar através de uma membrana (poros de $8\mu\text{m}$), utilizando meio de cultura contendo 50% soro fetal bovino (quimioatraente) na parte inferior do inserto. As células foram incubadas por 6 horas em estufa de CO_2 . (A, B) Após incubação, a membrana foi corada com Hematoxilina de Harris e montada em lâmina de vidro. Imagens representativas de três amostras diferentes de (A) C-MSCs e (B) DM1-MSCs. (C) O número de MSCs que migraram após 6 horas de estímulo foi contabilizado manualmente. As barras representam a média do número de MSCs que migraram de cada grupo experimental (C-MSCs/n=5; DM1-MSCs/n=5), com o respectivo desvio padrão. (* $P < 0,05$).

e) Avaliação da capacidade imunossupressora (*in vitro*) das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1

Considerando uma possível aplicação clínica das MSCs na terapia do DM-1, as propriedades de imunomodulação e imunossupressão são extremamente importantes na tentativa de conter o processo autoimune característico da doença. Pensando nisso, avaliamos o potencial imunossupressor *in vitro* das MSCs de pacientes com DM-1 e comparamos os resultados com os observados para as C-MSCs. Para isso, as MSCs foram cocultivadas com linfócitos humanos (*peripheral blood mononuclear cells*-PBMC) marcados com CFSE e ativados com PHA (*phytohaemagglutinin*) por cinco dias. Podemos observar na **Figura 41** que as MSCs de ambas as fontes inibiram de forma eficiente a proliferação dos linfócitos nas concentrações de 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20 (MSCs:PBMC). Por outro lado, nas concentrações de 1:50 e 1:100, a porcentagem de proliferação dos linfócitos foi semelhante à observada na ausência de MSCs (PBMC+PHA). As comparações das atividades imunossupressoras (diminuição da proliferação) das MSCs de pacientes com DM-1 com as MSCs as controles não evidenciaram diferenças significantes, em todas as concentrações estudadas.

Figura 41. Efeito supressor de MSCs isoladas de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM1 sobre linfócitos estimulados. A proliferação de linfócitos alogênicos foi avaliada por citometria de fluxo, pelo método de diluição de CFSE. PBMCs foram isoladas de indivíduos saudáveis, marcadas com CFSE, estimuladas com PHA (5 µg/ml) e cultivadas em diferentes concentrações (MSC:PBMC- 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100) por 5 dias a 37°C. As porcentagens de proliferação de PBMCs estimuladas com PHA ou PBMCs estimuladas com PHA na presença de MSCs foram calculadas. As barras representam a média da proliferação dos linfócitos cocultivados com MCSs isoladas de indivíduos saudáveis (C-MSCs/n=6) ou de pacientes com DM1 (DM1-MSCs/n=3).

f) Avaliação do potencial terapêutico das MSCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com DM-1 no diabetes experimental

Considerando que: 1) as MSCs de pacientes com DM-1 apresentaram morfologia, tamanho, perfil imunofenotípico, potencial de diferenciação em adipócitos e capacidade imunossupressora *in vitro* semelhantes às MSCs de indivíduos saudáveis; 2) a via de administração intraesplênica foi a mais adequada para infusão das MSCs em camundongos diabéticos; 3) a hiperglicemia não afetou significativamente as funções das MSCs *in vitro*, o próximo passo foi avaliar o potencial terapêutico das MSCs de pacientes com DM-1 e de indivíduos saudáveis no modelo experimental de diabetes induzido por STZ.

Foram transplantados 9 camundongos diabéticos com C-MSCs, 9 camundongos diabéticos com DM1-MSCs e 6 camundongos diabéticos receberam somente PBS pela via intraesplênica. De forma geral, as MSCs oriundas de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs) apresentaram comportamento semelhante às MSCs de indivíduos saudáveis quando injetadas em camundongos diabéticos, conforme avaliado por diversas variáveis. Assim:

i) Em ambos os grupos tratados com MSCs (C-MSCs ou DM1-MSCs), 6 camundongos apresentaram reversão da hiperglicemia e 3 camundongos permaneceram diabéticos. Os tratamentos com C-MSCs ou DM1-MSCs promoveram perfis de respostas semelhantes, ou seja, a reversão da hiperglicemia foi observada nos primeiros seis dias após a administração das células e houve manutenção dos níveis normoglicêmicos durante os 35 dias de acompanhamento após a terapia (**Figura 42A**). A área sob a curva da glicemia dos camundongos tratados com C-MSCs ($7183,11 \pm 839,11$) foi semelhante à AUC do grupo tratado com DM1-MSCs ($6568,33 \pm 604,96$). Além disso, a AUC dos dois grupos tratados foi significativamente menor em comparação ao grupo “Controles-PBS” ($11728,17 \pm 2805,10$; $P < 0,005$; **Figura 42B**). Trinta dias após infusão das células, todos os camundongos (100%) tratados com C-MSCs ou DM1-MSCs apresentaram níveis de glicose no sangue inferiores a 250 mg/dL após jejum de 10 horas. A glicemia de jejum dos camundongos tratados com DM1-MSCs ($147,1 \pm 17,53$ mg/dL) ou C-MSCs ($141,8 \pm 9,08$ mg/dL) foi significativamente menor em comparação à glicemia do grupo “Controles-PBS” ($283,8 \pm 29,50$ mg/dL, $P < 0,0001$; **Figura 42C**).

ii) Após o tratamento com C-MSCs (**Figura 43A**), os camundongos apresentaram níveis de glicose sanguínea significativamente menores ($202,33 \pm 32,11$ mg/dL) em comparação aos observados antes da terapia ($315,41 \pm 33,96$ mg/dL; $P=0,0001$). O mesmo aconteceu com o grupo tratado com DM1-MSCs (**Figura 43B**), no qual a glicemia antes do transplante era $312 \pm 33,84$ mg/dL e 35 dias após infusão das DM1-MSCs reduziu para $212,66 \pm 31,25$ mg/dL ($P=0,0004$).

iii) No teste de tolerância à glicose (30 dias após terapia), os grupos “Tratados DM1-MSCs” e “Tratados C-MSCs” apresentaram curvas glicêmicas semelhantes, sendo que a glicemia de ambos os grupos, em todos os pontos avaliados após administração da solução de glicose, foi significativamente menor em relação ao grupo “Controles-PBS” ($P<0,05$; **Figura 44A**). A AUC durante o teste de tolerância à glicose do grupo tratado com C-MSCs ($45880,17 \pm 8219,11$) foi semelhante à AUC do grupo que recebeu as DM1-MSCs ($51740,33 \pm 5005,53$). No entanto, a AUC dos camundongos controles ($78152,67 \pm 6979,88$) foi significativamente maior ($P<0,0001$) em comparação às AUCs dos camundongos tratados (**Figura 44B**).

iv) A concentração de insulina circulante (**Figura 44C**) foi significativamente maior nos grupos “Tratados DM1-MSCs” ($0,82 \pm 0,09$ ng/mL; $P<0,007$) e “Tratados C-MSCs” ($0,81 \pm 0,12$ ng/mL; $P<0,02$) em relação ao grupo “Controles-PBS” ($0,39 \pm 0,05$ ng/mL) 35 dias após administração das MSCs ou PBS.

v) Não houve diferenças significantes na frequência de células Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no baço e linfonodos pancreáticos dos grupos “Controles-PBS” ($2,07 \pm 0,19\%$ e $0,51 \pm 0,21\%$), “Tratados DM1-MSCs” ($2,27 \pm 0,18\%$ e $0,51 \pm 0,21\%$) e “Tratados C-MSCs” ($2,28 \pm 0,30\%$ e $0,43 \pm 0,24\%$) (**Figura 45**).

vi) Não observamos diferenças significantes nas concentrações de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 no soro dos grupos estudados (**Figura 46**). Por outro lado, a concentração de IL-2 no homogeneizado pancreático dos grupos tratados com DM1-MSCs ($90,20 \pm 55,86$ pg/g) e C-MSCs ($96,72 \pm 46,36$ pg/g) apresentou-se significativamente reduzida em comparação ao grupo “Controles-PBS” ($161,96 \pm 47,22$ pg/g, $P<0,05$ para ambas comparações). Além disso, a concentração de IFN- γ também estava reduzida no homogeneizado pancreático dos camundongos “Tratados DM-1”

($3,92 \pm 3,60$ pg/g) e “Tratados C-MSCs” ($6,09 \pm 5,25$ pg/g) em relação aos “Controles-PBS” ($18,60 \pm 8,22$ pg/g). O grupo “Tratados DM1-MSCs” apresentou níveis de IL-4 significativamente reduzidos ($24,24 \pm 8,58$ pg/g) comparados aos do grupo “Controles-PBS” ($53,61 \pm 24,05$ pg/g; $P=0,02$). Os níveis de IL-6, TNF- α e IL-17 apresentaram-se ligeiramente reduzidos nos grupos tratados com DM1-MSCs e C-MSCs em relação ao grupo controle, no entanto essas diferenças não foram significantes (**Figura 47**).

vii) O tratamento com C-MSCs ou DM1-MSCs promoveu de forma semelhante a redução do processo inflamatório local (insulite), preservação da morfologia das ilhotas pancreáticas (**Figura 48**) e aumento da massa de células produtoras de insulina (**Figura 49**).

viii) Trinta e cinco dias após administração das MSCs/PBS, a quantidade de células em proliferação (Ki-67⁺) nas ilhotas pancreáticas foi semelhante nos três grupos experimentais estudados (**Figura 50**).

Figura 42. Acompanhamento da glicemia de camundongos C57BL/6 diabéticos tratados com C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante intraesplênico de 1×10^6 MSCs isoladas de indivíduos saudáveis (C-MSCs) ou de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs). O grupo controle recebeu apenas injeção de PBS (Controles-PBS) (A) Acompanhamento da glicemia ao longo do tempo, na ausência de jejum, pela manhã. (B) Área sob a curva (AUC) da glicemia. (C) A glicemia foi determinada após 10 horas de jejum, 30 dias após administração das MSCs ou PBS. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados PBS, $n=6$); C-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com MSCs de indivíduos saudáveis, que responderam à terapia); DM1-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com MSCs de pacientes com DM-1, que responderam à terapia).

* $P < 0,05$ Tratados C-MSCs/DM1-MSCs x Controles-PBS.

Figura 43. Glicemia dos camundongos C57BL/6 diabéticos antes e 35 dias após infusão de C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante intraesplênico de 1×10^6 MSCs derivadas de indivíduos saudáveis (C-MSCs) ou de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs). A glicemia foi avaliada antes da infusão das MSCs (Pré) e 35 dias após o tratamento (Pós), na ausência de jejum, pela manhã. As barras representam as médias da glicemia de um determinado grupo experimental, com o respectivo desvio padrão. Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com MSCs que responderam à terapia, $n=6$); Não Respondedores (Camundongos diabéticos tratados com MSCs que não responderam à terapia, $n=3$).

* $P < 0,05$ (Pré-tratamento x Pós-tratamento).

Figura 44. Teste de tolerância à glicose dos camundongos C57BL/6 diabéticos 30 dias após transplante das C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica. Após jejum de 10 horas, foi administrado na cavidade peritoneal dos animais 1,5 mg/g de glicose, diluída em PBS, e a glicemia foi monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60 e 180 minutos após. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante intraesplênico de 1×10^6 MSCs isoladas de indivíduos saudáveis (C-MSCs) ou de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs). O teste foi realizado 30 dias após a administração de PBS ou das MSCs. (A) Monitoramento da glicemia durante o teste de tolerância à glicose, (B) Área sob a curva (AUC) do teste de tolerância à glicose. (C) Concentração de insulina no soro 35 dias após tratamento com MSCs/PBS. As variáveis estudadas estão representadas pelas médias e respectivos desvios padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; $n=6$), Tratados C-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com C-MSCs com glicemia <250 mg/dL, $n=9$); Tratados DM1-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com DM1-MSCs com glicemia <250 mg/dL, $n=9$).

* $P < 0,05$ Tratados C-MSCs/ DM1-MSCs x Controles-PBS.

Figura 45. Avaliação da população de células T reguladoras Foxp3⁺ presentes no baço e linfonodos pancreáticos 35 dias após transplante das C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante intraesplênico de 1×10^6 MSCs isoladas de indivíduos saudáveis (C-MSCs) ou de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs). Trinta e cinco dias após administração das células ou PBS, o baço e os linfonodos pancreáticos (LNP) foram colhidos e as células isoladas para imunofenotipagem e análise por FACS. A porcentagem de células positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi avaliada na janela de células T CD4⁺CD25⁺. As barras verticais representam a média dos valores percentuais, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=6), Tratados C-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com C-MSCs, que responderam à terapia, n=6); Tratados DM1-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com DM1-MSCs, que responderam à terapia, n=6).

Figura 46. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 presentes no soro dos camundongos 35 dias após administração intraesplênica das C-MSCs ou DM1-MSCs. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante intraesplênico de 1×10^6 MSCs isoladas de indivíduos saudáveis (C-MSCs) ou de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs). Trinta e cinco dias após administração das MSCs ou PBS, as citocinas foram quantificadas no soro utilizando ensaio de CBA. A concentração está representada por picograma (pg) de citocina por mililitro (mL) de soro. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=6), Tratados C-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com C-MSCs que responderam à terapia, n=6); Tratados DM1-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com DM1-MSCs que responderam à terapia, n=6).

Figura 47. Quantificação das citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4, IL-10 e TGF- β presentes no homogeneizado pancreático dos camundongos 35 dias após administração intraesplênica das C-MSCs ou DM1-MSCs. Os camundongos C57BL/6 diabéticos receberam transplante intraesplênico de 1×10^6 MSCs isoladas de indivíduos saudáveis (C-MSCs) ou de pacientes com DM-1 (DM1-MSCs). Trinta e cinco dias após administração das MSCs ou PBS, porções do pâncreas foram coletadas, homogeneizadas na presença de inibidor de proteases e as citocinas quantificadas no homogeneizado pancreático pelo ensaio de CBA. O TGF- β foi dosado por ELISA. A concentração está representada por picograma (pg) de citocina por grama de tecido pancreático. As barras verticais representam a média dos valores, com o respectivo desvio padrão. Controles-PBS (Camundongos diabéticos tratados com PBS; n=6), Tratados C-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com C-MSCs que responderam à terapia, n=6); Tratados DM1-MSCs (Camundongos diabéticos tratados com DM1-MSCs que responderam à terapia, n=6).

Figura 48. Análises histológicas do pâncreas dos camundongos C57BL/6 diabéticos 35 dias após transplante de C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina e cortado a 7 µm. Os cortes foram montados em lâminas de vidro e corado com hematoxilina e eosina. As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico. Aumento 100X. Painel superior: Grupo controle (PBS); Painel central: Camundongos diabéticos tratados com C-MSCs que responderam à terapia; Painel inferior: Camundongos diabéticos tratados com DM-1-MSCs que responderam à terapia.

Figura 49. Avaliação da massa de células beta pancreáticas produtoras de insulina 35 dias após transplante de C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica. O pâncreas foi coletado, incluído em parafina e cortado a 7 μm. Os cortes foram montados em lâminas e a reação de imunoistoquímica (estreptavidina/peroxidase) foi realizada para detecção de insulina. As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico. Aumento 100X. Painel superior: Grupo controle (PBS); Painel central: Camundongos diabéticos tratados com C-MSCs que responderam à terapia; Painel inferior: Camundongos diabéticos tratados com DM-1-MSCs que responderam à terapia.

Controles-PBS

Tratados C-MSCs

Tratados DM1-MSCs

Figura 50. Expressão de Ki-67 no pâncreas dos camundongos C57BL/6 diabéticos 35 dias após transplante de C-MSCs ou DM1-MSCs pela via intraesplênica. O pâncreas foi coletado, congelado em Tissue-Tek e cortado a 7 µm. Os cortes foram montados em lâminas e a reação de imunoistoquímica (estreptavidina/peroxidase) foi realizada para detecção de Ki-67 (nuclear). As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico. Aumento 100X. Painel superior: Grupo controle (PBS); Painel central: Camundongos diabéticos tratados com C-MSCs que responderam à terapia; Painel inferior: Camundongos diabéticos tratados com DM-1-MSCs que responderam à terapia.

4.3 Resumo dos resultados obtidos no presente trabalho

- 1) Altas concentrações de glicose *in vitro* não induziram alterações na morfologia, perfil imunofenotípico, taxas de proliferação e apoptose das MSCs isoladas de medula óssea humana.
- 2) As MSCs administradas pela via intraesplênica em camundongos diabéticos promoveram melhores resultados em comparação às vias intravenosa, intraperitoneal e intrapancreática.
- 3) Após infusão de ADMSCs nos camundongos diabéticos, observamos redução (parcial/total) dos níveis de glicose sanguínea; aumento/preservação da massa de células pancreáticas produtoras de insulina e aumento dos níveis de insulina circulante. No entanto, a população de células T reguladoras no baço e linfonodos pancreáticos, bem como o perfil de citocinas no soro e homogeneizado pancreático não foram alterados. As ADMSCs administradas pela via intrapancreática ficaram retidas no pâncreas e quando transplantadas pela via intraesplênica se concentraram no baço e fígado.
- 4) Comparando as DM1-MSCs com as C-MSCs, não observamos diferenças nas características morfológicas, perfil imunofenotípico, potencial de diferenciação em adipócitos (*in vitro*) e potencial de imunossupressão *in vitro*. No entanto, as DM1-MSCs apresentaram maior capacidade de migração *in vitro* do que as C-MSCs. Quando administradas em camundongos diabéticos pela via intraesplênica, ambas MSCs promoveram redução significativa da glicemia, aumento da massa células produtoras de insulina, aumento da concentração de insulina circulante e redução dos níveis de IL-2 e IFN- no homogeneizado pancreático dos camundongos transplantados. Dessa forma, a eficácia da infusão MSCs isoladas de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 no tratamento do diabetes experimental foi semelhante ao tratamento feito com MSCs isoladas de indivíduos saudáveis. Resumidamente, nenhuma diferença fenotípica ou funcional foi observada comparando as DM1-MSCs com as MSCs de indivíduos saudáveis.

5. DISCUSSÃO

A utilização de terapia celular tem incorporado o arsenal terapêutico para doenças crônicas de diversas etiologias, particularmente, das inflamatórias crônicas e daquelas de natureza autoimune. O transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas tem se mostrado terapêutica curativa em diversas doenças hematológicas malignas. O grande problema dos transplantes alogênicos é a obtenção de células-tronco hematopoéticas histocompatíveis, quando essas células não são disponibilizadas entre os familiares, ou ainda, nos casos de ausência de doadores histocompatíveis não relacionados em bancos de medula. O transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas eliminou o problema da busca de células histocompatíveis e trouxe grande esperança no tratamento de diversas doenças, particularmente para as doenças autoimunes, sendo o grupo liderado pelo saudoso professor Júlio Voltarelli pioneiro no transplante autólogo para pacientes com DM-1, esclerose sistêmica, esclerose múltipla, dentre outras. Recentemente, grande ênfase tem sido atribuída ao uso terapêutico das MSCs face ao seu potencial imunomodulador e regenerador, facilidade de obtenção em grande quantidade, baixa imunogenicidade, e ainda, capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares sem barreiras entre as diversas espécies de mamíferos, tendo aplicação clínica mais ampla do que as células-tronco hematopoéticas. Nesse contexto, o professor Júlio desenhou este estudo para avaliar o potencial terapêutico de MSCs humanas no diabetes experimental, induzido por agente químico, para entender e aplicar essa terapia em humanos. Além disso, o entendimento da biologia das MSCs de pacientes com doenças autoimunes também era almejado por ele.

