ÊNIO JOSÉ BASSI

**PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DO
DIABETES AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

ÊNIO JOSÉ BASSI

**PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS DAS CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO NO TRATAMENTO DO
DIABETES AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen
Saraiva Câmara

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Bassi, Ênio José.

Propriedades imunomoduladoras das células-tronco mesenquimais
do tecido adiposo no tratamento do diabetes autoimune experimental /
Ênio José Bassi. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração:
Imunologia. Linha de pesquisa: Imunorregulação e tolerância
imunológica.

Versão do título para o inglês: Immune regulatory properties of
adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of
experimental autoimmune diabetes.

1. Imunologia celular 2. Células-tronco 3. Diabetes *mellitus*
4. Autoimunidade I. Câmara, Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa
de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0128/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ênio José Bassi.

Título da Tese: Propriedades imunomoduladoras das células-tronco
mesenquimais do tecido adiposo no tratamento do diabetes
autoimune experimental.

Orientador(a): Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **92** nas fls. **73** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Niels Olsen Saraiva Câmara, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo das propriedades imunomoduladoras das células-tronco mesenquimais sobre a geração, expansão e diferenciação de células TCD4+CD25+Foxp3+e células Th17** do qual participou(aram) o(s) alunos **Ênio José Bassi**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **30.06.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 01 de julho de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

*Ao Amor da Minha Vida, Letícia
Anderson, por estar sempre ao meu
lado... “Feliz o dia que os meus olhos
nos teus se encontraram...”*

*A minha amada mãe Zilma, pelo
apoio, carinho e amor de mãe
incondicional*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por estar sempre ao meu lado iluminando cada passo da minha caminhada, sorrindo comigo nos momentos felizes e sendo meu ombro amigo fiel nas horas em que mais precisei...

Ao amor da minha vida, Leticia Anderson, pelo amor, carinho, cumplicidade, dedicação e por sempre estar ao meu lado, me apoiando em todos os momentos de minha vida

A minha mãe, Zilma, ao meu irmão Denis, e a toda minha família, por me apoiarem, pelas orações e por sempre estarem presentes torcendo pela minha felicidade

Ao meu pai, Jayme Bassi (in memoriam) pela proteção que me concede todos os dias

Ao professor e amigo, Niels Olsen Saraiva Câmara, pela acolhida como seu aluno em seu laboratório, pela orientação, amizade, confiança, preocupação, incentivo e por sempre me ajudar quando mais precisei

Aos amigos Pedro, Danilo e Vinícius pela amizade, companheirismo, apoio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos que passamos juntos durante esses anos

Aos amigos do Laboratório de Imunobiologia dos Transplantes, pela convivência e momentos agradáveis que passamos juntos

Aos amigos Carla e Leonardo, pela ajuda com os experimentos

Ao professor Alexandre Basso pelo apoio e disponibilidade dos camundongos Foxp3 GFP

A todos os professores das disciplinas que cursei por todos os ensinamentos, em especial a professora Vera Calich pela oportunidade de ser seu aluno PÆ

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Imunologia, em especial a Eni

Ao Paulo Albe pela ajuda com a parte de análise histológica

A FAPESP pelo apoio financeiro sem o qual não seria possível a realização deste trabalho

Ao Departamento de Imunologia, ao Instituto de Ciências Biomédicas e a Universidade de São Paulo

A todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, as quais, direta ou indiretamente, participaram da construção da minha história como profissional e ser humano, a minha eterna gratidão

MUITO OBRIGADO

Ênio José Bassi

O presente trabalho foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Quando a noite esconde a luz, Deus acende as estrelas”

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

Bassi EJ. Propriedades imunomoduladoras das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no tratamento do diabetes autoimune experimental. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

As células-tronco isoladas a partir do tecido adiposo (ADMSCs) se tornaram promissoras para o tratamento de diversas doenças autoimunes devido a suas propriedades imunomoduladoras. No entanto, o seu papel imunomodulador no diabetes autoimune tipo 1 (DMT1) permanece amplamente inexplorado. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico das ADMSCs em modular a resposta imune no diabetes autoimune experimental em camundongos NOD. ADMSCs alogênicas foram administradas em camundongos NOD diabéticos (glicemia > 240 mg/dl) nos dias 0, 7 e 14 sendo então a glicemia monitorada por 12 semanas. A administração de ADMSCs resultou na reversão da hiperglicemia em 78% dos animais por até 8 semanas após o tratamento sendo esse efeito acompanhado de uma melhora significativa na resposta ao teste de tolerância a glicose e em aumento nos níveis de insulina, amilina e GLP-1 no soro. A presença das ADMSCs pôde ser detectada 72h após administração intraperitoneal nos linfonodos pancreáticos e pâncreas dos animais. Esse efeito terapêutico foi associado, nos linfonodos pancreáticos, a um aumento na frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ (T reguladoras, ou Tregs) e a uma diminuição de linfócitos CD4+ produtores de IFN- γ e TNF- α 35 dias após o tratamento. Além disso, no pâncreas, uma redução do infiltrado celular inflamatório e nos níveis de IFN- γ e aumento de TGF- β 1 biologicamente ativo, assim como uma maior expressão de insulina e PDX-1 nas ilhotas pancreáticas foram observados. De forma interessante, uma maior frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+Helios+ pode ser observada 12 semanas após o tratamento. *In vitro*, as ADMSCs promoveram a expansão de Tregs em um mecanismo dependente de contato celular e mediado pela molécula PD-L1. Em suma, o tratamento com ADMSCs pôde melhorar de forma efetiva o diabetes autoimune em camundongos NOD pela atenuação da resposta autoimune concomitante a expansão de células Tregs, provendo o desenvolvimento futuro de novas perspectivas de estratégias terapêuticas de terapia celular para o DMT1.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo. Imunomodulação. Diabetes autoimune experimental. Células T reguladoras.

ABSTRACT

Bassi EJ. Immune regulatory properties of adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) display immunomodulatory properties representing a promising therapeutic approach for several autoimmune diseases, but their role in autoimmune type 1 diabetes (T1D) remains largely unexplored. The aim of this study was to investigate the immune regulatory properties of allogeneic ADMSCs therapy in T cell-mediated experimental autoimmune diabetes in NOD mice. Diabetic NOD mice (blood glucose > 240 mg/dl) were treated or not with ADMSC at days 0, 7 and 14 and blood glucose was monitored once a week for 12 weeks after treatment. ADMSCs reversed the hyperglycemia levels of early onset T1D in 78% of diabetic-treated mice for 8 weeks after treatment and this effect was related with higher serum insulin, amylin and glucagon-like peptide (GLP-1) levels and a significant improvement to intraperitoneal (i.p.) glucose tolerance test. Interestingly, ADMSCs could be detected 72h after i.p. administration in both pancreas and pancreatic lymph nodes (PLN) of treated mice. This improved outcome was associated with down regulation of Th1-biased immune response (CD4+IFN- γ + and CD4+TNF- α + cells) and expansion of Tregs (CD4+CD25+Foxp3+) in PLN verified 35 days after treatment. Moreover, insulinitis and IFN- γ levels were also reduced while insulin, PDX-1 and active TGF- β 1 were increased within the pancreas. Interestingly, a higher frequency of CD4+CD25+Foxp3+Helios+ T cells could be observed in PLN of ADMSCs-treated mice 12 weeks after treatment. *In vitro*, ADMSCs induced expansion/proliferation of Tregs in a cell contact-dependent manner in a mechanism mediated by PD-L1 and higher TGF- β 1 levels. ADMSCs therapy efficiently ameliorates T1D pathogenesis in diabetic NOD mice by attenuating the Th1 immune response concomitantly with the expansion of Tregs, thereby contributing to maintenance of functional β -cells. This study may thus provide a new therapeutic perspective for the development of ADMSCs-based cellular therapies for T1D.

Keywords: Adipose-derived mesenchymal stem cells. Immunoregulation. Experimental autoimmune diabetes. Regulatory T cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMSCs: células-tronco derivadas de tecido adiposo
ADP: adenosina difosfato
AMP: adenosina monofosfato
APCs: células apresentadoras de antígeno
ATP: adenosina trifosfato
BM-MSCs: células-tronco mesenquimais obtidas a partir da medula óssea
cAMP: AMP cíclico
CCL-2: "*CC-chemokine ligand-2*"
CD: molécula CD (Clusters Differentiation)
CFUs: unidades formadoras de colônia fibroblastóide
CTAs: células-tronco adultas
CTEs: células-tronco embrionárias
CTLA-4: "*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*"
DCs: células dendríticas
dl: decilitro
DMEM: meio de cultura
EAE: encefalomielite autoimune experimental
Foxp3: "*Forkhead Box P3*"
FSC: "*Forward scatter*"
GIP: polipeptídeo inibitório gástrico
GLP-1: "*glucagon like-peptide 1*"
HE: Hematoxilina e Eosina
HGF: fator de crescimento de hepatócitos ("*hepatocyte growth factor*")
HLA-G5: "*human leucocyte antigen- G5*"
HO-1: heme oxigenase-1
i.p.: intraperitoneal
IDO: "*Idoleamina 2,3 - deoxygenase*"
IFN- γ : interferon- γ
IgG: Imunoglobulina G
IGTT: teste de tolerância a glicose intraperitoneal
IL-10: interleucina-10
IL-12: interleucina-12
IL-17: interleucina-17
IL-2: interleucina-2
IL-4: interleucina-4
IL-6: interleucina-6
KI: "*knockin*"
KO: "*knockout*"
LPs: linfonodos pancreáticos
MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MMPs: metaloproteinases (*“matrix metalloproteinases”*)

MSCs: células-tronco mesenquimais

NO: óxido nítrico

NOD: *non-obese diabetic*

NOR: *non-obese resistant*

PBMCs: células mononucleares do sangue periférico

PBS: Solução salina de tampão fosfato

PGE2: prostaglandina E2

PHA: fitohemaglutinina

REXH: reação do enxerto versus hospedeiro

SBF: soro fetal bovino

SCID: imunodeficiência severa combinada

SSC: *“side scatter”*

TCR: receptor de células T

TGF- β : fator transformador de crescimento - β

Th: célula T auxiliar

TLR: receptor do tipo Toll

TNF- α : fator de necrose tumoral α

Tregs: células T reguladoras

μ g: micrograma

μ l: microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Células-tronco mesenquimais	15
1.2 Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (ADMSCs)	17
1.3 Propriedades imunomoduladoras das MSCs	18
1.4 Células T reguladoras e MSCs	21
1.5 MSCs, doenças autoimunes e células Tregs	25
1.6 MSCs e o diabetes autoimune tipo 1 (DMT1)	27
2 OBJETIVO GERAL	33
2.1 Objetivos específicos	33
3.1 Animais de experimentação	34
3.2 Isolamento e caracterização das ADMSC	34
3.2.1 Isolamento das ADMSC a partir de tecido adiposo murino	34
3.2.2 Caracterização fenotípica	35
3.2.3 Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica	35
3.2.4 Inibição da proliferação de células T CD4+ por ADMSC	36
3.3 Citometria de fluxo	37
3.3.1 Detecção da produção intracelular de citocinas	37
3.3.2 Imunofenotipagem de células T reguladoras	38
3.4 Modelo de diabetes autoimune experimental em camundongos NOD e protocolo de tratamento com ADMSC	38
3.5 Teste de tolerância a glicose	39
3.6 Análise histológica e imunohistoquímica	39
3.7 Separação de células T CD4+	40
3.8 Separação de células T CD4+62L+Foxp3- e CD4+Foxp3+ por FACS (" <i>fluorescence activated cell sorting</i> ")	40
3.9 Quantificação de citocinas no extrato pancreático	41
3.10 Quantificação de hormônios no soro	41
3.11 ELISA para TGF- β 1	42
3.12 " <i>Homing</i> " das ADMSC após administração em camundongos NOD	42
3.13 Expansão/proliferação <i>in vitro</i> de células CD4+CD25+Foxp3+ por ADMSC	43