Diversos desafios foram surgindo ao longo da pesquisa, pois no DM-1 e também no diabetes experimental ocorrem, primordialmente, dois processos patogênicos que precisam ser estudados, isto é, a destruição das células pancreáticas por mecanismos imunes, químicos ou ambos, e ainda, os distúrbios metabólicos ocasionados pela diminuição de produção de insulina, causando hiperglicemia e outros distúrbios associados com a glicação indiscriminada de proteínas.

O primeiro desafio foi avaliar a influência da hiperglicemia *in vitro* nas MSCs humanas. Concentrações elevadas de glicose podem promover alterações na expressão gênica, diminuição da taxa de proliferação e do potencial de diferenciação, e ainda, induzir senescência e apoptose em diferentes tipos celulares (Li *et al.*, 2007). Além

disso, a hiperglicemia pode alterar a produção de insulina e induzir apoptose em células pancreáticas (Marshak *et al.*, 1999; Federici *et al.*, 2001), pode induzir perfil pró-inflamatório em células monocíticas (Shanmugam *et al.*, 2003) e aumentar a apoptose das células Müller da retina (Kusner, Sarthy e Mohr, 2004). Diferentes estudos relatam que o número e a mobilização de células progenitoras endoteliais estão diminuídos em pacientes diabéticos, representando possível mecanismo pelo qual as doenças vasculares se desenvolvem e progridem para diabetes (Loomans *et al.*, 2004; Kuki *et al.*, 2006). A hiperglicemia induz produção exacerbada de radicais livres superóxido por meio de alterações na mitocôndria, resultando em aumento da apoptose e adesão célula-célula e, consequente diminuição do potencial angiogênico das células progenitoras endoteliais (Brownlee, 2001; Callaghan, Ceradini e Gurtner, 2005). Tendo em vista os efeitos deletérios causados pela hiperglicemia nas células progenitoras endoteliais, é possível pensar que as MSCs também possam sofrer alterações funcionais induzidas por altas concentrações de glicose, uma vez que ambos os tipos celulares são encontrados no microambiente medular (Weil *et al.*, 2009).

Considerando que, neste estudo, as MSCs seriam injetadas em camundongos hiperglicêmicos na ausência de insulina exógena, avaliamos, primeiramente, os efeitos da hiperglicemia sobre as MSCs humanas *in vitro*, para nos certificarmos de que essas células não sofreriam alterações funcionais na presença de altos níveis de glicose *in vivo*. Para isso, os meios de cultura foram suplementados com diferentes concentrações de glicose (100 mg/dL, 250 mg/dL, 350 mg/dL e 500 mg/dL), sendo que aquelas superiores a 250 mg/dL simulariam a glicemia que as MSCs encontrariam quando administradas nos camundongos diabéticos. Após sete dias de cultivo com meios de cultura contendo diferentes concentrações de glicose, não observamos diferenças na morfologia, tamanho celular, perfil imunofenotípico, taxa de proliferação e apoptose das MSCs, independentemente da concentração de glicose a qual as células foram expostas. No estudo de Li e colaboradores, os autores mostraram que MSCs humanas cultivadas em meio hiperglicêmico (450 mg/dL) não apresentaram alterações nas taxas de proliferação e de apoptose, tanto no cultivo de curta duração (4 dias) como no de longa duração (4 semanas). Assim, os autores sugerem que as MSCs são resistentes aos efeitos tóxicos induzidos por elevadas concentrações de glicose (Li *et al.*, 2007). De forma semelhante, Weil e colaboradores não observaram diferenças significantes na taxa de proliferação de MSCs humanas cultivadas por 48 horas em meio contendo 540 mg/dL de glicose. Além disso, os autores observaram que, mesmo na presença de alta

concentração de glicose, a produção de VEGF, HGF e FGF2 pelas MSCs não foi alterada (Weil *et al.*, 2009).

Por outro lado, Stolzing e colaboradores observaram que MSCs de ratos Wistar cultivadas em meio de cultura hiperglicêmico (450 mg/dL) apresentaram viabilidade celular reduzida, aumento da taxa de apoptose e redução da formação de colônias fibroblastoides (Stolzing, Coleman e Scutt, 2006). Em outro estudo, MSCs em contato com elevadas concentrações de glicose foram isoladas de ratos diabéticos e apresentaram capacidade proliferativa diminuída, secreção reduzida de VEGF e IGF-1, aumento de apoptose e diminuição da diferenciação *in vitro* em miócitos (Jin *et al.*, 2010). Cramer e colaboradores relataram que MSCs isoladas de tecido adiposo de pacientes com diabetes tipo 2 (DM-2) ou de indivíduos saudáveis apresentaram menor taxa de proliferação, menor capacidade de formar colônias fibroblastoides, aumento de senescência e apoptose quando cultivadas em meios hiperglicêmicos (500 mg/dL e 1000 mg/dL) (Cramer *et al.*, 2010). Cabe salientar que os estudos que relataram alterações induzidas pela hiperglicemia foram feitos em MSCs de ratos ou pacientes com DM-2, enquanto que os trabalhos que corroboraram nossos resultados utilizaram MSCs humanas de indivíduos saudáveis. Dessa forma, a hiperglicemia pode causar alterações funcionais dependendo da espécie animal da qual as MSCs foram isoladas (rato $\times$ humano), ou da doença subjacente do indivíduo do qual as células foram obtidas (indivíduos/animais doentes $\times$ saudáveis). Considerando os nossos e os resultados da literatura, a exposição de MSCs humanas por períodos curtos (horas) ou médios (semanas) não altera significativamente as propriedades funcionais dessas células.

O segundo desafio encontrado durante o desenvolvimento deste trabalho foi estabelecer qual seria a via mais adequada de administração das MSCs nos camundongos diabéticos. As MSCs têm sido consideradas como nova alternativa terapêutica para diferentes doenças, sendo testadas em diversos modelos experimentais e protocolos clínicos (Baraniak e Mcdevitt, 2010). Um desafio associado a essa abordagem é a definição da via pela qual as MSCs serão administradas, uma vez que a via deve permitir que as MSCs alcancem o órgão de interesse ou que sejam mantidas viáveis por um período de tempo suficiente no receptor para exercerem sua função (Fischer *et al.*, 2009).

A administração de MSCs pela via intravenosa foi utilizada inúmeras vezes em modelos experimentais de infarto do miocárdio, derrame cerebral, fibrose pulmonar, nefropatias, entre outros (Chamberlain *et al.*, 2007), pois se trata de prática simples e

pouco invasiva. No presente estudo, não obtivemos sucesso no transplante intravenoso (plexo orbital) de MSCs de diferentes fontes em camundongos diabéticos, uma vez que a maioria dos camundongos morreu imediatamente após a administração das células, representando um procedimento inviável. O estudo de Schrepfer e colaboradores avaliou o perfil de distribuição de MSCs murinas injetadas intravenosamente em camundongos. Os autores observaram que após injeção de 5×10^5 MSCs os animais apresentaram episódios de taquipneia, apneia e alterações hemodinâmicas, características de embolia pulmonar. Além disso, foi observado que as MSCs possuíam tamanho maior (15-19 μm) em relação ao diâmetro dos capilares pulmonares (10-15 μm), justificando o aprisionamento das células nos pulmões (Schrepfer *et al.*, 2007). De forma semelhante, Ficher e colaboradores observaram que MSCs humanas injetadas intravenosamente em ratos ficaram retidas nos pulmões em consequência do seu tamanho, bem como da expressão de proteínas (VCAM-1, por exemplo) pelas MSCs envolvidas na adesão ao endotélio vascular pulmonar (Fischer *et al.*, 2009; Nystedt *et al.*, 2013). No estudo de Furlani e colaboradores, os autores observaram que a administração intra-arterial (aorta abdominal) de 1×10^6 MSCs promoveu redução de 60% do fluxo sanguíneo arterial, interrupção da circulação microvascular pulmonar e morte de 40% dos camundongos transplantados (Furlani *et al.*, 2009). Frente aos efeitos adversos da administração intravenosa das MSCs observados em nossos experimentos e nos estudos da literatura, testamos outras vias de administração a fim de evitar o aprisionamento das MSCs nos pulmões dos camundongos.

O peritônio é altamente vascularizado e permite que as células injetadas em seu interior tenham acesso à circulação linfática e sanguínea. Nesse sentido, MSCs injetadas pela via intraperitoneal migram para diversos órgãos como pulmão, baço, pâncreas, rins, cérebro, coração, timo, fígado, entre outros (Meyerrose *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2010). Além disso, a injeção intraperitoneal é procedimento simples, rápido, pouco invasivo, permite a administração de número elevado de células e não causa embolia em nenhum órgão (Xu e Liu, 2008). Apesar de utilizarmos MSCs de diferentes fontes (medula óssea humana, cordão umbilical humano e tecido adiposo murino), em diferentes quantidades ($0,5 \times 10^6$ a $2,0 \times 10^6$ / 1 a 5 doses) e em diferentes períodos após a indução do diabetes, todos os camundongos permaneceram diabéticos (hiperglicêmicos) após a administração intraperitoneal das MSCs. Diferente dos nossos resultados, Bassi e colaboradores trataram camundongos NOD diabéticos com três infusões intraperitoneais de 1×10^6 ADMSCs e observaram reversão da hiperglicemia em mais de dois terços dos

animais, aumento da massa de células pancreáticas e modulação da resposta autoimune (Bassi *et al.*, 2012). No entanto, não existem trabalhos na literatura que administraram ADMSCs pela via intraperitoneal em camundongos tornados diabéticos por STZ, sugerindo que essa via de administração não seja a mais adequada nesse modelo experimental.

Em seguida, a via intrapancreática de administração foi testada na tentativa de concentrar as MSCs no órgão afetado pelo diabetes e assim, possibilitar expansão das células pancreáticas e reparo das ilhotas (Alvarez *et al.*, 2006). Utilizamos MSCs derivadas de tecido adiposo (ADMSCs) para testar essa via de administração, uma vez que elas possuem a vantagem de serem abundantes e de fácil acesso, têm grande capacidade proliferativa e expressam integrina $\alpha 4$ que promove a migração para sítios inflamados (Li *et al.*, 2012). Além disso, já foi relatado que as ADMSCs possuem propriedades imunomoduladora e regenerativa quando injetadas em modelos experimentais de encefalomielite experimental aguda, artrite induzida por colágeno, colite química e diabetes espontâneo (Constantin *et al.*, 2009; González *et al.*, 2009b; a; Bassi *et al.*, 2012).

Observamos que a administração intrapancreática de ADMSCs foi capaz de reverter a hiperglicemia em 40-50% dos animais diabéticos. Os camundongos que responderam ao tratamento (“Respondedores”) apresentaram redução dos níveis de glicose no sangue e aumento da massa de células produtoras de insulina. No entanto, os níveis de insulina circulante foram semelhantes nos diferentes grupos experimentais. Não observamos modulação da população de células Tregs e os níveis de IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 permaneceram inalterados no soro e homogeneizado pancreático dos camundongos após transplante de ADMSCs. Chang e colaboradores observaram que MSCs administradas em diferentes locais do pâncreas de porcos diabéticos permaneceram retidas no órgão e promoveram aumento da produção de insulina (Chang *et al.*, 2008). Katuchova e colaboradores administraram MSCs isoladas de medula óssea de ratos em diferentes regiões do pâncreas (cabeça, cauda e ao longo do pâncreas) de ratos tornados diabéticos por STZ e observaram redução significativa da glicemia após transplante das MSCs. No entanto, os autores não observaram diferenças entre os grupos experimentais tratados, sugerindo que o local onde as MSCs são injetadas no pâncreas não influencia a eficácia da terapia (Katuchova *et al.*, 2012). A injeção intrapancreática de células progenitoras isoladas do sangue do cordão umbilical em camundongos NOD/scid diabéticos promoveu reversão da hiperglicemia, aumento

da proliferação de células e consequente aumento da produção de insulina. Por outro lado, os mesmos resultados não foram observados quando as células foram injetadas por via intravenosa (Bell *et al.*, 2012). Alguns estudos relataram a utilização da via intrapancreática para administração de diferentes tipos de células em pacientes com DM-2. Dois grupos de pesquisa independentes realizaram transplante intrapancreático de células CD34⁺ (autólogas) isoladas da medula óssea combinado com tratamento com oxigênio hiperbárico em pacientes diabéticos, e observaram melhora no controle metabólico e redução dos níveis de insulina diária requerida após o tratamento (Estrada *et al.*, 2008; Wang, L. *et al.*, 2011). Nesse mesmo sentido, Tong e colaboradores transplantaram células do sangue do cordão umbilical via artéria pancreática dorsal também em pacientes diabéticos tipo 2 e observaram aumento dos níveis de peptídeo C e diminuição da dose diária de insulina requerida três meses após a terapia (Tong *et al.*, 2013). De forma geral, a via intrapancreática para administração de diferentes células progenitoras representa uma via eficiente tendo em vista a melhora do diabetes em alguns modelos experimentais e pacientes com DM-2. No entanto, em nosso modelo experimental observamos uma eficiência relativamente baixa.

Na tentativa de encontrar uma via de administração que pudesse promover a reversão da hiperglicemia em número maior de camundongos, realizamos a administração das ADMSCs diretamente no interior do baço (via intraesplênica). A circulação sanguínea do baço está diretamente relacionada com a circulação do pâncreas, uma vez que a veia esplênica projeta pequenos ramos que formam a veia pancreática dorsal e a veia pancreática magna. Dessa forma, ao injetar as MSCs no interior do baço elas poderiam ser levadas para o pâncreas por meio da veia esplênica. Além disso, considerando as propriedades imunomoduladoras das MSCs, elas poderiam promover modulação da resposta imune no ambiente esplênico, diminuindo o processo inflamatório das ilhotas pancreáticas e consequente aumento da produção de insulina pelas células pancreáticas. Observamos que a injeção de 1×10^6 ADMSCs pela via intraesplênica promoveu reversão da hiperglicemia em 70-100% dos camundongos tratados, tornando-se a via de administração mais eficiente em relação às outras vias testadas anteriormente. Os animais apresentaram queda significativa dos níveis de glicose no sangue seis dias após a administração das ADMSCs, e se mantiveram normoglicêmicos por 70 dias após tratamento. A queda brusca dos níveis de glicose sanguínea poucos dias após a infusão das MSCs foi relatada por outros trabalhos da literatura. Ezquer e colaboradores observaram níveis normoglicêmicos em

camundongos diabéticos (STZ) sete dias após a administração intravenosa de $0,5 \times 10^6$ MSCs (Ezquer *et al.*, 2008). Da mesma forma, a administração de duas doses de 2×10^6 MSCs humanas no ventrículo esquerdo também promoveu queda na glicemia dos camundongos diabéticos NOD/Scid (STZ) sete dias após a segunda infusão (Lee *et al.*, 2006). Camundongos NOD diabéticos tratados com MSCs pelas vias intraperitoneal (Bassi *et al.*, 2012) ou intravevosa (Jurewicz *et al.*, 2010; Bassi *et al.*, 2012) apresentaram queda significativa na glicemia sete dias após a terapia. Assim, as MSCs parecem exercer função terapêutica rapidamente após sua administração nos camundongos diabéticos.

De forma geral, os trabalhos que testaram a eficácia da infusão de MSCs no diabetes experimental utilizaram MSCs isoladas de medula óssea de ratos ou camundongos (Ezquer *et al.*, 2008; Urbán *et al.*, 2008; Boumaza *et al.*, 2009; Fiorina *et al.*, 2009; Madec *et al.*, 2009; Jurewicz *et al.*, 2010; Ezquer *et al.*, 2012). Assim como em nosso trabalho, bons resultados do tratamento do diabetes experimental com MSCs isoladas de tecido adiposo (ADMSCs) foram relatados por outros grupos. No estudo de Yang e colaboradores, a injeção intravenosa de 5×10^6 ADMSCs humanas promoveu diminuição da glicemia e da retinopatia em ratos diabéticos (Yang *et al.*, 2010). A administração intraperitoneal de ADMSCs alogênicas promoveu reversão da hiperglicemia em 78% dos camundongos NOD diabéticos tratados (Bassi *et al.*, 2012). Camundongos Balb/c diabéticos tratados com 1×10^6 ADMSCs xenogênicas pela via intravenosa apresentaram glicemia de jejum significativamente menor em relação aos camundongos diabéticos não tratados (Li *et al.*, 2012). Assim, as ADMSCs representam uma possível fonte de células com potencial terapêutico na terapia do diabetes.

Testamos também o potencial terapêutico de MSCs humanas (xenogênicas) em camundongos diabéticos, uma vez que o objetivo central deste estudo era avaliar a função das MSCs de pacientes com DM-1 *in vivo*. As MSCs humanas (indivíduos saudáveis) administradas pela via intraesplênica reduziu significativamente os níveis de glicose sanguínea de 75% dos camundongos tratados, sugerindo que as MSCs foram capazes de exercer efeito terapêutico mesmo na ausência de imunossupressão concomitante. As MSCs não expressam moléculas de HLA de classe II, CD80, CD86, CD40, apresentando, portanto, perfil hipoinmunogênico. Diversos trabalhos suportam o uso das MSCs em animais imunocompetentes, sem a necessidade de imunossupressão. A infusão de MSCs humanas derivadas da polpa dentária induziu melhora clínica em cachorros com distrofia muscular de Duchenne. Nesse trabalho, foram detectadas fibras

musculares quiméricas e não foi observado sinal de rejeição das MSCs humanas infundidas (Kerkis *et al.*, 2008). No modelo de EAE, Bai e colaboradores mostraram que MSCs humanas derivadas de medula óssea, injetadas na veia caudal de camundongos que desenvolveram a mielite, promoveram diminuição do escore clínico da doença, aumento de oligodendrócitos e modulação da resposta imune (diminuição do padrão de respostas Th1 e Th17 e aumento do padrão Th2) (Bai *et al.*, 2009). Gordon e colaboradores injetaram MSCs humanas pela via intraperitoneal em camundongos com EAE e também observaram melhora clínica significativa dos animais tratados (Gordon *et al.*, 2008). No contexto do diabetes, alguns trabalhos utilizaram MSCs humanas indiferenciadas em camundongos diabéticos imunocompetentes. A administração de MSCs isoladas de tecido adiposo humano reduziu os níveis de glicose sanguínea e melhorou a retinopatia de ratos diabéticos (Yang *et al.*, 2010). Kadam e colaboradores mostraram que o transplante de MSCs isoladas da placenta humana sob a cápsula renal de camundongos Balb/c diabéticos (STZ) promoveu restabelecimento da normoglicemia e aumento dos níveis de insulina (Kadam *et al.*, 2010). De forma semelhante, MSCs de cordão umbilical administradas em ratos diabéticos promoveram reparo das ilhotas pancreáticas, aumento dos níveis de insulina e diminuição da hiperglicemia (Wang *et al.*, 2014). Além disso, existem relatos do uso de MSCs humanas geneticamente manipuladas (Boroujeni e Aleyasin, 2013) ou diferenciadas *in vitro* em células produtoras de insulina (Chao *et al.*, 2008; Wang, H. S. *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012) e transplantadas em animais diabéticos na ausência de imunossupressão cocomitante.

A via intraesplênica para administração de MSCs em modelos experimentais e protocolos clínicos é pouco explorada, sendo utilizada no contexto das doenças hepáticas. O transplante intraesplênico de MSCs autólogas de pacientes com cirrose hepática se mostrou eficaz, promovendo redução dos níveis de bilirrubina total e das enzimas aspartato transaminase e alanina transaminase, e ainda, diminuição do tempo de protrombina e aumento da albumina e fosfatidilcolina (Amin *et al.*, 2013). A administração de células/substâncias pela via intraesplênica é traumática e muito invasiva, podendo ocasionar sangramento excessivo e embolia hepática. O baço é um órgão altamente vascularizado, e a introdução de agulha para injeção das células provoca ruptura de muitos vasos gerando sangramento intenso. Em nossos experimentos, utilizamos selante de fibrina para auxiliar o processo de coagulação, e também, compressão da área com haste flexível de algodão por período de tempo prolongado a

fim de conter a hemorragia. A veia esplênica drena o sangue diretamente para a veia porta, e as células injetadas diretamente no baço são transportadas para o fígado dessa maneira. Assim, células muito grandes (diâmetro) podem ficar retidas na veia porta (embolia), bloqueando a microcirculação hepática e possivelmente ocasionar morte do receptor (Wilhelm *et al.*, 2004; Xu e Liu, 2008). Neste estudo, utilizamos algumas estratégias para diminuir a probabilidade das MSCs causarem embolia hepática, como: lavagem das células com PBS contendo Pulmozyme (DNase), utilização de filtro (peneira) de 40 µm antes da infusão das MSCs e armazenamento das MSCs em gelo durante todo processamento da célula até o momento da infusão. Em nossos grupos experimentais, os óbitos decorrentes de hemorragia ou embolia hepática foram raros.

Por fim, superados os desafios anteriores, avaliamos se as MSCs isoladas de pacientes com DM-1 apresentavam características fenotípicas e funcionais semelhantes às MSCs de indivíduos saudáveis. Considerando uma possível aplicação clínica das MSCs em pacientes com DM-1, a escolha da fonte das MSCs, alogênica ou autóloga, é muito importante no contexto do transplante. Células de origem autóloga possuem a vantagem de não serem rejeitadas, no entanto, algumas condições metabólicas ou doenças subjacentes podem influenciar ou alterar diversas funções celulares. Por outro lado, células alogênicas podem ser utilizadas, porém a administração de agentes imunossupressores se faz necessária para evitar rejeição ou desenvolvimento de GVHD. Diversos estudos relataram que MSCs isoladas de pacientes com doenças autoimunes possuem alterações fenotípicas ou funcionais. MSCs de pacientes com artrite reumatoide exibiram potencial clonogênico e proliferação reduzidos, associados à perda prematura do comprimento do telômero (Kastrinaki *et al.*, 2008). No estudo de Papadaki e colaboradores, MSCs de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico apresentaram redução da capacidade de suportar o crescimento de progenitores hematopoéticos *in vitro* (Papadaki *et al.*, 2001). Falha no suporte a hematopoese foi também observada em MSCs de pacientes com artrite reumatoide, além da produção aumentada de TNF- α por essas células (Papadaki *et al.*, 2002). MSCs de pacientes com esclerose múltipla produziram grande quantidade de IP10 (recrutamento de linfócitos) em comparação às MSCs de indivíduos saudáveis (Mazzanti *et al.*, 2008). Além disso, MSCs de pacientes com púrpura trombocitopênica autoimune ou esclerose múltipla apresentaram capacidade reduzida de suprimir linfócitos *in vitro* (Pérez-Simón *et al.*, 2009; De Oliveira *et al.*, 2013). Cipriani e colaboradores observaram estado de

senescência precoce em MSCs de pacientes com esclerose sistêmica e diminuição do potencial angiogênico dessas células (Cipriani *et al.*, 2007).

No contexto do diabetes, alguns estudos investigaram as propriedades de MSCs de pacientes com DM-2. No estudo de Sun e colaboradores, os autores observaram que MSCs de medula óssea de pacientes diabéticos (*pool* de MSCs de pacientes com DM-1 e DM-2) apresentaram morfologia e expressão de marcadores de superfície típicos e que as MSCs se diferenciaram em células produtoras de insulina *in vitro* (Sun *et al.*, 2007). Debin e colaboradores observaram que as MSCs de medula óssea de pacientes com DM-2 exibiram morfologia e perfil imunofenotípico típicos, e que essas células quando injetadas em úlceras de pacientes diabéticos aceleraram o processo cicatrização, evitando assim a amputação do membro afetado (Debin *et al.*, 2008). No estudo de Phadnis e colaboradores, cerca de 6% das amostras de MSCs de medula óssea de pacientes com DM-2 apresentaram-se positivas para marcação de peptídeo C. As MSCs cultivadas com extrato pancreático e altas concentrações de glicose formaram rapidamente agregados celulares com morfologia semelhante à das ilhotas pancreáticas (Phadnis *et al.*, 2009). MSCs isoladas de tecido adiposo de pacientes com DM-2 apresentaram capacidade fibrinolítica reduzida em comparação às MSCs controle (Acosta *et al.*, 2013). Liu e colaboradores isolaram MSCs de medula óssea de pacientes diabéticos com aterosclerose coronariana e observaram que essas células apresentaram capacidade proliferativa reduzida e aumento de transcritos de genes pró-apoptóticos em relação às MSCs de indivíduos não diabéticos. Além disso, ao injetar as células dos pacientes diabéticos em ratos com infarto do miocárdio, observou-se que as MSCs controle promoveram melhor resposta terapêutica do que as MSCs dos pacientes diabéticos (Liu *et al.*, 2013). Células tronco hematopoéticas provenientes de pacientes ou modelos animais de diabetes (tipo 1 e 2) exibiram capacidade de mobilização (medula óssea – sangue periférico) após estimulação com G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) reduzida quando comparada com células de indivíduos/animais saudáveis. Esse problema estava relacionado com o microambiente medular, uma vez que o nicho estromal apresentou-se comprometido (MSCs se mostraram incapazes de modular/diminuir a produção de CXCL12). Os autores do estudo sugerem que o diabetes pode alterar a fisiologia e microanatomia da medula óssea e, consequentemente, a biologia das células ali presente (Ferraro *et al.*, 2011).

Já para o DM-1, não encontramos trabalhos na literatura que caracterizaram de forma detalhada as MSCs de pacientes com DM-1 recém-diagnosticado. No trabalho de

Sebok D e colaboradores, os autores investigaram MSCs de três pacientes com DM-1 quanto ao potencial de adotarem um fenótipo endócrino pancreático. Após cultivo das MSCs em meio indutor de diferenciação com diversos fatores de crescimento, as células exibiram formação de agregados *islet-like* e expressão de genes típicos de células pancreáticas (D *et al.*, 2007). Assim, considerando a ausência de informações acerca das características de MSCs, e que ainda não se sabe essas MSCs apresentam defeitos funcionais, caracterizamos fenotipicamente e funcionalmente essas células e as comparamos com as MSCs de indivíduos saudáveis.

As MSCs de pacientes com DM-1 apresentaram morfologia e tamanho celular semelhante à das MSCs de indivíduos saudáveis. Do mesmo modo, MSCs isoladas de medula óssea de pacientes com esclerose múltipla (Mazzanti *et al.*, 2008; Mallam *et al.*, 2010), artrite reumatoide (Dudics *et al.*, 2009), esclerose sistêmica (Cipriani *et al.*, 2007; Larghero *et al.*, 2008; Guiducci *et al.*, 2011) e doença de Crohn (Duijvestein *et al.*, 2010) não apresentaram alterações morfológicas. Por outro lado, MSCs de pacientes com púrpura trombocitopênica autoimune exibiram morfologia atípica, sendo que a minoria das células apresentou morfologia fibroblastoide (Pérez-Simón *et al.*, 2009). As MSCs de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico se mostraram maiores e mais achatadas em comparação às MSCs controles (Nie *et al.*, 2010).

Não observamos diferenças significantes na porcentagem de DM1-MSCs positivas para os marcadores CD45, CD14, CD29, CD51/61, CD44, CD90, CD105, CD54, CD73, CD106, CD34, HLA-CLASSE I (HLA-A/B/C), HLA- CLASSE II (HLA-DRB1), CD166, CD49e, CD13, STRO-1 e KDR, em comparação com as MSCs de indivíduos saudáveis. De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), as MSCs devem expressar alta frequência (> 95%) de células positivas para CD105 (endoglina), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Thy-1) e ainda, expressar baixos níveis de CD45 (antígeno leucocitário), CD34 (marcador progenitor hematopoético), CD14 (monócitos), CD11b (macrófagos), CD79 /CD19 (células B) e HLA classe- II (< 2%) (Dominici *et al.*, 2006). No presente estudo, tanto as DM1-MSCs quanto as C-MSCs apresentaram porcentagens de células positivas para os marcadores citados acima de acordo com o que foi estabelecido pela ISCT. Além disso, de acordo com a ISCT, as MSCs devem possuir a capacidade de se diferenciarem *in vitro* em células da linhagem mesodérmica, isto é, adipócitos, osteócitos e condrócitos após cultivo com meios de cultura específicos indutores de diferenciação (Dominici *et al.*, 2006). As DM1-MSCs foram capazes de se diferenciarem em adipócitos de maneira

semelhante às C-MSCs. MSCs isoladas de pacientes com esclerose múltipla (Mazzanti *et al.*, 2008; Mallam *et al.*, 2010), esclerose sistêmica (Cipriani *et al.*, 2007; Larghero *et al.*, 2008; Guiducci *et al.*, 2011), lúpus eritematoso sistêmico (Nie *et al.*, 2010) e púrpura trombocitopênica autoimune (Pérez-Simón *et al.*, 2009) também apresentaram perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação em adipócitos semelhantes às MSCs de indivíduos saudáveis.

No ensaio de migração *in vitro*, observamos que as DM1-MSCs migraram mais do que C-MSCs após estímulo com soro fetal bovino (SFB). O SFB é amplamente utilizado no cultivo de diversas células, uma vez que possui fatores necessários para adesão, crescimento e proliferação celular. Diversas moléculas estão presentes no SFB, dentre elas a albumina, imunoglobulinas, vitaminas, hormônios, citocinas, fatores de crescimento (Brunner *et al.*, 2010), e ainda, substâncias quimiotáticas como o MCP-1. O SFB é muito utilizado como fator quimioatraente em ensaios de migração/quimiotração *in vitro*. De forma semelhante aos leucócitos, as MSCs expressam receptores e moléculas de adesão que permitem sua migração para o órgão/tecido alvo. No entanto, os mecanismos exatos pelos quais as MSCs são recrutadas e direcionadas para um determinado local ainda não estão completamente elucidados (Sohni e Verfaillie, 2013). As MSCs expressam diversos receptores de quimiocinas na superfície celular que promovem sua migração através de um gradiente de concentração de quimiocinas, entre eles: CXCR4; CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR5 e CXCR6 (Von Lüttichau *et al.*, 2005; Honczarenko *et al.*, 2006). O fato de as MSCs expressarem diferentes receptores de quimiocinas possibilita sua migração para diferentes tecidos afim de promover reparo tecidual ou diminuição da inflamação. Dessa forma, as MSCs podem migrar para o intestino via CCR9 ou mesmo se dirigir para articulações inflamadas ou para o cérebro via receptor CCR1, nos casos de artrite reumatoide ou esclerose múltipla, respectivamente (Chamberlain *et al.*, 2007). Além dos receptores de quimiocinas presentes nas MSCs, a expressão de moléculas de adesão como VLA-4 (*Very late antigen-4; dímero integrina -4/integrina -1*), VCAM (*Vascular cell adhesion protein 1*), ICAM (*Intercellular adhesion molecule 1*) e a síntese de metaloproteinasas (MMP-1 e MMP-2) também auxiliam a migração das MSCs (Sohni e Verfaillie, 2013). No estudo de Li e colaboradores, MSCs isoladas de medula óssea de camundongos NOD apresentaram capacidade de migração e adesão focal diminuídas em relação as MSCs de camundongos não diabéticos (linhagem ICR). Os autores correlacionaram essas observações com a distribuição anormal de FAK

(*focal adhesion kinase*) e falha na organização dos filamentos de actina no citoesqueleto das MSCs dos camundongos diabéticos (Li *et al.*, 2011). No presente estudo, não observamos diferenças significantes na expressão de integrina $\alpha 1$ (CD29), ALCAM (CD166), ICAM-1 (CD54) e VCAM-1 (CD106) na superfície das DM1-MSCs e C-MSCs. Além disso, não avaliamos a expressão dos receptores de quimiocinas e de outras moléculas de adesão nas MSCs, bem como não estudamos as proteínas envolvidas na reorganização do citoesqueleto e a produção de metaloproteinases. Assim, não foi possível explicar os possíveis mecanismos que fizeram com que as DM1-MSCs migrassem mais do que as C-MSCs em direção ao agente quimioatraente.

Um aspecto interessante da biologia das MSCs que as tornam ferramenta promissora no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias é sua capacidade imunomoduladora e imunossupressora. As MSCs possuem a capacidade de expandir células T reguladoras, modular a maturação e a apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos, inibir a função efetora de linfócitos T, B e células NK (Dazzi, Lopes e Weng, 2012). Existem relatos de que MSCs de pacientes com anemia aplásica (Bacigalupo *et al.*, 2005), esclerose múltipla (De Oliveira *et al.*, 2013) e púrpura trombocitopênica autoimune (Pérez-Simón *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013) possuem capacidade de imunossupressão diminuída em relação àquelas de indivíduos saudáveis, dificultando/impossibilitando seu uso no transplante autólogo. No presente estudo, as MSCs isoladas de pacientes com DM-1 e de indivíduos saudáveis apresentaram capacidade semelhante de inibir a proliferação de linfócitos CD3⁺ alogênicos estimulados com fitohemaglutinina. A inibição da proliferação dos linfócitos foi dose-dependente, sendo que nas concentrações de 1:50 e 1:100 (MSC:linfócitos) as MSCs foram incapazes de exercer sua função imunossupressora. De forma semelhante, outros trabalhos não observaram alterações na capacidade imunossupressora *in vitro* das MSCs isoladas de pacientes com artrite idiopática juvenil (Calkoen *et al.*, 2013), doença de Crohn (Duijvestein *et al.*, 2010), esclerose sistêmica (Larghero *et al.*, 2008) e lúpus eritematoso sistêmico (Carrion *et al.*, 2010; Nie *et al.*, 2010).

Visto que as DM1-MSCs não apresentaram alterações na capacidade imunossupressora *in vitro*, o potencial terapêutico das MSCs de pacientes com DM-1 foi testado no modelo experimental de diabetes induzido por STZ. Após administração intraesplênica de DM1-MSCs ou C-MSCs observamos reversão da hiperglicemia em 67% dos camundongos tratados, bem como melhora do metabolismo da glicose, aumento da massa de células pancreáticas e, conseqüentemente, dos níveis de insulina

circulante. Não observamos diferenças significantes entre os grupos tratados, ou seja, os resultados obtidos com tratamento feito com DM1-MSCs foram semelhantes ao tratamento com C-MSCs, sugerindo que as DM1-MSCs não possuem alterações funcionais que impossibilitariam seu uso na prática clínica. Dong e colaboradores observaram que o transplante de MSCs isoladas de ratos diabéticos promoveu redução da glicemia e evitou perda de massa corpórea dos ratos diabéticos tratados. Os autores sugeriram que o diabetes não altera as propriedades das MSCs, fazendo com que essas células possam ser transplantadas de forma autóloga no DM-1 (Dong *et al.*, 2008). De forma contrária, no trabalho de Fiorina e colaboradores, MSCs isoladas de camundongos NOD diabéticos apresentaram defeitos funcionais, uma vez que foram ineficientes em retardar o desenvolvimento do diabetes em camundongos pré-diabéticos e não foram capazes de reverter a hiperglicemia de camundongos diabéticos. Além disso, as MSCs de camundongos NOD promoveram o aparecimento de neoplasias na cauda, membros, pulmões e fígado após administração intravenosa. Desta forma, os autores alertam para possíveis alterações funcionais das MSCs de indivíduos diabéticos que podem ser prejudiciais para o receptor (Fiorina *et al.*, 2009). As MSCs de pacientes utilizadas em nosso estudo foram isoladas de sujeitos cujo DM-1 havia sido recém-diagnosticado (sem cetoacidose prévia), ou seja, as amostras de medula óssea utilizadas para expansão das MSCs foram colhidas em até 6 semanas após o diagnóstico. Assim, as MSCs não ficaram expostas a ambiente inóspito (hiperglicemia, concentração elevada de ácidos graxos e cetonas), apesar de a reação autoimune ter iniciado vários anos antes do diagnóstico. Esse fato pode justificar a ausência de alterações funcionais observadas nas MSCs de pacientes com DM-1 em relação aos defeitos observados em MSCs isoladas de pacientes com outras doenças crônicas ou metabólicas.

O transplante autólogo de MSCs de pacientes com doenças autoimunes já vem sendo testado por diferentes grupos de pesquisa. Carrion e colaboradores transplantaram MSCs autólogas em dois pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e observaram que, apesar de a frequência de células Treg ter aumentado na circulação sanguínea, nenhuma melhora clínica (atividade da doença) foi proporcionada pela terapia (Carrion *et al.*, 2010). O transplante autólogo de MSCs em pacientes com doença de Crohn se mostrou seguro e relativamente eficaz, promovendo melhora clínica em três de nove pacientes tratados (Duijvestein *et al.*, 2010). Em outro estudo, o transplante de MSCs em pacientes com doença de Crohn promoveu aumento da frequência de células Tregs na circulação e na mucosa intestinal, bem como diminuiu o escore clínico da doença

(Ciccocioppo *et al.*, 2011). A administração de MSCs autólogas em pacientes com esclerose múltipla (secundária progressiva) promoveu redução no EDSS (*expanded disability status scale*), aumento da área do nervo óptico e da acuidade visual (Connick *et al.*, 2012). Com relação ao DM-1, existem atualmente alguns protocolos clínicos (fases 1 e 2) com MSCs autólogas ou alogênicas (cordão umbilical, medula óssea, sangue menstrual) em andamento (*clinicaltrials.gov*). Em estudo duplo-cego, o transplante de MSCs alogênicas isoladas da geléia de Wharton (cordão umbilical) em pacientes com DM-1 recém-diagnosticados (n=15) promoveu diminuição da porcentagem de hemoglobina glicada e aumento da produção de peptídeo C por um período de 24 meses após administração das MSCs (Hu *et al.*, 2013). Os resultados obtidos nesses estudos sugerem que o transplante de MSCs autólogas em pacientes com doença de Crohn, DM-1 ou esclerose múltipla pode representar uma abordagem terapêutica promissora.