3.14 Análise estatística	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Isolamento e caracterização das ADMSCs	44
4.2 Modelo de diabetes autoimune experimental em camundongos NOD	46
4.3 Tratamento com ADMSCs reverte a hiperglicemia em camundongos NOD recém-diabéticos	48
4.4 Teste de tolerância a glicose e glicosúria e aumento nos níveis de insulina após o tratamento com ADMSCs	49
4.5 Tratamento com ADMSCs promove o aumento de diversos hormônios relacionados à melhora do diabetes autoimune em camundongos NOD	51
4.6 Tratamento com ADSMC diminui o infiltrado celular inflamatório (insulite) mantendo a expressão de insulina e PDX-1 nas ilhotas pancreáticas	52
4.7 Modulação da resposta imune mediada por células T CD4+ de perfil Th1 nos linfonodos pancreáticos (LPs) após o tratamento com ADMSC	56
4.8 Terapia com ADMSCs aumenta a frequência de células T reguladoras nos LPs	57
4.9 Tratamento com ADMSCs atenua a resposta imune de perfil Th1 no pâncreas combinada ao aumento da expressão de TGF- β 1 ativo	59
4.10 "Homing" das ADMSCs após administração em camundongos NOD diabéticos	60
4.11 Expansão de células T reguladoras <i>in vitro</i> por ADMSCs	63
4.12 Papel do contato celular na expansão de células T CD4+CD25+Foxp3+ por ADMSCs	66
4.13 Expansão de células T CD4+CD25+Foxp3+ por ADMSCs em uma condição de estímulo alogênico	67
4.14 Expansão de células Tregs <i>in vitro</i> por ADMSCs é mediada pela molécula PD-L1	69
4.15 Conversão x Expansão/manutenção de células CD4+Foxp3+ <i>in vitro</i> por ADMSCs	71
4.16 ADMSCs promovem a atenuação da hiperglicemia em camundongos NOD recém-diabéticos por um longo período de tempo após o tratamento	76
4.17 Terapia com ADMSCs aumenta a frequência de células Tregs nos LPs 12 semanas após o tratamento	79
5 DISCUSSÃO	83
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	95
APÊNDICE - Artigos científicos publicados	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco mesenquimais

O termo célula-tronco (do inglês, “*stem cell*”) foi utilizado pela primeira vez em 1868, por Ernst Haeckel em estudos botânicos. Posteriormente, na área de hematopoiese, o termo foi consolidado, visto que todas as células sanguíneas são originadas a partir de uma única célula progenitora [1, 2]. Atualmente, o termo “células-tronco” é utilizado para definir uma população de células auto-renováveis e indiferenciadas capazes de se diferenciar em células especializadas/diferenciadas.

As células-tronco podem ser classificadas em células-tronco embrionárias (CTEs) ou células-tronco adultas (CTAs) de acordo com sua origem [3]. As CTEs são células pluripotentes com potencial ilimitado de auto-renovação e diferenciação, sendo obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto [4, 5]. Por outro lado, as CTAs podem ser encontradas praticamente em todos os órgãos, sendo responsáveis pela manutenção da homeostase e integridade tecidual. Geralmente, as CTAs são multipotentes, ou seja, dão origem apenas a células do seu folheto germinativo de origem, sendo mais limitadas quando a potencialidade de diferenciação quando comparadas as CTEs. Além de serem mais facilmente cultivadas *in vitro*, devido à obtenção das CTAs não envolver a utilização de embriões, problemas éticos e religiosos são contornados. Dentre as CTAs, destacam-se as células-tronco mesenquimais (MSCs) ou células estromais mesenquimais multipotentes.

As MSCs foram descritas inicialmente na medula óssea por Friedenstein et al. [6-8]. Posteriormente, Owen, Caplan e colaboradores propuseram a existência de uma célula-tronco adulta de origem mesodérmica no estroma da medula óssea expressando os marcadores CD105 e CD73, denominando-a com o termo “célula-tronco mesenquimal” [9-13]. Essas células representam uma fração muito pequena da população total das células nucleadas da medula óssea (0,001% a 0,01% das células totais) podendo ser isoladas e expandidas com eficiência *in vitro* como células

aderentes [14, 15]. Geralmente, as MSCs são isoladas a partir do aspirado da medula óssea por um gradiente de densidade e então separadas das células-tronco hematopoiéticas pela sua capacidade aderência a superfície plásticas em placas de cultura celular [16].

As MSCs são células clonogênicas, não hematopoiéticas e multipotentes, com capacidade de auto-renovação e diferenciação para diversas linhagens celulares como, por exemplo, osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Nos últimos anos, mostrou-se que essas células podem ser isoladas a partir de vários tecidos, dentre eles da medula óssea, córnea, retina, polpa de dente, pele, tecido adiposo, fígado, pâncreas, sistema nervoso e rim [17, 18]. Devido à facilidade de isolamento e potencial de diferenciação, além da aceitação do ponto de vista ético, as MSCs estão entre as primeiras células-tronco a serem introduzidas na prática clínica, apresentando um grande potencial de aplicação em terapias celulares [19, 20].

Morfologicamente, as MSCs são células fusiformes, com formato semelhante a fibroblastos, e apresentam como característica, no seu período inicial de expansão *in vitro*, a propriedade de formação de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-Fs). Essas células são caracterizadas pela ausência da expressão de marcadores de superfície de linhagens hematopoiéticas, tais como: CD14, CD45, CD34, CD133; e expressão das moléculas de superfície celular CD44, CD90, CD105 e CD73, dentre outras [21, 22]. A partir de 2005, de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês, “*International Society for Cellular Therapy- ISCT*”), três critérios devem ser considerados e avaliados para caracterização das MSCs independentemente da sua fonte de isolamento: aderência a superfícies plásticas; potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica; e expressão de moléculas específicas na superfície celular (p. ex. CD105, CD73 e CD90) [23].

As MSCs possuem um grande potencial terapêutico devido a suas habilidades de “*homing*” para tecidos lesados e por produzirem diversos fatores tróficos (citocinas e fatores de crescimento), os quais podem estar relacionados principalmente a mecanismos de imunorregulação, anti-fibrótico, inibição do

estresse oxidativo, indução da proliferação de células progenitoras teciduais, anti-apoptóticos, pró-angiogênicos e quimioatração [24, 25].

1.2 Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (ADMSCs)

O tecido adiposo é constituído de adipócitos, fibroblastos, células musculares e endoteliais, células do sistema imune e MSCs. No ano de 2001, Zuk et al. [26, 27] mostraram pela primeira vez a presença de MSCs presente no tecido adiposo (ADMSCs). Neste estudo, foi mostrado que as ADMSCs humanas, isoladas a partir do lipoaspirado, expressavam as moléculas CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, SH3 e STRO-1 e eram negativas para marcadores de linhagem hematopoiética CD14, CD16, CD31, CD34, CD45, CD56, CD61, CD104 e CD106 [27]. Como a medula óssea, as ADMSCs têm origem a partir da mesoderme, possuindo várias características semelhantes, como por exemplo a capacidade de diferenciação em diferentes linhagens celulares, como neurônios, miócitos, cardiomiócitos, células endoteliais, hepatócitos, adipócitos, osteoblastos e condrócitos [12, 13].