As MSCs possuem a capacidade de induzir/expandir a população de células Tregs, tanto *in vitro* como *in vivo* (Casiraghi *et al.*, 2008; Gonzalez-Rey *et al.*, 2010; Luz-Crawford *et al.*, 2013). As células Tregs possuem papel fundamental no controle das respostas imunológicas, suprimindo a resposta contra antígenos próprios e limitando respostas imunes excessivas prejudiciais ao indivíduo. Problemas no desenvolvimento ou função das células Tregs resultam no desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias em humanos e animais (Sakaguchi *et al.*, 2008). No presente estudo, não observamos aumento da frequência de células Tregs, tanto no baço quanto nos linfonodos pancreáticos, independentemente da via de administração utilizada (intrapaneática ou intraesplênica) ou da natureza das MSCs (ADMSCs murinas ou DM1-MSCs/C-MSCs) transplantadas. As análises foram feitas 30-35 e/ou 70 dias após a administração das MSCs, podendo representar períodos de tempo muito tardios para detectar alterações na porcentagem de células Tregs. Madec e colaboradores observaram aumento da frequência de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺ cinco dias após administração das MSCs em camundongos NOD (Madec *et al.*, 2009). No estudo de Jurewicz e colaboradores, os autores relataram aumento da citocina imunossupressora IL-10 sete dias após administração das MSCs em camundongos NOD. No entanto, nos períodos seguintes (14 e 21 dias) os níveis de IL-10 apresentaram-se semelhantes aos dos camundongos não tratados. Não foi observado aumento da frequência de células Tregs nos linfonodos pancreáticos 14 dias após a administração de MSCs (Jurewicz *et al.*, 2010). De maneira semelhante, Fiorina e colaboradores não observaram diferenças

significantes na frequência de células Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no baço e linfonodos pancreáticos de camundongos NOD 28 dias após infusão das MSCs (isoladas de camundongos Balb/c ou NOD) (Fiorina *et al.*, 2009). Alguns trabalhos detectaram aumento da frequência de células Tregs mesmo depois de um período de tempo prolongado após administração das MSCs. No trabalho de Ezquer e colaboradores, os autores observaram aumento da frequência de células Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ no baço dos camundongos diabéticos (STZ) nos dias 7 e 65 após administração das MSCs. No entanto, a frequência de células Tregs permaneceu inalterada nos linfonodos pancreáticos. (Ezquer *et al.*, 2012). A modulação da população de células Tregs também foi observada por Boumaza e colaboradores, os quais relataram aumento da frequência de células $CD4^+Foxp3^+$ e $CD8^+Foxp3^+$ no baço dos ratos diabéticos 62 dias após tratamento com MSCs (Boumaza *et al.*, 2009). Em nossos experimentos, não foi possível correlacionar a melhora clínica dos camundongos diabéticos tratados com MSCs com a modulação da população de células Tregs, uma vez que essas se mantiveram inalteradas após a terapia.

As MSCs podem também modular a produção de citocinas, uma vez que elas suprimem a atividade de linfócitos T, B, células dendríticas e células NK (Stagg e Galipeau, 2013). A administração de DM1-MSCs ou C-MSCs em camundongos diabéticos promoveu diminuição significativa dos níveis de IL-2 e IFN- no homogeneizado pancreático. Além disso, os níveis IL-6, TNF- , IL-17 também se apresentaram diminuídos no homogeneizado pancreático dos camundongos tratados (DM1-MSCs ou C-MSCs) em relação aos não tratados, mas essa diferença não foi significativa ($P>0,05$). Ambas MSCs (DM1-MSCs ou C-MSCs) foram capazes de modular a produção de citocinas no ambiente pancreático de maneira semelhante. Não observamos diferenças significantes nas concentrações de IL-2, IL-6, IFN- , TNF- , IL-17, IL-4 e IL-10 no soro dos camundongos tratados com DM1-MSCs ou C-MSCs em comparação com os camundongos não tratados. Após terapia com MSCs, camundongos NOD diabéticos apresentaram diminuição da frequência de células produtoras de IFN- no baço (Fiorina *et al.*, 2009). Ezquer e colaboradores observaram polarização da resposta imune para o padrão Th2 após administração de MSCs em camundongos diabéticos (STZ). A frequência de células produtoras de IL-2, IFN- e TNF- diminuíram no baço e linfonodos pancreáticos, e os níveis de IL-13 (padrão Th2) aumentou no soro dos camundongos tratados (Ezquer *et al.*, 2012). Boumaza e colaboradores não observaram mudanças na produção de IFN- , TNF- e IL-10 pelos

linfócitos T isolados de ratos diabéticos tratados com MSCs. No entanto, a produção de IL-13 aumentou após terapia com MSCs (Boumaza *et al.*, 2009). No estudo de Bassi e colaboradores, a administração de ADMSCs em camundongos NOD diabéticos promoveu redução dos níveis de IFN- γ no homogeneizado pancreático, no entanto os níveis de IL-2 e TNF- α não foram alterados (Bassi *et al.*, 2012). A diminuição das citocinas pró-inflamatórias observada em nosso estudo e nos demais, pode representar um possível mecanismo pelo qual a MSCs promoveu melhora da hiperglicemia nos camundongos tratados. A diminuição do processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas pode favorecer maior preservação de massa de células residuais ou neo-formadas, aumentando os níveis de insulina circulante e, consequentemente, diminuindo os níveis de glicose sanguínea dos camundongos diabéticos.

Não encontramos explicação para o fato de que alguns camundongos responderam a terapia (reversão da hiperglicemia) e outros não responderam. Em todos os experimentos realizados, a glicemia antes do transplante de MSCs dos dois grupos (respondedores $\times$ não respondedores) foi semelhante. Além disso, as MSCs foram cultivadas/processadas da mesma maneira e utilizadas na mesma passagem, e ainda, os camundongos foram mantidos no biotério nas mesmas condições de acondicionamento e alimentação. No estudo de Boumaza e colaboradores, os autores observaram que nem todos os ratos Lewis diabéticos que receberam infusões de MSCs responderam da mesma forma à terapia. Nesse trabalho, foi mostrado que quando as MSCs foram injetadas nos dias 4 e 10 após indução do diabetes por STZ, apenas dois animais apresentaram reversão da hiperglicemia e o restante (n=6) permaneceu hiperglicêmico por todo período analisado. Quando as células foram administradas nos dias -2 (antes da indução), 4 e 10 após a STZ, apenas três animais responderam e quatro camundongos não responderam ao tratamento com MSCs. Os autores sugerem que as diferentes respostas observadas poderiam ser atribuídas a diferenças intrínsecas de cada indivíduo (Boumaza *et al.*, 2009). Bassi e colaboradores observaram reversão da hiperglicemia em 78% (7 de 9 camundongos) dos camundongos NOD recém-diabéticos tratados com ADMSCs (Bassi *et al.*, 2012). Em nossos experimentos, podemos pensar em possíveis causas que levaram alguns camundongos a não responderem ao tratamento com MSCs. Primeiramente, a administração de MSCs pelas vias intrapancreática e intraesplênica envolve procedimentos cirúrgicos invasivos/traumáticos, os quais podem afetar os camundongos de forma diferente (intensidade da hemorragia, inflamação, dor e estresse). Além disso, o local exato de injeção das MSCs nos órgãos (pâncreas ou baço)

pode sofrer pequenas variações de um indivíduo em relação a outro. Outro aspecto é a utilização de MSCs alogênicas (ADMSCs) ou xenogênicas (DM1-MSCs/C-MSCs), que apesar de serem hipoimunogênicas, podem ter sofrido algum tipo de rejeição imune nos animais que não responderam à terapia. Não avaliamos o estado de preservação e funcionalidade das células pancreáticas presentes antes da infusão das MSCs, podendo influenciar a eficiência da terapia. Outra questão interessante observada em nossos experimentos é acerca da modulação da produção de citocinas após administração de DM1-MSCs ou C-MSCs (xenogênica), e que não foi observada no tratamento feito com ADMSCs (alogênicas). Podemos pensar que o modo de atuação das células (MSCs de camundongo x MSCs de humano) e como o organismo (receptor) responde/estimula essas MSCs podem ser diferentes, gerando resultados diferentes em um mesmo tipo de terapia.

De acordo com a maioria dos trabalhos que utilizaram as MSCs em modelos experimentais de diabetes, a melhora clínica promovida por essas células acontece por meio de suas propriedades imunomoduladoras e/ou pelo efeito parácrino das proteínas anti-apoptóticas e fatores de crescimento produzidos por elas (Boumaza *et al.*, 2009; Fiorina *et al.*, 2009; Madec *et al.*, 2009; Bassi *et al.*, 2012; Ezquer *et al.*, 2012). Em nosso estudo, após administração de ADMSCs ou DM1-MSCs/C-MSCs, as ilhotas pancreáticas apresentaram-se maiores e ausente de células inflamatórias infiltradas. Além disso, os tratamentos promoveram aumento da expressão de insulina nas ilhotas, sugerindo uma maior quantidade de células beta. Ao avaliarmos a expressão da molécula Ki-67 no tecido pancreático 35/70 dias após a terapia, não observamos diferenças no número de células Ki-67 positivas (em proliferação) nos diferentes grupos experimentais. Considerando que a hiperglicemia foi revertida logo na primeira semana após a administração das MSCs, a expansão das células pancreáticas, estimulada pelas MSCs, pode ter acontecido mais precocemente. Assim, na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis pela reversão da hiperglicemia, outros experimentos se fazem necessários utilizando amostras (sangue, células, tecido) colhidas poucos dias após a injeção das MSCs.

A transdiferenciação *in vivo* das MSCs em células produtoras de insulina é um fenômeno controverso. Diferentes estudos transferiram células totais da medula óssea (dentre elas MSCs) de camundongos GFP⁺ (*green fluorescent protein*) e observaram que, após administração de agente diabetogênico (STZ ou aloxana) nos camundongos receptores, as células GFP⁺ migraram para o pâncreas, mas não se diferenciaram em

células produtoras de insulina e de glucagon (Choi *et al.*, 2003; Lechner *et al.*, 2004; Taneera *et al.*, 2006). Urbán e colaboradores administraram células de medula óssea e MSCs de camundongos machos em fêmeas diabéticas e relataram reversão da hiperglicemia. No entanto, não observaram presença de cromossomo Y nas ilhotas pancreáticas nos dias 2 e 84 após tratamento, sugerindo que as células recém-formadas não se originaram das MSCs transplantadas, mas sim de células do próprio receptor (Urbán *et al.*, 2008). Alguns trabalhos relataram que as MSCs injetadas em camundongos NOD diabéticos migraram preferencialmente para os linfonodos pancreáticos, sendo que poucas/raras MSCs se dirigiram para o pâncreas (Fiorina *et al.*, 2009; Madec *et al.*, 2009; Ezquer *et al.*, 2012). Por outro lado, no estudo de Lee e colaboradores, uma pequena parcela das MSCs humanas injetadas migrou para o pâncreas após administração em camundongos NOD/SCID diabéticos, e se diferenciaram em células produtoras de insulina (positivas para insulina humana e PDX-1)(Lee *et al.*, 2006). Considerando os resultados controversos acerca da transdiferenciação das MSCs em células pancreáticas, diversos autores sugerem que as MSCs atuam no diabetes de forma parácrina, promovendo citoproteção, diminuição da inflamação e apoptose e ainda, estimulando a angiogênese. As MSCs transplantadas podem fornecer fatores de crescimento, como IGF-1, VEGF, HGF, que atuariam na preservação das células e na indução de proliferação de progenitores endógenos, resultando na regeneração do pâncreas (Xu *et al.*, 2008).

No presente estudo, a administração das ADMSCs pela via intrapancreática possibilitou a retenção das células no ambiente pancreático por cerca de oito dias. Por outro lado, as ADMSCs administradas pela via intraesplênica foram detectadas no baço e fígado por no máximo cinco dias. No estudo de Baertschiger e colaboradores, as MSCs humanas injetadas pela via intraesplênica em camundongos NOD/SCID com hepatectomia parcial permaneceram no baço por até oito semanas (Baertschiger *et al.*, 2009). Catorze dias após infusão intraesplênica de MSCs humanas marcadas em ratos com lesão hepática, Ju e colaboradores detectaram MSCs no fígado por ressonância magnética (Ju *et al.*, 2007). De acordo com nossos resultados, as MSCs foram capazes de promover bons resultados terapêuticos após injeção intraesplênica mesmo permanecendo pouco tempo nos receptores. A produção de moléculas anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e pró-angiogênicas promovem microambiente protetor, permitindo o reparo tecidual por células progenitoras locais. Dessa forma, os efeitos benéficos proporcionados pelas MSCs são mantidos por período de tempo prolongado,

não havendo necessidade da manutenção das MSCs no sítio de lesão (Nombela-Arrieta, Ritz e Silberstein, 2011).

A via intraesplênica de administração de ADMSCs foi a mais eficiente, pois promoveu reversão da hiperglicemia em cerca de 70-100% dos animais transplantados. De acordo com o PIBB, após administração intraesplênica, as MSCs ficaram retidas do baço e fígado dos camundongos. Kodama e colaboradores relataram que células-tronco residentes no baço de camundongos NOD foram capazes de se diferenciarem em células pancreáticas, promovendo, assim, aumento da massa de células produtoras de insulina e diminuição da hiperglicemia (Kodama *et al.*, 2003). No estudo de Yin e colaboradores, o transplante de ilhotas pancreáticas sob a cápsula renal de camundongos diabéticos (STZ) promoveu aumento de massa de células produtoras de insulina. Por outro lado, quando o transplante de ilhotas foi realizado em camundongos esplenectomizados, não houve aumento das células pancreáticas. Após transferência de esplenócitos, os camundongos esplenectomizados se comportaram da mesma maneira que os animais que não tiveram o baço removido, no entanto, não houve diferenciação direta de esplenócitos em células produtoras de insulina (Yin *et al.*, 2006). O fígado também pode estimular indiretamente a proliferação de células pancreáticas. Yi e colaboradores identificaram em modelo murino de resistência à insulina a existência de um hormônio chamado betatrofina, produzido por células do fígado e por adipócitos, que estimula a proliferação das células pancreáticas (Yi, Park e Melton, 2013). Tendo em vista nossos resultados e os dados da literatura, a retenção das MSCs no baço e fígado poderia contribuir para os efeitos indiretos que esses órgãos exercem na expansão das células pancreáticas. A produção de proteínas pelas MSCs retidas no baço e fígado poderia estimular progenitores endógenos a se diferenciarem em células pancreáticas ou induzir a produção de fatores de crescimento pelos hepatócitos/esplenócitos que atuariam de forma parácrina no pâncreas. A administração das MSCs pela via intrapancreática não foi tão eficiente quanto à intraesplênica, o que nos faz pensar que as MSCs não precisariam ficar retidas no pâncreas para exercer sua função terapêutica. Nesse sentido, Kota e colaboradores observaram que MSCs humanas injetadas intravenosamente em camundongos NOD pré-diabéticos ficaram aprisionadas nos pulmões e mesmo assim foram capazes de retardar o desenvolvimento do diabetes. A produção de TSG-6 (*tumor necrosis factor stimulated gene 6*) pelas MSCs induziu perfil tolerogênico de resposta imune nos camundongos tratados (Kota *et al.*, 2013). De forma geral, podemos sugerir que as MSCs administradas não precisam

ficar retidas no local da lesão, mas sim devem ser estimuladas eficientemente, mesmo que distantes, a produzirem fatores tróficos que atuarão em outras células do organismo.

6. CONCLUSÕES

MSCs isoladas de pacientes com DM-1 recém-diagnosticado apresentaram características morfológicas e funcionais semelhantes às obtidas de indivíduos saudáveis. A administração dessas células em camundongos diabéticos reverteu a hiperglicemia, melhorou o metabolismo da glicose, ajudou na preservação/expansão das células pancreáticas, aumentou os níveis de insulina circulante e modulou o perfil de citocinas inflamatórias no tecido pancreático, sendo a via intraesplênica a mais adequada para esse tipo de tratamento. Assim, o transplante autólogo de MSCs de pacientes com DM-1 recém-diagnosticado representa uma possível abordagem terapêutica no tratamento dessa doença.

7. REFERÊNCIAS

- ABDI, R. et al. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 7, p. 1759-67, Jul 2008. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18586907> >.
- ACHARJEE, S. et al. Understanding type 1 diabetes: etiology and models. **Can J Diabetes**, v. 37, n. 4, p. 269-76, Aug 2013. ISSN 1499-2671. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24070892> >.
- ACOSTA, L. et al. Adipose mesenchymal stromal cells isolated from type 2 diabetic patients display reduced fibrinolytic activity. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4266-9, Dec 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24043757> >.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-22, Feb 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494428> >.
- ALONSO, N. et al. Regulatory T cells in diabetes and gastritis. **Autoimmun Rev**, v. 8, n. 8, p. 659-62, Jul 2009. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393198> >.
- ALVAREZ, S. S. et al. A new approach for bone marrow-derived stem cells intrapancreatic autotransplantation in diabetic rats. **Microsurgery**, v. 26, n. 7, p. 539-42, 2006. ISSN 0738-1085. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17006956> >.
- AMIN, M. A. et al. Short-term evaluation of autologous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with cirrhosis: Egyptian study. **Clin Transplant**, v. 27, n. 4, p. 607-12, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1399-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23923970> >.
- ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 447-85, 2005. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771578> >.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 221-9, Jul 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476858> >.
- ATOUI, R.; CHIU, R. C. Concise review: immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: update, controversies, and unknowns. **Stem Cells Transl Med**, v. 1, n. 3, p. 200-5, Mar 2012. ISSN 2157-6564. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197779> >.
- BACIGALUPO, A. et al. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia. **Exp Hematol**, v. 33, n. 7, p. 819-27, Jul 2005. ISSN 0301-472X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963858> >.
- BAECHER-ALLAN, C.; HAFLER, D. A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. **Immunol Rev**, v. 212, p. 203-16, Aug 2006. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16903916> >.

BAERTSCHIGER, R. M. et al. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. e6657, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684854> >.

BAI, L. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. **Glia**, v. 57, n. 11, p. 1192-203, Aug 2009. ISSN 1098-1136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19191336> >.

BARACHINI, S. et al. Morpho-functional characterization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood for potential uses in regenerative medicine. **Stem Cells Dev**, v. 18, n. 2, p. 293-305, Mar 2009. ISSN 1557-8534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444788> >.

BARANIAK, P. R.; MCDEVITT, T. C. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. **Regen Med**, v. 5, n. 1, p. 121-43, Jan 2010. ISSN 1746-076X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20017699> >.

BARBASH, I. M. et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. **Circulation**, v. 108, n. 7, p. 863-8, Aug 2003. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900340> >.

BASSI, Ê. et al. Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. **Diabetes**, v. 61, n. 10, p. 2534-45, Oct 2012. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688334> >.

BELL, G. I.; HORITA, S.; KARAM, J. H. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 33, n. 2, p. 176-83, Feb 1984. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6363172> >.

BELL, G. I. et al. Intrapancreatic delivery of human umbilical cord blood aldehyde dehydrogenase-producing cells promotes islet regeneration. **Diabetologia**, v. 55, n. 6, p. 1755-60, Jun 2012. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434536> >.

BERNARDO, M. E.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stromal cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1176, p. 101-17, Sep 2009. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796238> >.

BHONDE, R. R. et al. Making surrogate -cells from mesenchymal stromal cells: perspectives and future endeavors. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 46, p. 90-102, Jan 2014. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275096> >.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-9, Apr 2008. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18397751> >.

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1293-300, Apr 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20432533> >.