Devido à facilidade de acesso e abundância, essas células tornaram-se muito promissoras em diversas aplicações terapêuticas para várias patologias [28]. De forma interessante, 1 grama de tecido adiposo possui um rendimento de aproximadamente 5000 células, enquanto o rendimento das MSCs obtidas de medula óssea é de 100 a 1000 células/ml de aspirado de medula [29]. O isolamento das ADMSCs geralmente é realizado por um método enzimático utilizando-se uma enzima denominada collagenase tipo I, com posterior filtração e centrifugação, sendo que as células de interesse são então selecionadas pela sua propriedade de aderência à superfície plástica [30]. Após o isolamento e expansão, as ADMSCs devem ser caracterizadas, conforme descrito anteriormente para MSCs.

1.3 Propriedades imunomoduladoras das MSCs

Embora as possibilidades terapêuticas regenerativas das MSCs, levando em conta a sua capacidade de diferenciação em diversos tecidos foram as mais estudadas inicialmente, as propriedades imunomoduladoras se tornaram, recentemente, igualmente promissoras. Estas células são capazes de suprimir a resposta imune, inibindo a maturação de células dendríticas e suprimindo a função de linfócitos T, linfócitos B e células NK [31]. Além disso, mostrou-se que estas células não expressam marcadores de superfície que permitam a ativação de uma resposta imune, sendo consideradas assim “imunoprivilegiadas” [32]. Do ponto de vista terapêutico, o baixo potencial imunogênico das MSCs tem permitido a aplicação segura dessas células de forma alogênica ou até mesmo xenogênica no tratamento experimental de diversas doenças em modelos animais. No entanto, alguns estudos mostram que as MSCs podem ser imunogênicas em alguns modelos experimentais em animais [33, 34].

Bartholomew et al. [31] foram os primeiros a mostrar que a administração endovenosa de MSCs alogênicas prolongava a sobrevida de enxerto de pele, suprimindo a resposta de células T *in vivo*. Nos anos seguintes, diversos estudos avaliaram as propriedades imunossupressoras das MSCs em diversos modelos experimentais para várias doenças autoimunes, como reação do enxerto versus hospedeiro, diabetes, artrite reumatóide, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico, dentre outras [35, 36].

As propriedades imunomoduladoras das MSCs têm sido descritas ainda *in vitro*, em ensaios de supressão da proliferação de linfócitos T utilizando uma variedade de estímulos, incluindo-se: mitógenos, anticorpos agonistas (anti-CD3/anti-CD28) e aloantígenos, sendo essa inibição geralmente independente do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Além de inibir proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, as MSCs podem reduzir a expressão de certos marcadores

de ativação, como CD25, CD38 e CD69 em linfócitos estimulados por fitohemaglutinina (PHA) [31, 37].

Diversos fatores solúveis secretados pelas MSCs, capazes de atuar sobre várias células do sistema imune, tais como TGF- β 1, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), prostaglandina E2 (PGE2), interleucina-10 (IL-10), indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), entre outros, tem sido apontados como os responsáveis pela propriedade imunomoduladora destas células, conforme mostrado na figura 1 [38-41].

Figura 1 – Propriedades imunomoduladoras das MSCs.

Diversos fatores solúveis secretados por MSCs estão associados a suas propriedades imunomoduladoras sobre linfócitos T CD4+ e CD8+, células T reguladoras, células "natural killer" (NK), linfócitos B e células dendríticas (DCs).

Fonte: Adaptado de Bassi et al. [42].

Meisel et al. [40] observaram que a indução da expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO, que catalisa a conversão de triptofano em quinurenina) em MSCs estimuladas com IFN- γ , promovia a depleção de triptofano no meio, resultando assim, na inibição da proliferação linfocitária. Outra molécula envolvida no mecanismo imunossupressor consiste na PGE2, sendo que sua inibição por indometacina pôde restaurar parcialmente a proliferação de linfócitos T na presença das MSCs de origem murina ou humana [43]. Em outro estudo, foi mostrado que a capacidade supressora das MSCs estava relacionada à produção da citocina IL-10 [44].

Existem outros mecanismos que poderiam contribuir para este efeito imunossupressor principalmente sobre linfócitos T CD4+, entre eles a carência de moléculas de classe II do MHC [45] e de moléculas co-estimulatórias, como CD80, CD86 e CD40 nas MSCs [32], levando a anergia de linfócitos T [46]. No entanto, a transfecção de MSCs com as moléculas CD80 e CD86 não reverteu esta capacidade de inibir a resposta imune [44], sugerindo que este não seja o principal fato envolvido na imunossupressão promovida por essas células.

As MSCs podem regular também a resposta imune por meio da interação com os linfócitos B. MSCs derivadas da medula óssea apresentaram efeitos inibitórios sobre a proliferação e secreção da imunoglobulina IgG por linfócitos B em um modelo experimental murino de lúpus eritematoso sistêmico [47]. Além disso, quando MSCs isoladas da medula óssea (BM-MSCs) e linfócitos B provenientes do sangue periférico de doadores saudáveis foram co-cultivados com diferentes estímulos para ativação dos linfócitos B, como anticorpos direcionados contra a molécula CD40, a proliferação, assim como a produção de imunoglobulinas por essas células foram inibidas [48].

As MSCs podem ainda inibir a diferenciação, maturação e ativação de células dendríticas (DCs), resultando, posteriormente, na atenuação da resposta imune mediada por células T [49]. Elas podem alterar o perfil secretório de citocinas das DCs, estimulando a secreção de citocinas de perfil supressor/regulador, como, por

exemplo, a IL-10, e inibindo as citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-12 e TNF- α [50]. Além disso, a inibição de moléculas relacionadas à apresentação de antígenos, como CD1a, CD40, CD83, CD80, CD86 e HLA-DR foi observada durante a maturação de DCs na presença de MSC [49, 51].

1.4 Células T reguladoras e MSCs

As células com potencial regulador têm sido alvo de intensas pesquisas nos últimos anos. Logo depois da descoberta de que linfócitos T funcionam como células auxiliaadoras para linfócitos B, Gershon e Kondo[52], na década de 70, propuseram que um grupo de células poderia agir suprimindo a resposta imune, sendo denominadas células T supressoras. Porém, somente a partir do final dos anos 90 que a existência dessas células passou a ter uma maior aceitação no meio científico, sendo então estudadas e amplamente caracterizadas, ressurgindo como células T reguladoras (Tregs) [53].