BOCELLI-TYNDALL, C. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and

allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, n. 3, p. 403-8, Mar 2007. ISSN 1462-0324. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920750> >.

BOROUJENI, Z.; ALEYASIN, A. Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells Can Secret Insulin In Vitro and In Vivo. **Biotechnol Appl Biochem**, May 2013. ISSN 1470-8744. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23725211> >.

BOUMAZA, I. et al. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. **J Autoimmun**, v. 32, n. 1, p. 33-42, Feb 2009. ISSN 0896-8411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19062254> >.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, Dec 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742414> >.

BRUNNER, D. et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **ALTEX**, v. 27, n. 1, p. 53-62, 2010. ISSN 1868-596X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20390239> >.

CAILLAT-ZUCMAN, S. et al. Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Invest**, v. 90, n. 6, p. 2242-50, Dec 1992. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1469084> >.

CALKOEN, F. G. et al. Mesenchymal stromal cells isolated from children with systemic juvenile idiopathic arthritis suppress innate and adaptive immune responses. **Cytotherapy**, v. 15, n. 3, p. 280-91, Mar 2013. ISSN 1477-2566. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23312448> >.

CALLAGHAN, M. J.; CERADINI, D. J.; GURTNER, G. C. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species and impaired endothelial progenitor cell function. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 11-12, p. 1476-82, 2005 Nov-Dec 2005. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356110> >.

CALLONI, R. et al. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 22, n. 9, p. 1455-76, May 2013. ISSN 1557-8534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336433> >.

CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. **Autoimmun Rev**, Jan 2014. ISSN 1873-0183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424179> >.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem**, v. 98, n. 5, p. 1076-84, Aug 2006. ISSN 0730-2312. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16619257> >.

CARRION, F. et al. Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 19, n. 3, p. 317-22, Mar 2010. ISSN 1477-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919974> >.

CASADO, J. G.; TARAZONA, R.; SANCHEZ-MARGALLO, F. M. NK and MSCs crosstalk: the sense of immunomodulation and their sensitivity. **Stem Cell Rev**, v. 9, n. 2, p. 184-9, Apr 2013. ISSN 1558-6804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23397451> >.

CASIRAGHI, F. et al. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. **J Immunol**, v. 181, n. 6, p. 3933-46, Sep 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768848> >.

CHAMBERLAIN, G. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739-49, Nov 2007. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656645> >.

CHANG, C. et al. Mesenchymal stroma cells improve hyperglycemia and insulin deficiency in the diabetic porcine pancreatic microenvironment. **Cytotherapy**, v. 10, n. 8, p. 796-805, 2008. ISSN 1477-2566. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18979304> >.

CHAO, K. C. et al. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. **PLoS One**, v. 3, n. 1, p. e1451, 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18197261> >.

CHEN, Q. Q. et al. Mesenchymal stem cells alleviate TNBS-induced colitis by modulating inflammatory and autoimmune responses. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 29, p. 4702-17, Aug 2013. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23922467> >.

CHOI, E. W. et al. Reversal of serologic, immunologic, and histologic dysfunction in mice with systemic lupus erythematosus by long-term serial adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 1, p. 243-53, Jan 2012. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904997> >.

CHOI, J. B. et al. Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 46, n. 10, p. 1366-74, Oct 2003. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12898006> >.

CICCOCIOPPO, R. et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. **Gut**, v. 60, n. 6, p. 788-98, Jun 2011. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257987> >.

CIPRIANI, P. et al. Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 6, p. 1994-2004, Jun 2007. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17530639> >.

CONNICK, P. et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. **Lancet Neurol**, v. 11, n. 2, p. 150-6, Feb 2012. ISSN 1474-4465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236384> >.

CONSTANTIN, G. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. **Stem Cells**, v. 27, n. 10, p. 2624-35, Oct 2009. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19676124> >.

COPPIETERS, K. T. et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. **J Exp Med**, v. 209, n. 1, p. 51-60, Jan 2012. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22213807> >.

CORCIONE, A. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 367-72, Jan 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141348> >.

CORSELLI, M. et al. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 6, p. 1104-9, Jun 2010. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453168> >.

COURI, C. E.; VOLTARELLI, J. C. Autologous stem cell transplantation for early type 1 diabetes mellitus. **Autoimmunity**, v. 41, n. 8, p. 666-72, Dec 2008. ISSN 1607-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18958750> >.

COVAS,D.T; ZAGO, M.A. **Células-tronco:a nova fronteira da medicina**. Ed Atheneu. 2006.

CRAMER, C. et al. Persistent high glucose concentrations alter the regenerative potential of mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 19, n. 12, p. 1875-84, Dec 2010. ISSN 1557-8534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380516> >.

D, S. et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells isolated from patients with diabetes mellitus type 1 are able to induce a pancreatic endocrine genes in vitro. **J Stem Cells Regen Med**, v. 2, n. 1, p. 102-3, 2007. ISSN 0973-7154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24692931> >.

D'ALISE, A. M. et al. The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 50, p. 19857-62, Dec 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19073938> >.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-99, Sep 2008. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566331> >.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204-13, Jun 2006. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684817> >.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847-58, Mar 2006. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530579> >.

DAZZI, F.; LOPES, L.; WENG, L. Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'? **Immunology**, v. 137, n. 3, p. 206-13, Nov 2012. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22804624> >.

DE CARVALHO, A.C.C; GOLDENBERG,R.C.S. **Células-tronco Mesenquimais - Conceitos, Métodos de Obtenção e Aplicações**. Ed. Atheneu. 2012.

DE MIGUEL, M. P. et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. **Curr Mol Med**, v. 12, n. 5, p. 574-91, Jun 2012. ISSN 1875-5666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22515979> >.

DE OLIVEIRA, G. L. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells isolated from multiple sclerosis patients have distinct gene expression profile and decreased suppressive function compared with healthy counterparts. **Cell Transplant**, Nov 2013. ISSN 1555-3892. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24256874> >.

DEBIN, L. et al. Autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on diabetic patients with lower limb ischemia. **Journal of Medical Colleges of PLA**, v. 23, n. 2, p. 106-115, 2008. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1000194808600313> >.

DELAROSA, O.; DALEMANS, W.; LOMBARDO, E. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. **Curr Opin Biotechnol**, v. 23, n. 6, p. 978-83, Dec 2012. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682584> >.

DENG, W. et al. Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSB mice. **DNA Cell Biol**, v. 24, n. 7, p. 458-63, Jul 2005. ISSN 1044-5498. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16008514> >.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> >.

DONG, Q. Y. et al. Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. **Clin Invest Med**, v. 31, n. 6, p. E328-37, 2008. ISSN 1488-2353. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19032902> >.

DORRONSORO, A. et al. Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications. **Bone Marrow Res**, v. 2013, p. 203643, 2013. ISSN 2090-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24187625> >.

DOTTA, F. et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 12, p. 5115-20, Mar 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360338> >.

DUDICS, V. et al. Chondrogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: measurements in a microculture system. **Cells Tissues Organs**, v. 189, n. 5, p. 307-16, 2009. ISSN 1422-6421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562787> >.

DUIJVESTIJN, M. et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. **Gut**, v. 59, n. 12, p. 1662-9, Dec 2010. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921206> >.

ENGLISH, K. et al. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunol Lett**, v. 110, n. 2, p. 91-100, Jun 2007. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507101> >.

ERINGSMARK REGNÉLL, S.; LERNMARK, A. The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes. **Diabet Med**, v. 30, n. 2, p. 155-60, Feb 2013. ISSN 1464-5491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23252770> >.

ESTRADA, E. J. et al. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone marrow stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus. **Cell Transplant**, v. 17, n. 12, p. 1295-304, 2008. ISSN 0963-6897. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19364067> >.

EZQUER, F. et al. The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the

pancreatic microenvironment. **Stem Cells**, v. 30, n. 8, p. 1664-74, Aug 2012. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22644660> >.

EZQUER, F. E. et al. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 14, n. 6, p. 631-40, Jun 2008. ISSN 1523-6536. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18489988> >.

FEDERICI, M. et al. High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1290-301, Jun 2001. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375329> >.

FERRARO, F. et al. Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. **Sci Transl Med**, v. 3, n. 104, p. 104ra101, Oct 2011. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998408> >.

FIORINA, P. et al. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 993-1004, Jul 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561093> >.

FISCHER, U. M. et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem Cells Dev**, v. 18, n. 5, p. 683-92, Jun 2009. ISSN 1557-8534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19099374> >.

FORLENZA, G. P.; REWERS, M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 18, n. 4, p. 248-51, Aug 2011. ISSN 1752-2978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844707> >.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, n. 4, p. 393-403, Oct 1970. ISSN 0008-8730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5523063> >.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-47, Mar 1968. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654088> >.

FURLANI, D. et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. **Microvasc Res**, v. 77, n. 3, p. 370-6, May 2009. ISSN 1095-9319. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249320> >.

GAO, J. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. **Cells Tissues Organs**, v. 169, n. 1, p. 12-20, 2001. ISSN 1422-6405. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11340257> >.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ**, v. 175, n. 2, p. 165-70, Jul 2006. ISSN 1488-2329. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847277> >.

GONZALEZ-REY, E. et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 1, p. 241-8, Jan 2010. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124525> >.

GONZÁLEZ, M. A. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. **Gastroenterology**, v. 136, n. 3, p. 978-89, Mar 2009a. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135996> >.

GONZÁLES, M.A. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 4, p. 1006-19, Apr 2009b. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333946> >.

GORDON, D. et al. Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. **Neurosci Lett**, v. 448, n. 1, p. 71-3, Dec 2008. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18950680> >.

GUIDUCCI, S. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis in vitro. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 11, p. 2011-21, Nov 2011. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821866> >.

HONCZARENKO, M. et al. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. **Stem Cells**, v. 24, n. 4, p. 1030-41, Apr 2006. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16253981> >.

HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-5, 2005. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236628> >.

HU, J. et al. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. **Endocr J**, v. 60, n. 3, p. 347-57, 2013. ISSN 1348-4540. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23154532> >.

HUSSAIN, M. A.; THEISE, N. D. Stem-cell therapy for diabetes mellitus. **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 203-5, 2004 Jul 10-16 2004. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15246735> >.

ITOH, N. et al. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. **J Clin Invest**, v. 92, n. 5, p. 2313-22, Nov 1993. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8227346> >.

INZUCCHI, S.E; SHERWIN, R.S. Type 1 diabetes mellitus. **Goldman: Goldman's Cecil Medicine**, 24th ed. Capítulo 236, p. e78-79. 2008. Disponível em: <<http://www.mdconsult.com/books/page.do?eid=4-u1.0-B978-1-4377-1604-7..00561-3&isbn=978-1-4377-1604-7&type=bookPage&from=content&uniqId=444252053-2>>

JIN, P. et al. Streptozotocin-induced diabetic rat-derived bone marrow mesenchymal stem cells have impaired abilities in proliferation, paracrine, antiapoptosis, and myogenic differentiation. **Transplant Proc**, v. 42, n. 7, p. 2745-52, Sep 2010. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20832580> >.

JU, S. et al. In vivo MR tracking of mesenchymal stem cells in rat liver after intrasplenic transplantation. **Radiology**, v. 245, n. 1, p. 206-15, Oct 2007. ISSN 0033-8419. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717324> >.

JUREWICZ, M. et al. Congenic mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3139-47, Dec 2010. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20841611> >.

KADAM, S. et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells and islet-like cell clusters generated from these cells as a novel source for stem cell therapy in diabetes. **Rev Diabet Stud**, v. 7, n. 2, p. 168-82, 2010. ISSN 1614-0575. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060975> >.

KAPLAN, J. M.; YOUNG, M. E.; LODIE, T. A. Immunomodulatory activity of mesenchymal stem cells. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 6, n. 4, p. 297-316, Dec 2011. ISSN 1574-888X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21190531> >.

KASSIS, I. et al. Mesenchymal stem cells (MSC) derived from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) suppress EAE and have similar biological properties with MSC from healthy donors. **Immunol Lett**, v. 154, n. 1-2, p. 70-6, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1879-0542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994102> >.

KASTRINAKI, M. C. et al. Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 6, p. 741-9, Jun 2008. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17921184> >.

KATUCHOVA, J. et al. Impact of different pancreatic microenvironments on improvement in hyperglycemia and insulin deficiency in diabetic rats after transplantation of allogeneic mesenchymal stromal cells. **J Surg Res**, v. 178, n. 1, p. 188-95, Nov 2012. ISSN 1095-8673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480834> >.

KERKIS, I. et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **J Transl Med**, v. 6, p. 35, 2008. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598348> >.

KHUBUTIYA, M. S. et al. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. **Cytotherapy**, v. 16, n. 5, p. 579-585, May 2014. ISSN 1477-2566. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113425> >.

KIM, J. et al. Human insulin secreted from insulinogenic xenograft restores normoglycemia in type 1 diabetic mice without immunosuppression. **Cell Transplant**, v. 21, n. 10, p. 2131-47, 2012. ISSN 1555-3892. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22490341> >.

KLINKE, D. J. Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 3, n. 1, p. e1374, 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167535> >.

KODAMA, S. et al. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. **Science**, v. 302, n. 5648, p. 1223-7, Nov 2003. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615542> >.

KOLM-LITTY, V. et al. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. **J Clin Invest**, v. 101, n. 1, p. 160-9, Jan 1998. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421478> >.

KOTA, D. J. et al. TSG-6 produced by hMSCs delays the onset of autoimmune diabetes by suppressing Th1 development and enhancing tolerogenicity. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 2048-58, Jun 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349496> >.

KUKI, S. et al. Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **Circ J**, v. 70, n. 8, p. 1076-81, Aug 2006. ISSN 1346-9843. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16864945> >.

KUSNER, L. L.; SARTHY, V. P.; MOHR, S. Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a role in high glucose-induced apoptosis in retinal Müller cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 45, n. 5, p. 1553-61, May 2004. ISSN 0146-0404. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111614> >.

LALU, M. M. et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47559, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23133515> >.

LARGHERO, J. et al. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 4, p. 443-9, Apr 2008. ISSN 1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17526552> >.

LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 5, p. 383-96, May 2012. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22531326> >.

LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 11, n. 5, p. 321-34, May 2005. ISSN 1083-8791. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15846285> >.

LE BLANC, K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Exp Hematol**, v. 31, n. 10, p. 890-6, Oct 2003. ISSN 0301-472X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550804> >.

LE BLANC, K. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scand J Immunol**, v. 57, n. 1, p. 11-20, Jan 2003. ISSN 0300-9475. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542793> >.

LECHNER, A. et al. No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. **Diabetes**, v. 53, n. 3, p. 616-23, Mar 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988245> >.

LEE, R. H. et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 46, p. 17438-43, Nov 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088535> >.

LI, L. et al. Suppression of the PI3K-Akt pathway is involved in the decreased adhesion and migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from non-obese diabetic mice. **Cell Biol Int**, v. 35, n. 9, p. 961-6, Sep 2011. ISSN 1095-8355. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21449895> >.

- LI, Y. M. et al. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 363, n. 1, p. 209-15, Nov 2007. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868648> >.
- LI, Y. Y. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate STZ-induced pancreas damage in type 1 diabetes. **Biomed Mater Eng**, v. 22, n. 1-3, p. 97-103, 2012. ISSN 1878-3619. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22766707> >.
- LIU, X. J. et al. Reciprocal effect of mesenchymal stem cell on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by transforming growth factor-beta and interleukin-6. **Clin Exp Immunol**, v. 158, n. 1, p. 37-44, Oct 2009. ISSN 1365-2249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737229> >.
- LIU, Y. et al. Impaired cardioprotective function of transplantation of mesenchymal stem cells from patients with diabetes mellitus to rats with experimentally induced myocardial infarction. **Cardiovasc Diabetol**, v. 12, p. 40, 2013. ISSN 1475-2840. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452414> >.
- LOOMANS, C. J. et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 195-9, Jan 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693715> >.
- LUZ-CRAWFORD, P. et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. **Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 3, p. 65, Jun 2013. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23734780> >.
- LUZ-CRAWFORD, P. et al. Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45272, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23028899> >.
- MA, J. et al. Thalidomide corrects impaired mesenchymal stem cell function in inducing tolerogenic DCs in patients with immune thrombocytopenia. **Blood**, v. 122, n. 12, p. 2074-82, Sep 2013. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23926306> >.
- MACCARIO, R. et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. **Haematologica**, v. 90, n. 4, p. 516-25, Apr 2005. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15820948> >.
- MADEC, A. M. et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1391-9, Jul 2009. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19421731> >.
- MALLAM, E. et al. Characterization of in vitro expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 16, n. 8, p. 909-18, Aug 2010. ISSN 1477-0970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542920> >.
- MARIGO, I.; DAZZI, F. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. **Semin Immunopathol**, v. 33, n. 6, p. 593-602, Nov 2011. ISSN 1863-2300. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499984> >.

- MARSHAK, S. et al. Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. **Diabetes**, v. 48, n. 6, p. 1230-6, Jun 1999. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10342809> >.
- MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. beta-Cell death during progression to diabetes. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 792-8, Dec 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742411> >.
- MAZZANTI, B. et al. Differences in mesenchymal stem cell cytokine profiles between MS patients and healthy donors: implication for assessment of disease activity and treatment. **J Neuroimmunol**, v. 199, n. 1-2, p. 142-50, Aug 2008. ISSN 0165-5728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562015> >.
- MEIRELLES, L. A. S. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 5-6, p. 419-27, 2009 Oct-Dec 2009. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926330> >.
- MELIEF, S. M. et al. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. **Stem Cells Transl Med**, v. 2, n. 6, p. 455-63, Jun 2013. ISSN 2157-6564. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23694810> >.
- MENSAH-BROWN, E. P. et al. IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 1, p. 216-23, Jan 2006. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16358360> >.
- MEYERROSE, T. E. et al. In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. **Stem Cells**, v. 25, n. 1, p. 220-7, Jan 2007. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960135> >.
- MURPHY, S. V.; ATALA, A. Amniotic fluid and placental membranes: unexpected sources of highly multipotent cells. **Semin Reprod Med**, v. 31, n. 1, p. 62-8, Jan 2013. ISSN 1526-4564. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329638> >.
- MÜLLER, A. et al. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. **Immunobiology**, v. 205, n. 1, p. 35-50, Mar 2002. ISSN 0171-2985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11999343> >.
- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499-506, Nov 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17664353> >.
- NAUTA, A. J. et al. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. **J Immunol**, v. 177, n. 4, p. 2080-7, Aug 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887966> >.
- NEJENTSEV, S. et al. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 887-92, Dec 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18004301> >.
- NIE, Y. et al. Defective phenotype of mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 19, n. 7, p. 850-9, Jun 2010. ISSN 1477-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511276> >.

NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 2, p. 126-31, Feb 2011. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21253000> >.

NOTKINS, A. L. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 46, p. 43545-8, Nov 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270944> >.

NYSTEDT, J. et al. Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells. **Stem Cells**, v. 31, n. 2, p. 317-26, Feb 2013. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23132820> >.

PALMER, J. P. et al. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 250-64, Jan 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693724> >.

PAPADAKI, H. A. et al. Increased apoptosis of bone marrow CD34(+) cells and impaired function of bone marrow stromal cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Br J Haematol**, v. 115, n. 1, p. 167-74, Oct 2001. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722430> >.

PAPADAKI, H. A. et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect. **Blood**, v. 99, n. 5, p. 1610-9, Mar 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861275> >.