As células Tregs surgem no timo e são encontradas no sangue periférico e em órgãos linfóides secundários representando cerca de 5-15% de todas as células T CD4⁺ em murinos. Essas células expressam constitutivamente a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25⁺) exibindo uma potente atividade reguladora tanto *in vivo* como *in vitro*, inibindo células T auto-reativas e mantendo a homeostasia e tolerância imunológica [53]. Sakaguchi et al. [53] demonstraram que a transfusão de células T CD4⁺CD25⁻ em camundongos *nude* atímicos pode ocasionar o desenvolvimento de doenças autoimunes, como tireoidite, gastrite, insulite e glomerulonefrite. Além disso, foi mostrado que a transferência de células T CD4⁺CD25⁺ dentro de um curto período de tempo pós-transferência de células T CD4⁺CD25⁻ pode prevenir o desenvolvimento da autoimunidade de uma maneira dose-dependente.

A manutenção e sobrevivência das células Tregs é regulada pela citocina IL-2, sendo que o bloqueio desta citocina *in vivo* com anticorpos anti-IL-2 inibe a proliferação homeostática dessas células [54]. Apresentam ainda um fenótipo de

células de memória, uma vez que são CD45RO+, além de expressar CTLA-4 (do inglês, "*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*") [55]. Posteriormente, uma elevada expressão do fator de transcrição Foxp3 (do inglês, "*Forkhead Box P3*") foi identificada como tendo um papel central no desenvolvimento e função das células Tregs CD4+CD25+, sendo o marcador mais específico disponível para essas células atualmente [56]. A importância das células Tregs na manutenção da tolerância foi evidenciada em humanos, visto que pacientes com ausência funcional dessas células, devido a uma mutação pontual no gene Foxp3, desenvolvem a síndrome conhecida como IPEX (do inglês, "*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*"), caracterizada por autoimunidade sistêmica [57]. Além disso, as Tregs tem um papel muito importante no controle das respostas imunes efetoras em diversas doenças autoimunes, sendo que a deleção dessas células leva a expansão clonal de células T autorreativas. Em diversas doenças autoimunes, foi observada uma atividade supressora reduzida dessas células isoladas a partir de PBMCs de pacientes com esclerose múltipla, diabetes tipo 1, miastenia grave, artrite reumatóide e lúpus [58, 59].

Atualmente, as células Tregs podem ser classificadas como células Tregs CD4+CD25+Foxp3+ naturais, geradas no timo, Tregs periféricas, induzidas na periferia a partir de células Foxp3- após estimulação antigênica na presença de TGF- β 1 [60-62]. As células Tregs podem atuar suprimindo a resposta imune por diversos mecanismos envolvendo fatores solúveis, como por meio das citocinas TGF- β 1 e IL-10, ou por contato célula-célula, como por exemplo a molécula CTLA-4 [63-65]. Essas células podem ainda consumir os fatores de crescimento presentes no microambiente, como por exemplo, a IL-2, privando as outras células efetoras desses fatores e induzindo a apoptose nessas células [66]. O metabolismo de adenosina foi relatado como outro importante mecanismo de supressão mediado pelas Tregs, visto que essas células expressam as moléculas CD39 e CD73 [67]. Inicialmente, a molécula CD39 cliva o ATP em ADP e AMP. O AMP é rapidamente degradado em adenosina

pelo CD73, gerando seus efeitos supressores ao se ligar em receptores acoplados a proteína G, o receptor A2A, presente em células T.

Interessantemente, as MSCs possuem a capacidade de expandir células Tregs *in vitro* e *in vivo* em diversos modelos experimentais [68]. Maccario et al. [69] descreveram que a interação de MSCs humanas com células envolvidas na resposta imune aloantígeno-específica favorecia a diferenciação de células Tregs expressando CD25 e/ou CTLA-4 com funções supressoras. Em outro estudo, o co-cultivo de MSCs com PBMCs ocasionou a geração tanto de linfócitos T CD4+, expressando elevados níveis de Foxp3, como T CD8+ reguladores capazes de inibir a proliferação linfocitária por estímulo aloantigênico, policlonal (anti-CD3) ou mitogênico (PHA) com uma eficiência supressora aproximadamente 100 vezes maior quando comparada a células Tregs CD4+CD25+ [70].

As MSCs alogênicas podem diminuir a secreção de IFN- γ por células de perfil Th1 (do inglês “*T helper 1*”) e aumentar a secreção de IL-4 por células Th2 (do inglês, “*T helper 2*”), favorecendo ainda um aumento na frequência de células Tregs na presença de IL-2, quando co-cultivadas com diferentes populações de linócitos [43]. Em outro estudo, MSCs isoladas da medula óssea de ratos co-cultivadas com células CD3+ alogênicas promoveram um aumento na frequência de células T CD4+CD25+ assim como nos níveis de citocinas antiinflamatórias como TGF- β e IL-10 [71].

As MSCs podem ainda recrutar e manter o fenótipo de células Tregs *in vitro* [72]. No estudo de Dianni et al. [72] um aumento na frequência de células CD4+CD25+Foxp3+ assim como uma diminuição na expressão de CD127 (fenótipo característico de Tregs humanas) foi observado após o co-cultivo de linfócitos CD3+ com MSCs humanas. De forma interessante, quando populações purificadas de células Tregs CD4+CD25+ foram utilizadas no co-cultivo com MSCs, observou-se uma manutenção tanto da expressão de Foxp3, assim como na capacidade supressora dessas células por um período de até 2 semanas [72].

Embora o mecanismo envolvido no processo de indução/expansão de células T CD4+CD25+Foxp3 *in vitro* ainda não tenha sido completamente elucidado, em MSC

humanas derivadas de medula óssea, foi mostrado que o contato celular MSC/linfócito T CD4⁺ e fatores solúveis como PGE2 e TGF- β podem estar envolvidos [73]. Além disso, em outro estudo, foi verificado que a molécula de HLA-G5 (antígeno leucocitário humano de classe I não-clássico) secretada por MSCs, na presença de IL-10, pode contribuir para a expansão de células Tregs [74].

A enzima IDO também exerce um papel importante na atividade imunomoduladora das MSCs sobre as células Tregs. Em um modelo experimental de transplante renal, observou-se que a administração de MSCs pode aumentar a sobrevida do enxerto, associado uma maior frequência de células Tregs e aumento dos níveis de quinurenina no soro, indicando assim uma maior atividade da enzima IDO [75]. Além disso, o tratamento dos animais com um inibidor da IDO (1-metil-triptofano) ou a utilização de MSCs obtidas a partir de camundongos IDO^{-/-} não promoveu a tolerância ao enxerto, confirmando assim a importância dessa enzima no mecanismo de ação terapêutico observado e na indução de células Tregs [75]. De forma importante, a IDO e a PGE2 produzidas pelas MSCs podem ainda, ao direcionar a diferenciação de células T CD4⁺ para um fenótipo regulador, promover a inibição da diferenciação de células Th17 (do inglês “T helper 17”), que são importantes células efetoras em diversas situações de autoimunidade [76, 77].