PHADNIS, S. M. et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow of diabetic patients portrait unique markers influenced by the diabetic microenvironment. **Rev Diabet Stud**, v. 6, n. 4, p. 260-70, 2009. ISSN 1614-0575. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20043038> >.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814> >.

PÉREZ-SIMÓN, J. A. et al. Mesenchymal stem cells are functionally abnormal in patients with immune thrombocytopenic purpura. **Cytotherapy**, v. 11, n. 6, p. 698-705, 2009. ISSN 1477-2566. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878056> >.

RANDOLPH, D. A.; FATHMAN, C. G. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. **Annu Rev Med**, v. 57, p. 381-402, 2006. ISSN 0066-4219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409156> >.

REN, G. et al. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. **Stem Cells Transl Med**, v. 1, n. 1, p. 51-8, Jan 2012. ISSN 2157-6564. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197640> >.

RISSO, A. et al. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 281, n. 5, p. E924-30, Nov 2001. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595647> >.

SAKAGUCHI, S. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 6, p. 684-90, Dec 2000. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102773> >.

- SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v. 133, n. 5, p. 775-87, May 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510923> >.
- SALOMON, B. et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. **Immunity**, v. 12, n. 4, p. 431-40, Apr 2000. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10795741> >.
- SCHREPFER, S. et al. Stem cell transplantation: the lung barrier. **Transplant Proc**, v. 39, n. 2, p. 573-6, Mar 2007. ISSN 0041-1345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17362785> >.
- SHANMUGAM, N. et al. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. **Diabetes**, v. 52, n. 5, p. 1256-64, May 2003. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716761> >.
- SHENG, H. et al. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. **Cell Res**, v. 18, n. 8, p. 846-57, Aug 2008. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18607390> >.
- SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **J Bone Miner Res**, v. 18, n. 4, p. 696-704, Apr 2003. ISSN 0884-0431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12674330> >.
- SOHNI, A.; VERFAILLIE, C. M. Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. **Stem Cells Int**, v. 2013, p. 130763, 2013. ISSN 1687-966X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194766> >.
- SOTIROPOULOU, P. A. et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 1, p. 74-85, Jan 2006. ISSN 1066-5099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099998> >.
- SPAGGIARI, G. M. et al. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. **Blood**, v. 107, n. 4, p. 1484-90, Feb 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239427> >.
- STAGG, J.; GALIPEAU, J. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. **Curr Mol Med**, v. 13, n. 5, p. 856-67, Jun 2013. ISSN 1875-5666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23642066> >.
- STOLZING, A.; COLEMAN, N.; SCUTT, A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. **Rejuvenation Res**, v. 9, n. 1, p. 31-5, 2006. ISSN 1549-1684. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16608393> >.
- STOLZING, A. et al. Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. **Cells Tissues Organs**, v. 191, n. 6, p. 453-65, 2010. ISSN 1422-6421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130391> >.
- SUN, X. C. et al. [Effects of intraperitoneal injection of marrow mesenchymal stem cells on intestinal barrier in acute pancreatitis]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 93, n. 12, p. 951-5, Mar 2013. ISSN 0376-2491. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23863684> >.

SUN, Y. et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. **Chin Med J (Engl)**, v. 120, n. 9, p. 771-6, May 2007. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17531117> >.

SURI-PAYER, E.; FRITZSCHING, B. Regulatory T cells in experimental autoimmune disease. **Springer Semin Immunopathol**, v. 28, n. 1, p. 3-16, Aug 2006. ISSN 0344-4325. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16838180> >.

TABERA, S. et al. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. **Haematologica**, v. 93, n. 9, p. 1301-9, Sep 2008. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641017> >.

TANEERA, J. et al. Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic beta-cell fate. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 290-6, Feb 2006. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443759> >.

TESCH, G. H.; NIKOLIC-PATERSON, D. J. Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy. **Nephron Exp Nephrol**, v. 104, n. 2, p. e57-62, 2006. ISSN 1660-2129. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785742> >.

TOMA, C. et al. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. **Circ Res**, v. 104, n. 3, p. 398-402, Feb 2009. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19096027> >.

TONG, Q. et al. Improved insulin secretion following intrapancreatic UCB transplantation in patients with T2DM. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 9, p. E1501-4, Sep 2013. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861460> >.

TONKIN, D. R. et al. Regulatory T cells prevent transfer of type 1 diabetes in NOD mice only when their antigen is present in vivo. **J Immunol**, v. 181, n. 7, p. 4516-22, Oct 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18802054> >.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 10, p. 2566-73, Oct 2006. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013987> >.

UCCELLI, A. et al. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 9, p. 726-36, Sep 2008. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19172693> >.

URBÁN, V. S. et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 244-53, Jan 2008. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932424> >.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev**, v. 91, n. 1, p. 79-118, Jan 2011. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248163> >.

VAN DEN AKKER, F.; DE JAGER, S. C.; SLUIJTER, J. P. Mesenchymal stem cell therapy for cardiac inflammation: immunomodulatory properties and the influence of toll-like receptors. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 181020, 2013. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24391353> >.

- VAN DER WERF, N. et al. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 23, n. 3, p. 169-83, Mar 2007. ISSN 1520-7552. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17103489> >.
- VIEIRA, N. M. et al. Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro. **Biol Cell**, v. 100, n. 4, p. 231-41, Apr 2008. ISSN 1768-322X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17997718> >.
- VOLTARELLI, J. C. et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 297, n. 14, p. 1568-76, Apr 2007. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426276> >.
- VON LÜTTICHAU, I. et al. Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. **Stem Cells Dev**, v. 14, n. 3, p. 329-36, Jun 2005. ISSN 1547-3287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15969628> >.
- WALDRON-LYNCH, F.; HEROLD, K. C. Advances in Type 1 diabetes therapeutics: immunomodulation and beta-cell salvage. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 38, n. 2, p. 303-17, viii, Jun 2009. ISSN 1558-4410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19328413> >.
- WANG, H. et al. Immunological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells and the therapeutic effects of their transplantation on hyperglycemia in diabetic rats. **Int J Mol Med**, v. 33, n. 2, p. 263-70, Feb 2014. ISSN 1791-244X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24297321> >.
- WANG, H. S. et al. Transplantation of insulin-producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. **Cell Transplant**, v. 20, n. 3, p. 455-66, 2011. ISSN 1555-3892. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719086> >.
- WANG, L. et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Chin Med J (Engl)**, v. 124, n. 22, p. 3622-8, Nov 2011. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22340214> >.
- WEIL, B. R. et al. High glucose concentration in cell culture medium does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 6, p. R1735-43, Jun 2009. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19386985> >.
- WILHELM, A. et al. Acute impairment of hepatic microcirculation and recruitment of nonparenchymal cells by intrasplenic hepatocyte transplantation. **J Pediatr Surg**, v. 39, n. 8, p. 1214-9, Aug 2004. ISSN 1531-5037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15300530> >.
- WILSON, T. et al. Fate of bone marrow-derived stromal cells after intraperitoneal infusion or implantation into femoral bone defects in the host animal. **J Tissue Eng**, v. 2010, p. 345806, 2010. ISSN 2041-7314. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21350643> >.
- WU, A. J. et al. Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 19, p. 12287-92, Sep 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221281> >.

XU, Y. Q.; LIU, Z. C. Therapeutic potential of adult bone marrow stem cells in liver disease and delivery approaches. **Stem Cell Rev**, v. 4, n. 2, p. 101-12, 2008. ISSN 1550-8943. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18481229> >.

XU, Y. X. et al. Mesenchymal stem cell therapy for diabetes through paracrine mechanisms. **Med Hypotheses**, v. 71, n. 3, p. 390-3, Sep 2008. ISSN 0306-9877. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538944> >.

YANG, Z. et al. Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 248, n. 10, p. 1415-22, Oct 2010. ISSN 1435-702X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20437245> >.

YAOCHITE, J. N. et al. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. **Immunobiology**, v. 218, n. 3, p. 338-52, Mar 2013. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22704522> >.

YI, P.; PARK, J. S.; MELTON, D. A. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic cell proliferation. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 747-58, May 2013. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623304> >.

YIN, D. et al. Recovery of islet beta-cell function in streptozotocin- induced diabetic mice: an indirect role for the spleen. **Diabetes**, v. 55, n. 12, p. 3256-63, Dec 2006. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17130468> >.

ZHANG, J. et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. **Exp Neurol**, v. 195, n. 1, p. 16-26, Sep 2005. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15904921> >.

ZHAO, W. et al. TGF-beta expression by allogeneic bone marrow stromal cells ameliorates diabetes in NOD mice through modulating the distribution of CD4+ T cell subsets. **Cell Immunol**, v. 253, n. 1-2, p. 23-30, 2008 May-Jun 2008. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675407> >.

ZÓKA, A. et al. Altered immune regulation in type 1 diabetes. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 254874, 2013. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24285974> >.

8. ANEXOS

8.1 Tabela 3. Painel de marcadores utilizados para imunofenotipagem de MSCs

(Fonte: <http://www.rndsystems.com>; <http://www.leicabiosystems.com>).

Marker	Function	Expression
CD90	(Thy1) GPI-linked glycoprotein	Endothelial cells, hematopoietic stem cells, and in developing nervous tissue.
CD73	Ecto-5'-nucleotidase: production of extracellular adenosine, a signaling molecule that is involved in responses to inflammation and tissue injury	Most cell types express CD73.
CD105	Endoglin is a type I integral transmembrane glycoprotein and is an accessory receptor for TGF-beta superfamily ligands.	Vascular endothelial cells, chondrocytes, and syncytiotrophoblasts of term placenta. It is also found on activated monocytes, mesenchymal stem cells and leukemic cells of lymphoid and myeloid lineages.
CD44	CD44 is an 80- to 250-kDa Type I transmembrane glycoprotein that binds hyaluronan and a variety of extracellular as well as cell-surface ligands.	A large number of mammalian cell types.
CD29	Integrin beta 1, mediates interactions between adhesion molecules on adjacent cells and/or the extracellular matrix	Most cells including all leukocytes, although only at low levels on granulocytes.
CD49e	Integrin alfa 5	NKT cells, NK cells, fibroblasts and platelets.
CD13	Aminopeptidase N, is a member of the type II integral membrane metalloproteases	Granulocytes, monocytes and their precursors, most acute myeloid leukemias and a smaller proportion of acute lymphoid leukemias.
HLA CLASSE I	MHC Class I antigen	Every nucleated cell of the body.
CD166	Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) is a membrane glycoprotein that is a member of the immunoglobulin superfamily	Activated monocytes, epithelial cells, fibroblasts, neurons, melanoma cells and also in sweat and sebaceous glands.
CD54	Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), also known as CD54, binds the leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1.	CAM-1 expression is weak on leukocytes, epithelial and resting endothelial cells, as well as some other cell types, but expression can be stimulated by cytokines.
CD106	VCAM-1 is a member of the immunoglobulin superfamily binds to VLA-4 and Integrin alpha 4 beta 7.	Activated endothelial cells and certain leukocytes such as macrophages.
STRO-1	STRO-1 is a cell surface protein	Bone marrow stromal cells and erythroid precursors.
CD45	Leukocyte common antigen	Majority of the human leukocytes (including lymphocytes, monocytes and eosinophils) but absent from erythrocytes and platelets.
CD34	Single chain transmembrane glycoprotein	Human lymphoid, myeloid hemopoietic progenitor cells and vascular endothelium.
CD14	Glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-linked glycoprotein	Cells of the myelomonocytic lineage including monocytes, macrophages and Langerhans cells.
HLA CLASSE II	MHC Class II antigen	Antigen-presenting cells (monocytes/macrophages and dendritic cells), B cells and some activated T cells.
CD51/61	Integrin alpha V/ glycoprotein	Platelets, monocytes, endothelial cells, smooth muscle cells, B cells, macrophages, mast cells and fibroblasts.
KDR	Angiogenic kinase insert domain-containing receptor (VEGF receptor-2)	Hematopoietic stem cells, Endothelial progenitor and mature cells.

8.2 Certificado de Aprovação Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 157/2010, sobre o projeto intitulado *“Estudo comparativo entre células estromais mesenquimais derivadas de pacientes com diabetes Mellitus tipo 1 e de indivíduos saudáveis com relação ao potencial terapêutico no tratamento do diabetes experimental”*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Júlio César Voltarelli** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de outubro de 2010.

(We certify that the protocol nº 157/2010, about *“Comparative analysis of mesenchymal stromal cells derived from patients with type 1 diabetes mellitus and healthy individuals regarding the therapeutic potential in the treatment of experimental diabetes”*, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 10/25/2010.

Ribeirão Preto, 25 de outubro de 2010.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

9. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

Mesenchymal stromal cells (MSCs) isolated from type 1 diabetes *mellitus* patients revert hyperglycemia in diabetic mice and have similar characteristics compared with MSCs from healthy individuals.

Abstract

T1D is characterized by an autoimmune response in which cellular immunity plays a pivotal role in the selective destruction of insulin-producing pancreatic beta cells, thus leading to impairment in glucose metabolism. Mesenchymal stromal cells (MSCs) have been used extensively to treat experimental T1D. MSCs can migrate to injured tissues and either differentiate or promote regeneration by the secretion of bioactive factors and they also exhibit strong immunomodulatory potential. The administration of MSCs in diabetic mice/rats promoted delayed onset of experimental diabetes, significant reduction in blood glucose levels, insulin levels augment, reduction of inflammatory process and expansion of regulatory T cells. The phenotypical and functional characteristics of MSCs derived from patients with different autoimmune diseases have been assessed in the past years. However little is known about the properties of MSCs derived from patients with T1D and the elucidation whether these MSCs are phenotypically and/or functionally abnormal is an important question to address in autologous transplantation setting. In this present study we evaluated the *in vitro* properties and the *in vivo* efficacy in chemically-induced diabetes of MSCs isolated from T1D patients and compared them to MSCs from healthy donors. MSCs isolated from patients with newly diagnosed T1D and MSCs from age and sex-matched healthy individuals were similar in morphology, immunophenotypic characteristics, adipocyte differentiation potential and *in vitro* immunosuppression capacity. T1D-MSCs and C-MSCs were able to promote hyperglycemia reversion, improve beta cells mass and modulate pancreatic cytokine production after administration in diabetic mice. Our results may provide support for the use of autologous MSCs in patients with T1D.

1. INTRODUCTION

Millions of people worldwide are affected by type 1 diabetes (T1D) and its short or long-term complications are implicated in high health care and social costs (World Health Organization; (Daneman, 2006). T1D is characterized by an autoimmune response in which cellular immunity plays a pivotal role in the selective destruction of insulin-producing pancreatic beta (β) cells, thus leading to impairment in glucose metabolism. At the time of clinical diagnosis, 80-95% of pancreatic β cells were destroyed (Klinke, 2008).

Human pancreas and pancreatic islet transplantation provide a promising treatment for T1D; however, the lack of sufficient donors, high costs, and long-term immunosuppression of the recipients limit the widespread use of this approach. The use of immunosuppressants to reverse diabetes has received much attention, but the shortfall of monotherapy and serious morbidity from lifelong immunosuppression has prompted investigators to search for alternative approaches (Ricordi and Strom, 2004; Bassi *et al.*, 2012). Hematopoietic stem cells have been shown to have immunomodulatory potential, and the transplantation of these cells after immunosuppression in newly diagnosed T1D patients has been shown to increase C-peptide levels (Voltarelli *et al.*, 2007; Couri *et al.*, 2009). The regeneration of the endocrine pancreatic tissue has been the focus of T1D therapeutic strategies under development. Investigators have begun to use mesenchymal stromal cells (MSCs) much more quickly than other cell-based therapies in a variety of human diseases (Atkinson and Eisenbarth, 2001; Fiorina *et al.*, 2009).

MSCs are multipotent mesenchymal precursors present in several tissues, such as bone marrow, adipose tissue, fetal tissues, and others. These cells have the ability to differentiate in different cell types from connective tissue, provide cytokines and growth factors to support the process of hematopoiesis (Pittenger *et al.*, 1999). MSCs express different non-specific surface molecules, including CD90, CD73, CD105, CD29, CD44, CD166 and do not express endothelial or hematopoietic markers (CD31, CD45, CD43, CD14, CD11b) neither MHC class II molecule and co-stimulatory proteins (CD80, CD86, CD40) (Le Blanc *et al.*, 2003; Le Blanc and Ringdén, 2005). MSCs migrate to injured tissues and either differentiate or promote regeneration by the secretion of bioactive factors (Horwitz and Dominici, 2008). They also exhibit strong

immunomodulatory potential, modulating the function of T and B lymphocytes, dendritic cells, NK cells and regulatory T cells. The cell-to-cell contact and the production of immunomodulatory soluble factor (TGF- β , indoleamine 2,3-dioxygenase, prostaglandin E₂, IL-10, HGF) are involved in this process. Taking their biological properties into account, MSCs have been in the focus of research on cell-based therapies in the last few years and have a high potential for cell therapy to inflammatory and autoimmune diseases (Uccelli *et al.*, 2006).

MSCs have been used extensively to treat experimental T1D. The administration of MSCs in diabetic mice promoted delayed onset of experimental type 1 diabetes, significant reduction in blood glucose levels, insulin levels augment, reduction of inflammatory process and regulatory T cells expansion (Ezquer *et al.*, 2008; Boumaza *et al.*, 2009; Fiorina *et al.*, 2009; Madec *et al.*, 2009; Jurewicz *et al.*, 2010; Bassi *et al.*, 2012; Ezquer *et al.*, 2012). Based on these promissory results obtained using MSCs in experimental models of T1D, there are currently some clinical trials been performed worldwide in order to test the safety and therapeutic potential of MSCs in diabetic patients. It is important to note, that the most of these trials aim to use MSCs from healthy individuals (allogeneic) and does not accurately simulate autologous transplantation in patients with T1D. It is still unclear whether the biological properties of MSCs derived from patients with autoimmune diseases are similar to those from healthy donors or are somehow compromised (Kassis *et al.*, 2013).

The phenotypical and functional characteristics of MSCs derived from patients with different autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), systemic sclerosis (SS) and multiple sclerosis (MS) have been assessed in the past years (Mallam *et al.*, 2010). MSCs from SS patients exhibited proliferation rate, differentiation potential, *in vitro* T lymphocytes inhibition similar to MSCs from healthy donors (Bocelli-Tyndall *et al.*, 2007; Larghero *et al.*, 2008). The autologous MSCs administration in SLE patients was safety, promoted expansion of regulatory T cells, but did not change disease clinical score (Carrion *et al.*, 2010). On the other hand, MSCs from other autoimmune disease patients have defects in various critical functions including: hematopoiesis impairment and increased production of TNF- α by MSCs from patients with RA (Papadaki *et al.*, 2002; Kastrinaki *et al.*, 2008; Dudics *et al.*, 2009); defective immunomodulatory properties in MSCs from MS (Mazzanti *et al.*, 2008; De Oliveira *et al.*, 2013; Kassis *et al.*, 2013). These problems

might be due to disease-related cellular and biochemical changes in the bone marrow microenvironment.

However little is known about the properties of MSCs derived from patients with T1D and the elucidation whether these MSCs are phenotypically and/or functionally abnormal is an important question to address in autologous transplantation setting. Thereby, the purpose of the present study was to evaluate the *in vitro* properties and the *in vivo* efficacy in chemically-induced diabetes of MSCs isolated from T1D patients and compare them to MSCs from healthy donors.