Recentemente, foi mostrado que a administração de MSCs alogênicas reduziu a inflamação das vias aéreas e os níveis de IgE no modelo experimental de asma induzida por ovoalbumina, em um mecanismo dependente da indução de células T CD4⁺Foxp3⁺, visto que o tratamento com ciclofosfamida, que promove a depleção de Tregs, pode reverter o efeito terapêutico observado [78].

Embora os mecanismos de imunossupressão das MSCs não estejam completamente elucidados, tem-se mostrado que tanto o contato MSC/células do sistema imune como a participação de fatores solúveis parecem estar envolvidos nesse processo. Além disso, é interessante ressaltar que os vários mecanismos de imunomodulação promovidos pelas MSC *in vitro* não são mutuamente exclusivos, e

a contribuição relativa de cada um deles em modular a resposta imune é variável em diferentes modelos experimentais.

1.5 MSCs, doenças autoimunes e células Tregs

As doenças autoimunes são resultantes de defeitos nos mecanismos de tolerância imunológica, resultando na ativação de mecanismos celulares e humorais da resposta imune contra tecidos próprios. Geralmente, essas doenças são de natureza multifatorial, onde fatores genéticos e ambientais podem estar envolvidos. Nos últimos anos, a propriedade imunossupressora das MSCs tem sido explorada *in vivo* em modelos animais para diversas doenças de natureza autoimune.

No modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo murino para esclerose múltipla humana, a administração de MSCs antes ou durante a doença diminuiu o infiltrado inflamatório no sistema nervoso central e os sinais clínicos associados com a desmielinização presentes nesta doença [46]. Em outro estudo, nesse mesmo modelo experimental, observou-se uma redução de células T produtoras de IFN- γ e células T CD4⁺ de perfil Th17 pró-inflamatórias, com concomitante aumento de células de perfil Th2, produtoras de IL-4 e citocinas anti-inflamatórias, contribuindo assim para a melhora clínica da doença [79]. Em pacientes com esclerose múltipla, uma maior expressão de Foxp3 nas células mononucleares, associada à estabilização clínica da doença, foi observada 6 meses após a administração de MSCs, quando comparado aos níveis de expressão antes do tratamento [80].

No tratamento da artrite induzida por colágeno em camundongos com ADMSCs humanas uma diminuição na produção de várias citocinas pró-inflamatórias e de células Th1/Th17 antígeno-específicas, aumento de IL-10 em linfonodos e articulações, além da expansão de células Tregs foram observadas [81, 82]. Neste mesmo modelo experimental, MSCs murinas alogênicas foram capazes de prevenir o dano tecidual em ossos e cartilagens, aumentando a frequência de Tregs

antígeno-específicas e diminuindo a concentração de TNF- α no soro dos animais tratados [83]. O efeito das ADMSCs humanas sobre a proliferação e produção de citocinas por células T auto-reativas provenientes de pacientes com artrite reumatóide foi avaliada em experimentos de co-cultivo *in vitro* [84]. Neste estudo, ADMSCs humanas inibiram ainda a resposta proliferativa e a produção de citocinas inflamatórias em células T CD4 e CD8 ativadas por colágeno aumentando ainda a produção de IL-10 e a geração de células Tregs capazes de suprimir a resposta de células T específicas para este antígeno [84].

Na colite experimental e esclerose sistêmica, a infusão de MSCs isoladas da medula óssea induziu a apoptose de células T via um mecanismo dependente da interação FAS (receptor FAS) / FASL (Fas ligante) melhorando os sintomas clínicos de ambas as doenças [85]. As células T apoptóticas induziram então a produção de TGF- β nos macrófagos, proporcionando assim o aumento de células Tregs e indução de tolerância imunológica [85]. O tratamento da colite experimental utilizando ADMSCs humanas ou murinas pode melhorar os parâmetros clínicos e histopatológicos da doença pela diminuição da resposta imune de perfil Th1 na mucosa intestinal e linfonodos mesentéricos, sendo esse efeito parcialmente dependente da indução de células Tregs secretoras de IL-10 [86].

No caso de lúpus eritematoso sistêmico, MSCs humanas reduziram a proliferação de linfócitos T, níveis de anticorpos anti-DNA e inibiram a progressão da doença em camundongos de uma maneira dose-dependente [87]. Em outro estudo, a administração de ADMSCs pode aumentar os níveis de GM-CSF, IL-4, e IL-10 no soro e a frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺, sem o desenvolvimento de efeitos adversos, avaliado durante um longo período de tempo pós-tratamento (60 semanas) [88].

As MSCs foram utilizadas com sucesso no tratamento de casos graves de reação do enxerto versus-hospedeiro (REVH) tanto em modelos animais [89] como em humanos [90, 91]. Em um modelo experimental de REVH em camundongos, foi observada uma diminuição no número de células T CD4⁺ e CD8⁺ e proporção

Th1/Th2 combinado a um aumento na frequência de células Tregs após o tratamento com MSCs [92]. Além disso, um estudo clínico de fase II utilizando MSC expandidas *in vitro* mostrou-se como uma terapia efetiva em pacientes com REVH aguda [93].

Dessa forma, a aplicação terapêutica envolvendo a imunomodulação por MSCs é uma alternativa promissora na área de medicina regenerativa para o possível tratamento de diversas doenças autoimunes e processos inflamatórios agudos e crônicos.

1.6 MSCs e o diabetes autoimune tipo 1 (DMT1)

Dentre as diversas doenças autoimunes, destaca-se o *diabetes mellitus* autoimune do tipo 1 (DMT1), que consiste em um processo inflamatório autoimune órgão-específico que resulta na destruição seletiva das células β pancreáticas produtoras de insulina, levando a uma hiperglicemia [94, 95]. Esta doença é o distúrbio crônico-metabólico mais frequente na infância e costuma manifestar-se geralmente abaixo dos 30 anos de idade, concentrando-se no período escolar e na adolescência em 90% dos casos.

O DMT1 é um importante problema de saúde pública mundial, visto que o número de pacientes com diabetes (considerando o *diabetes mellitus* tipo 1 e tipo 2) segundo a Federação Internacional de Diabetes (FID), é estimado em aproximadamente 246 milhões de pessoas. Além disso, no ano de 2025, conforme estimativas da FID, este número aumentará para aproximadamente 380 milhões de casos. De forma importante, o número de óbitos devido a esta doença atingiu 6% do total de óbitos a nível mundial, associado principalmente a doenças cardiovasculares (50% dos casos) [96]. Nos Estados Unidos, estima-se que 20 milhões de pessoas sejam diabéticas (7% da população) sendo que 5-10% dos casos correspondem ao DMT1, segundo informações do CDC (“Center for Disease Control and Prevention”) [97]. A incidência mundial dessa doença é muito variável, podendo atingir valores muito elevados como 36 casos a cada 100.000 indivíduos, em países como Finlândia e

Sardenha [98]. Além disso, estima-se um aumento anual de 3,2% no número de casos mundiais dessa doença, principalmente entre crianças e adolescentes [99]. Dentre as complicações crônicas resultantes do DMT1 destacam-se os problemas cardiovasculares, insuficiência renal, cegueira e úlceras crônicas [100].

No Brasil, não existem dados precisos sobre a incidência desta doença, mas estima-se que corresponda a 5-10% do número total dos casos diagnosticados de diabetes, que no ano de 2005 foi estimado em 8 milhões, existindo assim, cerca de 600 mil portadores desta doença no país [101]. A prevalência anual de DMT1 no Brasil é de aproximadamente 8 casos a cada 100 mil indivíduos [101].

Embora os eventos que controlam o início e a progressão da doença ainda não foram completamente elucidados, a combinação de predisposição genética (poligênica), fatores ambientais (p. ex. infecções virais) e imunológicos podem estar envolvidos em sua patogenia. É importante ressaltar que a maioria dos estudos genéticos, patofisiológicos e imunológicos foram realizados em modelos animais para esta doença, destacando-se o rato BB (*Biobreeding*) e o camundongo NOD (*non-obese diabetic*).

Esta doença é caracterizada por um processo autoimune mediado por células T CD4⁺ efectoras com um perfil do tipo Th1 [102]. Durante o seu desenvolvimento ocorre a infiltração nas ilhotas pancreáticas de células T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B e macrófagos, resultando em um processo inflamatório denominado insulite [102, 103]. Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ reagem então contra os auto-antígenos expressos nas células β pancreáticas, causando a lise destas células, ou induzindo a apoptose por meio da ação de citocinas [104, 105].

A ativação dos linfócitos T auto-reativos requer a apresentação de auto-antígenos através de moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe II [106]. Assim, auto-antígenos provenientes de células β são apresentados por células apresentadoras de antígeno (APCs) às células T naïve auto-reativas nos linfonodos pancreáticos (LPs), ativando uma resposta imune de perfil Th1. Neste sentido, foi mostrado que a remoção de LPs de camundongos NOD pré-diabéticos

conferiu proteção contra a formação do processo de insulite nas ilhotas pancreáticas [107]. Após a ativação, os linfócitos T CD4⁺ produzem citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que induzem a apoptose das células β [105]. O tratamento de camundongos NOD (do inglês, “*non-obese diabetic*”), modelo experimental de DMT1, com anticorpo anti-IFN- γ pôde prevenir o desenvolvimento da doença [108]. Além disso, a expressão desta citocina em linhagens de camundongos resistentes ao diabetes autoimune resultou no desenvolvimento da doença [109]. A citocina IL-1 β , produzida principalmente por macrófagos ativados, induz a expressão da enzima óxido nítrico sintase, ativando assim a síntese de óxido nítrico e radicais livres de oxigênio, levando a morte celular dessas células [110]. Além disso, foi mostrado que a combinação *in vitro* de IL-1 β , IFN- γ e TNF- α aumenta a vulnerabilidade da célula β a resposta autoimune [111].

Recentemente, um estudo que analisou o pâncreas de pacientes com o desenvolvimento recente de DMT1 mostrou a presença de células T CD8⁺ e CD68⁺ presentes no infiltrado mononuclear [112]. Assim, a morte celular decorrente da insulite é causada principalmente pelo contato direto das células β com macrófagos e linfócitos T ativados (apoptose mediada pela interação Fas/FasL) e/ou exposição a mediadores solúveis secretados por essas células [104, 105, 113], como citocinas (IL-1 β , IFN- γ e TNF- α), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) [105, 114].

Além da imunidade celular, os pacientes com DMT1 podem produzir autoanticorpos considerados como específicos ou relacionados à doença, destacando-se os anticorpos anti-insulina, anti-tirosina fosfatase (anti-IA2) e anti-descarboxilase ácida glutâmica (anti-GAD65), sendo que os mesmos podem ser utilizados para predição do desenvolvimento da doença [115, 116].

O processo autoimune no DMT1 é também composto de componentes reguladores, destacando-se as células Tregs, importantes para a supressão da ativação da resposta imune, mantendo assim a homeostase e tolerância aos antígenos próprios [117]. A redução da frequência das Tregs pela ruptura da interação das

moléculas B7/CD28 acentuou o desenvolvimento do diabetes autoimune em camundongos NOD [118] enquanto a expansão dessas células nos linfonodos pancreáticos (LPs) foi correlacionada com a proteção ao desenvolvimento da doença [119]. De forma interessante, diversas terapias de sucesso utilizando este modelo experimental mostraram uma correlação entre a melhora do DMT1 e o aumento na frequência de Tregs [120-122].

Atualmente, as estratégias de tratamento padronizadas para o controle do DMT1 são baseadas na administração de insulina e monitoramento da glicose sanguínea. Além disso, estratégias utilizando o transplante de pâncreas ou ilhotas pancreáticas têm sido realizadas e representam uma alternativa terapêutica promissora para prevenção das complicações crônicas renais e neurológicas [123, 124]. No entanto, os custos elevados, a necessidade de terapia imunossupressora e seus eventuais efeitos adversos, assim como a quantidade limitada de doadores disponíveis, têm dificultado essa terapêutica. Dessa forma, a busca por novas terapias seguras e efetivas para a prevenção e/ou reversão do DMT1 tornou-se um desafio a ser alcançado. Entre as várias possibilidades destacam-se as MSCs, devido ao seu potencial supressor/regulador e regenerativo. Nos últimos anos, o efeito terapêutico dessas células, derivadas da medula óssea (BM-MSCs), na prevenção e reversão do DMT1 foi avaliado em diferentes modelos experimentais para esta doença [125-132].