2. MATERIALS AND METHODS

Subjects

After pre-informed consent, bone marrow samples were obtained from the iliac crest of newly diagnosed T1D patients and healthy donors. T1D patients (male, 23.2 ± 2.9 years) enrolled in this study were diagnosed in the previous 6 weeks confirmed by serum levels measurement of anti-glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) antibodies, without previous episodes of diabetic ketoacidosis. The healthy subjects (male, 33.1 ± 4.9 years), voluntarily donated bone marrow samples for research. All procedures were approved by the Ethics Committee of the University Hospital (School of Medicine of Ribeirão Preto), at the University of São Paulo (# 10095/02).

MSCs from healthy donors and T1D patients

Bone marrow aspirate samples were collected in presence of EDTA, and mononuclear cells were separated using Ficoll-Hypaque (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Sweden) gradient density. Subsequently, mononuclear cell layer was harvested and washed twice in PBS. The cells were centrifuged and re-suspended in alpha-Minimum Essential Medium (α-MEM, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) medium supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS - Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), 100 µg/ml penicillin (Gibco), 100 µg/ml streptomycin (Gibco) and 2 mM L-glutamine (Gibco). After, the cells were seeded in 75 cm² flasks and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 7 days, nonadherent cells were removed by replacing the medium and fresh medium was added twice a week.

When the layer was confluent, cells were detached using trypsin (Gibco) and then subcultured until third/fourth passages.

MSCs morphology

MSCs were expanded from bone marrow samples of healthy donors (C-MSCs) or T1D patients (T1D-MSCs), cultured until third/fourth passage and observed in phase contrast light microscopy. Subsequently, MSCs were stained with Leishman and observed in light microscopy (Carl Zeiss, Germany). MSCs size (diameter) was determined using ViCell XR (Beckman Coulter) equipment.

MSCs immunophenotypic profile

Trypsinised C-MSCs and T1D-MSCs from passages 3-4 were incubated with anti-: CD45, CD14, CD29, CD51/61, CD44, CD90, CD105, CD54, CD73, CD106, CD34, HLA-CLASS I (HLA-A/B/C), HLA- CLASS II (HLA-DRB1), CD166, CD49e, CD13, STRO-1 and KDR monoclonal antibodies (Becton-Dickinson/BD, San Jose, CA, USA) for 30 minutes in the dark. Immunofluorescence analysis was performed using FACSsort (BD) equipment and 20,000 cells were acquired and analyzed by the Cellquest software (BD).

Adipocyte differentiation potential

In vitro adipogenic differentiation of C-MSCs and T1D-MSCs was induced using α -MEM medium supplemented with 15% fetal bovine serum, 100 mM dexamethasone (Prodome, Campinas, SP, Brazil), 10 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and 100 μ M indomethacin (Sigma-Aldrich). Culture medium was changed every three days for 21 days. MSCs were then fixed with ethanol (70%) and stained with Sudan II-Escarlate and Harris hematoxylin. The presence of lipid vacuoles was observed using light microscopy.

In vitro migration assay

In vitro migration was assayed by transwell chamber (BD, Franklin Lakes, NJ) with 8 μ m porosity PET (polyethylene terephthalate) membrane. C-MSCs and T1D-MSCs were trypsinised and seeded in the upper layers of membranes with 100 μ L of α -MEM medium without FBS. The chamber was inserted into each well of a 24-well plate filled with 600 μ L of α -MEM supplemented with 50 % FBS. The MSCs in the chamber

were incubated for 6 hours at 37°C, and the cells which went through the pore membrane to the underside of the filter were counterstained by Giemsa. Non-migrated cells were scraped off the upper surface of the membrane with a cotton swab. For each membrane, the number of MSCs was counted in seven fields using light microscopy.

Coculture assay

To test the inhibitory effect of MSCs isolated from T1D patients and MSCs from healthy controls on allogeneic lymphocyte proliferation, the carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE - Invitrogen, LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) dilution method was used and proliferation percentages were assessed by flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from healthy donors, were separated by density gradient, labeled with CFSE (10 μ M, for 10 minutes, 37°C) and resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 5% human serum albumin (Vialebex® 200 mg/ml, LFB, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). CFSE labeled-PBMCs were added to the wells containing previously adhered patient or control MSCs, in six different dilutions (MSCs: PBMCs = 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 and 1:100) in presence of 0.5 μ g/mL of phytohemagglutinin (PHA- Sigma-Aldrich). The cocultures were incubated for 5 days at 37°C with 5% CO₂. Subsequently, PBMCs were harvested, stained with anti-CD3 (BD) antibody and analyzed by flow cytometry.

Induction of Experimental Diabetes and Blood Glucose Monitoring

C57BL/6 male mice, at 10 weeks of age were injected intraperitoneally with 40 mg/kg of STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for five consecutive days. STZ was diluted in sodium citrate buffer, pH 4.5, and injected in animals within 15 minutes of the preparation. Blood samples were taken from the tail vein of non-fasted mice, and glucose levels determined with a glucometer system Accu-Chek Go (Roche Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). Mice were considered diabetic when glycemia was above 250 mg/dl after two consecutive determinations. All animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the School of Medicine of Ribeirão Preto, at the University of São Paulo (# 157/2010; # 021/2013-01).

MSCs intraesplenic transplantation

Different routes of MSCs administration in diabetic mice were tested and the intrasplenic route was the most efficient to promote reversion of hyperglycemia (*data not shown, manuscript in preparation*). For intrasplenic injections of MSCs, mice were anaesthetized with a mixture of ketamine (Ketamina-Agener União, Brasil) and xylazine (Dopaser-Hertape Calier, Minas Gerais, Brasil). Skin and peritoneum incisions were made, the spleen was exposed and the MSCs were microinjected (70 µL final volume) into the spleen. The bleeding was controlled using a cotton swab and local application of fibrin sealant. The incisions were sutured using a 5-0 nylon monofilament (Bioline Fios Cirúrgicos Ltda, Goiás, Brasil). Intraperitoneal administration of 30 mg/kg of tramadol hydrochloride (Tramal, Medley, Campinas, Brasil) was used as a pain reliever every 12 hours for three consecutive days.

A single dose of 1×10^6 T1D-MSCs or C-MSCs were injected in diabetic mice 20 days after the last dose of STZ. The control group received only intrasplenic injection of PBS. Non-fasting glucose was frequently monitored using glucometer system Accu-Chek Go (Roche). Mice were killed 35 days after MSCs or PBS injection and the pancreas, spleen, pancreatic lymph nodes and blood were collected.

Glucose tolerance test

The peripheral response to glucose was evaluated by the intraperitoneal glucose tolerance test 30 days after C-MSCs or T1D-MSCs injection. Glucose solution (1.5 mg/g body weight) was administrated intraperitoneally in 10 hours fasting mice, and blood glucose levels were determined before and 15, 30, 60 and 180 minutes after glucose administration.

Histology and Immunohistochemistry

Pancreata were removed and fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin and the sections (5 µm) stained with hematoxylin-eosin (H&E). Immunohistochemistry reactions were performed on sections (5 µm) of formalin-fixed tissue. The sections were dewaxed, rehydrated, and incubated with Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO Cytomation, Fort Collins, CO) to block endogenous peroxidase. Then, the slides were incubated with PBS+BSA 1% to prevent unspecific staining. Next, rabbit monoclonal anti-mouse insulin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or rabbit anti-mouse Ki-67 antibody (Abcam, Cambridge, UK) were applied to the

sections, followed by incubation with LSAB™+ Kit/HRP (DAKO Cytomation, Fort Collins, CO). The slides were stained with diaminobenzidine (DAB) according to the manufacturer's instructions (DAKO Cytomation, Fort Collins, CO). Finally, the sections were counterstained with Harris hematoxylin and analyzed by light microscopy.

Isolation of cells from spleen and pancreatic lymph nodes

The spleen was placed into a Petri dish and mashed using the plunger end of the syringe. Cell suspension was collected and erythrocyte lysis was performed using Tris 0.17M e NH₄Cl 0.16M buffer. RPMI 1640 medium (Gibco), supplemented with 10% FBS, 2 mmol/l L-glutamine (Gibco) and 100 U/ml penicillin and streptomycin (Gibco) was added to the tube containing splenocytes and centrifuged at 300 g for 10 minutes at 4° C. Then, the supernatant was discarded and the pellet resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco). Pancreatic draining lymph nodes (PLN) were collected and placed in the cell strainer. Using the plunger end of the syringe, pancreatic lymph nodes were mashed through the cell strainer into the Petri dish containing RPMI 1640 medium (Gibco). Then, cell suspension was collected and centrifuged 300 g for 10 minutes at 4° C.

Flow cytometry analysis of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population

First, cell suspension (splenocytes or PLN cells) was incubated with 100 µL of rabbit normal serum 5% for 30 minutes to block unspecific binding. Next, fluorochrome-conjugated primary antibodies for CD4, CD25 and their control isotypes (BD) were added and incubated for 30 minutes in the dark. All monoclonal antibodies were used at concentrations recommended by the manufacturer. After extracellular antigen staining, cells were incubated with FACS Lysing solution (BD) for 10 minutes in the dark. Then, they were washed and resuspended in FACS Permeabilizing solution (BD) for 10 minutes. Next, the expression of the transcription factor Foxp3 was assessed by incubating with PE-conjugated anti-mouse Foxp3 monoclonal antibody (BD). Cell suspension was washed, resuspended and analyzed using a FACS Calibur flow cytometer (BD). Data were obtained for 100,000 events/sample (spleen) or 50,000 events/sample (PLN) using Cell Quest Pro software (BD).

Quantification of cytokine levels in serum and pancreatic tissue

Pieces of pancreas were removed, weighted and placed into a tube containing 700 µL of Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). Pancreatic tissue was homogenized using a Polytron homogenizer (Kinematica, Luzern, Switzerland) and IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 levels were detected by cytometric bead array (CBA, Th1/Th2/Th17 kit - BD) method, according to the manufacturer's instructions. The concentration of TGF- β in pancreatic tissue was determined using Human/Mouse TGF- β 1 ELISA Ready-Set-Go kit (eBioscience, San Diego, CA). Serum cytokine levels were also determined by CBA method.

Quantification of serum insulin level

The serum insulin concentration was determined using the Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA kit (Alpco Diagnostics, Salem, USA).

Statistical Analysis

Data are present as mean $\pm$ SD. Statistical comparisons were made by unpaired/paired *t*-tests or by one-way ANOVA with Tukey post-test. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

3.1. T1D-MSCs Morphology and cell size

MSCs isolated from bone marrow of healthy donors (C-MSCs; **Figure 1A**) and MSCs from T1D patients (T1D MSCs; **Figure 1B**) appeared as typical monolayer of spindle-shaped fibroblast-like cells and presented ability to adhere to plastic during *in vitro* expansion. At the third/fourth passages, T1D-MSCs were morphologically similar to C-MSCs. The cell size (diameter) was similar: 15.35 ± 0.71 µm C-MSC *versus* 15.32 ± 0.56 µm T1D-MSC (**Figure 2**).

3.2 Immunophenotypical profile of T1D-MSCs

T1D-MSCs and C-MSCs displayed similar expression of CD73, CD90, CD105, CD29, CD13, CD44 e CD49e, CD54, HLA- I, CD166, CD106 e STRO-1, CD45, CD14, CD34, HLA- II, CD51/61 and KDR in their cell surface (**Figure 3**).

3.3 Adipocyte differentiation

T1D-MSCs and C-MSCs were cultured for 21 days with specific medium to induce adipogenesis. T1D-MSCs and C-MSCs were able to differentiate towards the adipogenic lineage and lipid vesicles were detected in the cytoplasm of both cells by Sudan II-Escalate staining (**Figure 4**).

3.4 In vitro migration

The fraction of cells that migrated across 8 μ m diameter pores over 6 hours was determined by counting stained cells on transwell filters after scraping off non-migrated cells on the upper filter surface (**Figure 5A**). There was remarkably impaired migration of C-MSCs compared with T1D-MSCs (385.8 ± 61.02 versus 789.1 ± 106.8 migrated cells, respectively, $P < 0.006$) towards 50% FBS (**Figure 5B**). Differences in cell size cannot account for the differences observed in migration (**Figure 2**).

3.5 In vivo immunosuppression

The immunosuppressive capacity of T1D-MSCs and C-MSCs was evaluated in cocultures with activated human peripheral blood mononuclear cells. Both MSCs were able to efficiently suppress the proliferation of lymphocytes in a dose-dependent manner. They suppressed efficiently the lymphocytes in the following concentrations (MSCs:lymphocytes): 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20. Similar values of anti-proliferative activity were observed between T1D-MSCs and C-MSCs in all experimental conditions (**Figure 6**).

3.6 Intrasplenic administration of T1D-MSCs in STZ-induced diabetic mice

The therapeutic potential of T1D-MSCs was evaluated in diabetic mice 20 days after the last dose of STZ. 1×10^6 cells (T1D-MSCs or C-MSCs) were directly injected into the spleen and blood glucose levels were periodically monitored. The diabetic control group received only intrasplenic injection of PBS. The administration of T1D-MSCs or C-MSCs equally reversed the hyperglycemia in 67% of transplanted mice. The

blood glucose levels of T1D-MSCs or C-MSCs-treated mice were significantly lower compared with Control group (PBS-treated mice) during the follow-up period (**Figure 7A**). The area under the glycemia curve (AUC) of C-MSCs-treated group (7183.11 ± 839.11) was similar to AUC of T1D-MSCs-treated group (6568.33 ± 604.96). On the other hand, these AUCs were significantly lower than Control group AUC (11728.17 ± 2805.10 ; $P=0.0002$; **Figure 7B**). The fasting glycemia of C-MSCs-treated group (141.8 ± 9.08 mg/dL) and T1D-MSCs-treated group (147.1 ± 17.53 mg/dL) were lower compared with Control group (283.8 ± 29.50 mg/dL, $P<0.0001$, **Figure 7C**).

The fasting glycemia of T1D-MSCs (147.1 ± 17.53 mg/dL) and C-MSCs (141.8 ± 9.08 mg/dL) -treated mice were significantly lower compared with Control group (283.8 ± 29.50 mg/dL; $P<0.0001$; **Figure 7C**). Interestingly, 100% of T1D-MSCs and C-MSCs-treated mice exhibited fasting glucose levels lower than 250 mg/dL.

The glycemia of C-MSCs-treated group was significantly lower after cells administration (202.33 ± 32.11 mg/dL) compared with the glycemia before the treatment (315.41 ± 33.96 mg/dL; $P=0.0001$; **Figure 8A**). The same decrease in blood glucose levels was observed in T1D-MSCs-treated group (before MSCs: 312 ± 33.84 mg/dL; after MSCs: 212.66 ± 31.25 mg/dL ; $P=0.0004$; **Figure 8B**).

3.7 Improvement of the peripheral response to glucose after treatment with T1D-MSCs

To evaluate the peripheral response to glucose, the glucose tolerance test (GTT) was performed after MSCs treatment. The treatment with T1D-MSCs or C-MSCs mice improved the response to intraperitoneal glucose administration compared with Control group (**Figure 9A**), and significant differences were observed when comparing the AUC of GTT of T1D-MSCs (51740.33 ± 5005.53) and C-MSCs (45880.17 ± 8219.11) treated-mice to the Control group (78152.67 ± 6979.88 ; $P<0.0001$; **Figure 9B**).

The concentration of serum insulin was higher in T1D-MSCs treated mice (0.82 ± 0.09 ng/mL; $P<0.007$) and C-MSCs treated mice (0.81 ± 0.12 ng/mL; $P<0.02$) compared with Control group (0.39 ± 0.05 ng/mL) 35 days after MSCs or PBS administration (**Figure 9C**).

3.8 T1D-MSCs treatment does not change the regulatory T cells population

To evaluate the hypothesis that the therapeutic effect of T1D-MSCs or C-MSCs treatments could be associated with the induction/expansion of regulatory T cells, the frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in the spleen and pancreatic lymph nodes (PLN) was analyzed. The frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in the spleen and PLN were similar in T1D-MSCs group ($2.27 \pm 0.18\%$ and 0.51 ± 0.21), C-MSCs group ($2.28 \pm 0.30\%$ and $0.43 \pm 0.24\%$) and Control group ($2.07 \pm 0.19\%$ and $0.51 \pm 0.21\%$), respectively (**Figure 10**).

3.9 T1D-MSCs treatment modulates cytokines production in pancreatic microenvironment

The levels of IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-4 e IL-10 in the serum (**Figure 11**) and pancreatic tissue homogenate (**Figure 12**) were determined. A significant reduction of IL-2 and IFN- γ was observed in the pancreas of MSCs treated-mice (T1D-MSCs group: 90.20 ± 55.86 pg/g and 3.92 ± 3.60 pg/g; C-MSCs group: 96.72 ± 46.36 pg/g and 6.09 ± 5.25 pg/g; Control group: 161.96 ± 47.22 pg/g and 18.60 ± 8.22 pg/g; $P < 0.05$). The levels of IL-4 was diminished in T1D-MSCs- treated group (24.24 ± 8.58 pg/g) compared with Control group (53.61 ± 24.05 pg/g; $P = 0.02$). It was not observed significant differences in the cytokines levels measured in the serum of different experimental groups.

3.10 T1D-MSCs treatment decreases pancreatic inflammation improving pancreatic beta cell mass

In the pancreatic islets of untreated diabetic mice (Control group), an inflammatory process (insulinitis) was observed. On the other hand, C-MSCs and T1D-MSCs-treated mice did not exhibited inflammatory cells into the islets. Moreover, pancreatic islets from MSCs-treated mice were bigger than those observed in the Control group (**Figure 13**).

It was also investigated whether MSCs therapy could promote the maintenance of residual or newly-formed beta cells evaluating the expression of insulin in pancreatic islets. The islets from T1D-MSCs-treated mice showed a higher expression of insulin compared with the Control group and were similar to the C-MSCs-treated group (**Figure 14**). The rate of pancreatic cell proliferation (Ki-67 positive cells) was similar in all experimental groups (**Figure 15**).

4. DISCUSSION

Bone marrow MSCs have been considered as an important source for cell therapy in several pathological conditions, including inflammatory and autoimmune diseases, particularly due to their immunomodulatory properties. The ability of MSCs to suppress the immune response suggests a possible role of these cells in tolerance induction in patients with autoimmune diseases, and supports the rationale for MSC application in the treatment of T1D. MSCs were found to delay diabetes onset, to revert hyperglycemia and to induce expansion of regulatory T cell in different experimental models of diabetes (Lee *et al.*, 2006; Boumaza *et al.*, 2009; Madec *et al.*, 2009; Jurewicz *et al.*, 2010; Bassi *et al.*, 2012; Ezquer *et al.*, 2012). However, it is until unclear whether the properties (phenotypical and functional) of MSCs isolated from bone marrow of patients with T1D are normal or somehow defective.

The MSCs isolated from T1D patients exhibited typical morphology and similar cell size compared with C-MSCs. Similarly, MSCs obtained from multiple sclerosis (Mazzanti *et al.*, 2008; Mallam *et al.*, 2010), rheumatoid arthritis (Dudics *et al.*, 2009), sistemic sclerosis (Cipriani *et al.*, 2007; Larghero *et al.*, 2008; Guiducci *et al.*, 2011) and Crohn disease (Duijvestein *et al.*, 2010) patients did not present morphological alterations compared with healthy counterparts. On the other hand, MSCs isolated from patients with immune thrombocytopenic purpura (Pérez-Simón *et al.*, 2009) or systemic erythematosus lupus (Nie *et al.*, 2010) exhibited atypical morphology.

It was not observed differences in the frequency of CD45, CD14, CD29, CD51/61, CD44, CD90, CD105, CD54, CD73, CD106, CD34, HLA-CLASSE I (HLA-A/B/C), HLA- CLASSE II (HLA-DRB1), CD166, CD49e, CD13, STRO-1 and KDR positive T1D-MSCs compared with C-MSCs. Both MSCs were able to differentiated towards adipocyte lineage. MSCs from patients with multiple sclerosis (Mazzanti *et al.*, 2008; Mallam *et al.*, 2010), systemic sclerosis (Cipriani *et al.*, 2007; Larghero *et al.*, 2008; Guiducci *et al.*, 2011), systemic erythematosus lupus (Nie *et al.*, 2010) or immune thrombocytopenic purpura (Pérez-Simón *et al.*, 2009) presented similar immunophenotypic profile and differentiation capacity compared with MSCs from healthy individuals.

In our study, both patient and healthy donor MSCs inhibited lymphocyte proliferation in a dose-dependent manner. The antiproliferative effect was similar

comparing T1D-MSCs with C-MSCs. Similarly to the present results, MSCs isolated from patients with juvenile idiopathic arthritis (Calkoen *et al.*, 2013), Crohn's disease (Duijvestein *et al.*, 2010), systemic sclerosis (Larghero *et al.*, 2008) or systemic erythematosus lupus (Carrion *et al.*, 2010; Nie *et al.*, 2010) exhibited preserved immunosuppressive capacity. On the other hand, de Oliveira and colleagues observed that MSCs from healthy donor exhibited a better antiproliferative effect (70% inhibition) compared with MSCs from multiple sclerosis patients (50% inhibition) (De Oliveira *et al.*, 2013).

The therapeutic potential of T1D-MSCs was tested in experimental model of STZ-induced diabetes. The administration of T1D1-MSCs or C-MSCs promoted diabetes reversion in 67% of treated-mice, improved beta cell mass and glucose tolerance. No differences in the results between the treatment with T1D1-MSCs or C-MSCs were observed. Thus, it may suggest that MSCs from T1D patients does not exhibit functional abnormalities. Dong and colleagues showed that the transplantation of MSCs isolated from diabetic rats decreased blood glucose levels and avoided body weight loss in diabetic rats. The authors suggest that diabetes does not influence MSCs properties allowing the autologous transplantation of MSCs in T1D setting (Dong *et al.*, 2008). Conversely, Fiorina and colleagues reported that MSCs isolated from NOD mice were unable to delay the onset of diabetes when administered in prediabetic NOD mice and did not reverse hyperglycemia in diabetic mice. The authors also noted soft tissue and visceral tumors in NOD MSCs-treated mice, which were not observed in Balb/c MSCs-treated mice. The authors suggested that the transplantation of MSCs obtained from nondiabetic donors is the best option for the treatment of T1D patients instead of autologous MSCs (Fiorina *et al.*, 2009).

Studies have demonstrated the role of MSCs on *in vivo/in vitro* induction and proliferation of regulatory T cells (Casiraghi *et al.*, 2008; Gonzalez-Rey *et al.*, 2010; Luz-Crawford *et al.*, 2013). The intrasplenic administration of T1D-MSCs or C-MSCs did not change the frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in spleen and PLN of diabetic treated-mice 35 days after MSCs therapy. Madec and colleagues observed an increase in CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells 5 days after the MSCs administration in diabetic NOD mice (Madec *et al.*, 2009). The increased frequency of regulatory T cells after MSCs transplantation was also observed in STZ-induced experimental model (Boumaza *et al.*, 2009; Ezquer *et al.*, 2012). Jurewicz and colleagues reported increased levels of IL-10 at day 7 after MSCs injection in NOD

mice. However, this augment was not detected at days 14 and 21 after cell therapy. The frequency of regulatory T cells did not change after MSCs administration in PLN from treated-NOD mice (Jurewicz *et al.*, 2010). Similarly, Fiorina and colleagues did not observe significant differences in Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ in spleen and PLN from NOD-treated mice 28 days after MSCs administration (Fiorina *et al.*, 2009). In our study, the diabetes recovery promoted by the administration of T1D-MSCs or C-MSCs could not be related to a possible expansion of regulatory T cells population and other mechanisms are responsible for the therapeutic response.

The levels of IL-2 and IFN- γ were lower in the pancreas of T1D-MSCs or C-MSCs –treated mice 35 days after MSCs administration. Moreover, a marginal but not substantial decrease in the levels of IL-6, TNF- α and IL-17 in the pancreatic tissue was observed after MSCs administration. Similarly, the MSCs therapy decreased the levels of pancreatic IFN- γ (Bassi *et al.*, 2012) in NOD-treated mice. Ezquer and colleagues observed that MSCs therapy induced a cytokine profile shift from proinflammatory (IL-2, IFN- γ e TNF- α) to antiinflammatory (IL-13) in diabetic-treated mice (Ezquer *et al.*, 2012). The decrease of proinflammatory cytokines observed in our study and by others, may represent a possible mechanism by which MSCs promote reversion of hyperglycemia in diabetic-treated mice. The reduction of inflammation in the pancreatic islets may allow the preservation of residual and/or newly formed beta cells.

Our study provides no evidence for any significant difference in phenotype or functional capacity between MSCs from patients with T1D and those from healthy donors. Thus, MSCs obtained from T1D patients could be used in the autologous transplantation setting.

5. CONCLUSIONS

MSCs isolated from patients with newly diagnosed T1D and MSCs from age and sex-matched healthy individuals were similar in morphology, immunophenotypic characteristics, adipocyte differentiation potential and *in vitro* immunosuppression capacity. T1D-MSCs and C-MSCs were able to promote hyperglycemia reversion, improve beta cells mass and modulate pancreatic cytokine production after administration in diabetic mice. The present results may provide support for the use of autologous MSCs in patients with T1D.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank and honor the memory of Professor Júlio César Voltarelli, mastermind of our stem cell transplantation studies for autoimmune disorders. We are grateful to Fabiana Rosseto de Moraes for assistance with CBA assays, Patrícia Vianna Bonini for flow cytometry analysis and the staff of School of Medicine of Ribeirão Preto Animal Facility for mice supply. This study was financial supported by FAPESP (São Paulo Research Foundation, grants #2010/11759-0), CAPES and CNPq.

7. REFERENCES

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 221-9, Jul 2001. ISSN 0140-6736. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476858> >.

BASSI, Ê. et al. Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. **Diabetes**, v. 61, n. 10, p. 2534-45, Oct 2012. ISSN 1939-327X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688334> >.

BOCELLI-TYNDALL, C. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, n. 3, p. 403-8, Mar 2007. ISSN 1462-0324. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920750> >.

BOUMAZA, I. et al. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. **J Autoimmun**, v. 32, n. 1, p. 33-42, Feb 2009. ISSN 0896-8411. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19062254> >.

CALKOEN, F. G. et al. Mesenchymal stromal cells isolated from children with systemic juvenile idiopathic arthritis suppress innate and adaptive immune responses. **Cytotherapy**, v. 15, n. 3, p. 280-91, Mar 2013. ISSN 1477-2566. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23312448> >.

CARRION, F. et al. Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 19, n. 3, p. 317-22, Mar 2010. ISSN 1477-0962. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919974> >.

CASIRAGHI, F. et al. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. **J Immunol**, v. 181, n. 6, p. 3933-46, Sep 2008. ISSN 1550-6606. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768848> >.

CIPRIANI, P. et al. Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 6, p. 1994-2004, Jun 2007. ISSN 0004-3591. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17530639> >.

COURI, C. E. et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 301, n. 15, p. 1573-9, Apr 2009. ISSN 1538-3598. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366777> >.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847-58, Mar 2006. ISSN 1474-547X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530579> >.

DE OLIVEIRA, G. L. et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells isolated from multiple sclerosis patients have distinct gene expression profile and decreased suppressive function compared with healthy counterparts. **Cell Transplant**, Nov 2013. ISSN 1555-3892. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24256874> >.

DONG, Q. Y. et al. Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. **Clin Invest Med**, v. 31, n. 6, p. E328-37, 2008. ISSN 1488-2353. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19032902> >.

DUDICS, V. et al. Chondrogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: measurements in a microculture system. **Cells Tissues Organs**, v. 189, n. 5, p. 307-16, 2009. ISSN 1422-6421. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562787> >.

DUIJVESTIJN, M. et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. **Gut**, v. 59, n. 12, p. 1662-9, Dec 2010. ISSN 1468-3288. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921206> >.

EZQUER, F. et al. The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment. **Stem Cells**, v. 30, n. 8, p. 1664-74, Aug 2012. ISSN 1549-4918. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22644660> >.

EZQUER, F. E. et al. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 14, n. 6, p. 631-40, Jun 2008. ISSN 1523-6536. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18489988> >.

FIORINA, P. et al. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 993-1004, Jul 2009. ISSN 1550-6606. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561093> >.

GONZALEZ-REY, E. et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 1, p. 241-8, Jan 2010. ISSN 1468-2060. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124525> >.

GUIDUCCI, S. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells from early diffuse systemic sclerosis exhibit a paracrine machinery and stimulate angiogenesis in vitro. **Ann Rheum Dis**, v. 70, n. 11, p. 2011-21, Nov 2011. ISSN 1468-2060. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821866> >.

HORWITZ, E. M.; DOMINICI, M. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? **Cytotherapy**, v. 10, n. 8, p. 771-4, 2008. ISSN 1477-2566. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089685> >.

JUREWICZ, M. et al. Congenic mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 12, p. 3139-47, Dec 2010. ISSN 1939-327X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20841611> >.

KASSIS, I. et al. Mesenchymal stem cells (MSC) derived from mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) suppress EAE and have similar biological properties with MSC from healthy donors. **Immunol Lett**, v. 154, n. 1-2, p. 70-6, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1879-0542. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994102> >.

KASTRINAKI, M. C. et al. Functional, molecular and proteomic characterisation of bone marrow mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 6, p. 741-9, Jun 2008. ISSN 1468-2060. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17921184> >.

KLINKE, D. J. Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 3, n. 1, p. e1374, 2008. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167535> >.

LARGHERO, J. et al. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. **Ann Rheum Dis**, v. 67, n. 4, p. 443-9, Apr 2008. ISSN 1468-2060. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17526552> >.

LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 11, n. 5, p. 321-34, May 2005. ISSN 1083-8791. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15846285> >.

LE BLANC, K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Exp Hematol**, v. 31, n. 10, p. 890-6, Oct 2003. ISSN 0301-472X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550804> >.

LEE, R. H. et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 46, p. 17438-43, Nov 2006. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088535> >.

LUZ-CRAWFORD, P. et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. **Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 3, p. 65, Jun 2013. ISSN 1757-6512. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23734780> >.

MADEC, A. M. et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1391-9, Jul 2009. ISSN 1432-0428. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19421731> >.

MALLAM, E. et al. Characterization of in vitro expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with multiple sclerosis. **Mult Scler**, v. 16, n. 8, p. 909-18, Aug 2010. ISSN 1477-0970. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542920> >.

MAZZANTI, B. et al. Differences in mesenchymal stem cell cytokine profiles between MS patients and healthy donors: implication for assessment of disease activity and treatment. **J Neuroimmunol**, v. 199, n. 1-2, p. 142-50, Aug 2008. ISSN 0165-5728. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18562015> >.

NIE, Y. et al. Defective phenotype of mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 19, n. 7, p. 850-9, Jun 2010. ISSN 1477-0962. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511276> >.

PAPADAKI, H. A. et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect. **Blood**, v. 99, n. 5, p. 1610-9, Mar 2002. ISSN 0006-4971. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861275> >.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 1999. ISSN 0036-8075. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814> >.

PÉREZ-SIMÓN, J. A. et al. Mesenchymal stem cells are functionally abnormal in patients with immune thrombocytopenic purpura. **Cytotherapy**, v. 11, n. 6, p. 698-705, 2009. ISSN 1477-2566. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878056> >.

RICORDI, C.; STROM, T. B. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 4, p. 259-68, Apr 2004. ISSN 1474-1733. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057784> >.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 10, p. 2566-73, Oct 2006. ISSN 0014-2980. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013987> >.

VOLTARELLI, J. C. et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 297, n. 14, p. 1568-76, Apr 2007. ISSN 1538-3598. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17426276> >.

8. FIGURES

Figure 1. Morphological characterization of mesenchymal stromal cells from healthy individuals and T1D patients. At the third/fourth passages, MSCs isolated from healthy individuals (A:C-MSCs) and newly diagnosed type 1 diabetes patients (B: T1D-MSCs) showed homogeneous spindle-shaped fibroblast-like growth.

Figure 2. T1D-MSCs and C-MSCs size. At the third/fourth passages, the diameter of T1D-MSCs and C-MSCs in suspension was determined by ViCell XR equipment. Bars represent means $\pm$ SD.

Figure 3. Expression of typical surface immunophenotypic markers. The graph displays the phenotype of MSCs in culture at third /fourth passages, derived from T1D patients (T1D-MSC) and healthy donors (C-MSCs). Results are expressed as the percentage of cells ($\pm$ SD) expressing the phenotypic cellular markers CD45, CD14, CD29, CD51/61, CD44, CD90, CD105, CD54, CD73, CD106, CD34, HLA-CLASSE I (HLA-A/B/C), HLA- CLASSE II (HLA-DRB1), CD166, CD49e, CD13, STRO-1 and KDR. MSCs from T1D patients were phenotypically similar to MSCs from healthy donors. Bars represent means $\pm$ SD.

Figure 4. Adipocyte differentiation. (A) C-MSCs and (B) T1D-MSCs were able to differentiate towards the adipogenic lineage. The presence of lipid vacuoles in the cytoplasm was identified by Sudan II-Escarlate staining.

Figure 5. *In vitro* migration. Representative images (left) of transwell migration assay using 50% FBS as chemoattractant, showing MSCs from healthy individuals (C-MSCs) and MSCs from T1D patients (T1D-MSCs). Cells were stained with Giensa. The fraction of cells that migrated across 8 µm diameter pores over 6 hours was determined by counting. Bars represent means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

Figure 6. Effects of MSCs from T1D patients on *in vitro* T-cell proliferation. In co-culture assays different concentrations of PHA-stimulated PBMCs (CFSE+) were cultured in the presence of T1D-MSCs or C-MSCs. The percentage of CD3⁺ T lymphocyte proliferation was determined by flow cytometry. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

Figure 7. Intrasplenic injection of T1D-MSCs promotes hyperglycemia reversion in STZ-induced experimental diabetes. 1×10^6 T1D-MSC or C-MSCs were administrated by intrasplenic injection in diabetic mice 20 days after diabetes induction. (A) Blood glucose (mg/dL) was measured in nonfasting mice frequently for 35 days. A reduction in blood glucose levels was observed in 67% of diabetic-treated mice mainly on day 6 post transplantation. The control group was treated with intrasplenic injection of PBS (Control-PBS). (B) Area under the curve (AUC) of blood glucose levels from day 0 to 35. The AUC was determined for each animal, and the average $\pm$ SD of each group is shown. (C) Blood glucose levels (mg/dL) at 10 hours of fasting were determined 30 days after MSCs treatment and lower levels were detected in T1D-MSCs and C-MSCs-treated mice compared with the Control group. Data are average $\pm$ SD. * $P < 0.05$

Figure 8. Blood glucose levels before and after intrasplenic MSCs administration.

Nonfasting glycemia were evaluated before (Pre) and 35 days after (Post) intrasplenic administration of C-MSCs (A) or T1D-MSCs (B). Responders: MSCs-treated mice with glycemia <250 mg/dL; Non-Responders: MSCs-treated mice with glycemia >250 mg/dL. Bars represent means $\pm$ SEM. $*P < 0.05$

Figure 9. Improvement of peripheral response to glucose and after treatment with T1D-MSCs. (A) An glucose tolerance test was performed in 10 hours fasted mice 30 days after the T1D-MSC, C-MSCs or PBS intrasplenic administration. Glucose (1,5 mg/g) was administrated intraperitoneally in mice, and blood glucose levels (mg/dL) were determined 0, 15, 30, 60, and 180 min after administration. (B) The area under the curve corresponding from time 0 to 180 was determined for each animal and the average $\pm$ SD of each group is shown. $*P < 0.05$

Figure 10. Therapy with T1D-MSCs does not change the frequency of Tregs in spleen and PLN of diabetic-treated mice. Frequency of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells was analyzed by flow cytometry in cells obtained from the spleen and pancreatic lymph nodes (PLN) from T1D-MSCs, C-MSCs and PBS-treated mice. The cells were stained for surface markers CD4 and CD25 and afterward for transcription factor Foxp3. Data are average $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

Figure 11. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine profile (serum) after intrasplenic T1D-MSCs administration. Blood samples were obtained from Control and MSCs-treated groups 35 days after treatment. The samples were centrifuged and the serum collected. The levels of IL-2, IL-4, IL-17, IL-6, IFN- γ , TNF- α and IL-10 were measured by cytokine beads array (CBA) method. The cytokine concentrations are represented by picograms of protein per milliliter. Bars represent means $\pm$ SD.

Figure 12. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine profile (pancreatic homogenate) after intrasplenic T1D-MSCs administration. Pancreata were obtained from Control and MSCs-treated groups 35 days after treatment. The samples were weighted and homogenized in the presence of proteases inhibitor. The levels of IL-2, IL-4, IL-17, IL-6, IFN- γ , TNF- α and IL-10 were measured by cytokine beads array (CBA) method. The cytokine concentrations are represented by picograms of protein per gram of pancreatic tissue. Bars represent means $\pm$ SD. *Significant differences ($P < 0.05$).

Figure 13. Histological analysis of the pancreas after C-MSCs or T1D-MSCs transplantation. The pancreas from Control group, C-MSCs and T1D-MSCs-treated mice were collected 35 days after the treatment and histological features were evaluated by H&E staining. Representative H&E-stained islets from Control-PBS group, C-MSCs-treated group and T1D-MSCs-treated group are shown. Original magnification 100x.

Figure 14. Immunohistochemistry for insulin expression after C-MSCs or T1D-MSCs transplantation. The pancreas from Control group, C-MSCs and T1D-MSCs-treated mice were collected 35 days after the treatment. Pancreatic tissue sections were analyzed by immunohistochemistry assay with anti-insulin antibody to evaluate insulin granule content in pancreatic islets. Representative images from Control-PBS group, C-MSCs-treated group and T1D-MSCs-treated group are shown. Original magnification 100x.

Figure 15. Immunohistochemistry for Ki-67 expression after C-MSCs or T1D-MSCs transplantation. The pancreas from Control group, C-MSCs and T1D-MSCs-treated mice were collected 35 days after the treatment. Pancreatic tissue sections were analyzed by immunohistochemistry assay with anti-Ki-67 antibody to evaluate pancreatic cells proliferation. Representative images from Control-PBS group, C-MSCs-treated group and T1D-MSCs-treated group are shown. Original magnification 100x.