O tratamento do diabetes experimental induzido por estreptozotocina com BM-MSCs singênicas administradas pela via endovenosa em ratos diabéticos aumentou a expressão de insulina e PDX-1 (do inglês, "*pancreatic and duodenal homeobox 1*"), um fator de transcrição relacionado ao desenvolvimento, diferenciação e homeostasia das células β , no pâncreas dos animais [125]. Além disso, um aumento na frequência de células CD4+Foxp3+ e nos níveis de IL-10 e IL-13 após o tratamento foram observados [125]. Em outro estudo, a administração de MSCs humanas em camundongos NOD/SCID diabéticos diminuiu a glicemia e aumentou o número de células β produtoras de insulina após o tratamento [126].

Interessantemente, células mononucleares da medula óssea (BMCs) contribuíram para o efeito terapêutico das MSCs no tratamento do diabetes experimental. A combinação de 10^6 BMCs + 10^5 MSCs no tratamento de camundongos diabéticos pode restabelecer a glicemia e a concentração de insulina no soro a níveis normais, além de promover uma eficiente regeneração pancreática. Esse efeito terapêutico foi associado à supressão de linfócitos T específicos para antígenos presentes nas células β , garantindo assim a sobrevivência e a manutenção de ilhotas pancreáticas funcionais [133].

A administração de BM-MSCs alogênicas também pôde reverter temporariamente a hiperglicemia em camundongos NOD diabéticos, diminuindo o infiltrado celular inflamatório (insulite) de linfócitos T e B nas ilhotas pancreáticas após o tratamento [127]. Neste mesmo modelo experimental, o tratamento com BM-MSCs singênicas isoladas a partir da medula óssea de camundongos NOR também reverteu a hiperglicemia, sendo este efeito mantido por até 12 semanas após o tratamento [129]. De forma interessante, uma diminuição na frequência de macrófagos (F4/80+), células T CD4+ e T CD8+ efectoras e um aumento na frequência de células dendríticas plasmocitóides no linfonodos pancreáticos foram observados após o tratamento [129].

As propriedades imunomoduladoras das MSCs na prevenção do desenvolvimento do DMT1 também foram avaliadas em camundongos NOD. A administração de MSCs alogênicas em camundongos NOD com 4 semanas de idade diminuiu a incidência do diabetes autoimune nos animais transplantados, observando-se uma redução na capacidade de células T diabetogênicas em infiltrar as ilhotas pancreáticas e promover o desenvolvimento da doença, assim como uma indução de células Tregs produtoras de IL-10 [128].

Nos últimos anos, as ADMSCs, que podem ser isoladas a partir do tecido adiposo e expandidas *in vitro*, tornaram-se uma fonte atrativa de MSCs para terapia celular. Além disso, foi mostrado que as ADMSCs podem suprimir a resposta imune de linfócitos T em diversos modelos experimentais de doença autoimune, como

artrite induzida por colágeno, colite e encefalomielite autoimune experimental [81, 86, 134]. No entanto, o efeito supressor/regulador das ADMSCs na melhora do DMT1 permanece amplamente inexplorado, assim como o mecanismo de atuação dessas células no tratamento dessa doença. No presente estudo, a nossa hipótese foi que as ADMSCs poderiam melhorar o desenvolvimento recente do diabetes autoimune em camundongos NOD diabéticos promovendo seu efeito terapêutico via inibição da resposta mediada por células T CD4⁺ de perfil Th1 pró-inflamatório concomitantemente a expansão de células Tregs.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar as propriedades imunomoduladoras das ADMSCs alogênicas no tratamento do diabetes autoimune experimental em camundongos NOD.

2.1 Objetivos específicos

- a) Isolar e caracterizar as MSCs a partir de tecido adiposo (ADMSC);
- b) realizar o tratamento de camundongos NOD recém-diabéticos com ADMSC;
- c) avaliar a glicemia, glicosúria, teste de tolerância à glicose e níveis de insulina após o tratamento;
- d) quantificar diversos hormônios associados à melhora do diabetes autoimune no soro dos animais tratados;
- e) avaliar o infiltrado celular inflamatório (insulite), a expressão de insulina e PDX-1 nas ilhotas pancreáticas;
- f) analisar a frequência da população de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e TNF- α e células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) nos linfonodos pancreáticos;
- g) verificar a expressão do fator de transcrição *Helios* nas células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ para caracterização entre Treg natural ou induzida;
- h) avaliar os níveis das citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α e TGF- β no pâncreas;
- i) estudar o “homing” das ADMSCs para os linfonodos pancreáticos e pâncreas 18 h e 72 h após serem administradas por via intraperitoneal em camundongos diabéticos;
- j) avaliar a manutenção do efeito terapêutico por um longo período de tempo (12 semanas) após a primeira administração das ADMSCs assim como a insulite e expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas;
- k) avaliar a capacidade da expansão de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ pelas ADMSC após co-cultivo *in vitro*, assim como os mecanismos envolvidos neste processo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Animais: Os animais NOD (H2-A^{g7}) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Alvaro Pacheco e Silva Filho da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais Balb/c (H2-A^d) foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade de São Paulo (USP). Antes e após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acondicionados em microisoladores coletivos, contendo no máximo cinco animais, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22 °C e com suprimentos de água e alimento autoclavados disponíveis todo o tempo. Os animais C57BL/6 Foxp3-GFP “*knock in*” (KI) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Alexandre Salgado Basso da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em experimental animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

3.2 Isolamento e caracterização das ADMSC

3.2.1 Isolamento das ADMSC a partir de tecido adiposo murino

As ADMSC foram obtidas do tecido adiposo supra-epididimal (região abdominal) de camundongos Balb/c machos (n=10) conforme o método descrito por Cho [135]. O tecido adiposo foi extensivamente lavado com PBS pH 7,4 (2,7 mM NaCl, 8 mM KCl, Na₂HPO₄ and 1,4 mM KH₂PO₄) e posteriormente submetido à digestão com colagenase tipo IA (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) a 37 °C por 30 min. A atividade enzimática foi neutralizada pela adição de meio DMEM *low-glucose* (DMEM; Gibco, Grand Island, EUA) contendo 10% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, EUA) e a amostra foi centrifugada por 300 g por 10 min seguido da lise de eritrócitos utilizando-se um tampão de lise (55 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1

mM EDTA - pH 7,4). O precipitado foi filtrado em membrana de nylon de 70 μ m para remoção de debris celulares e as células obtidas então incubadas a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ em meio de cultivo (DMEM *low-glucose*, 10% SBF, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina, Sigma-Aldrich) em garrafas de 75 cm³. Após 72h, as células foram então lavadas utilizando-se PBS para remoção de células residuais não aderentes. A população celular resultante foi cultivada por uma semana e quando a monocamada celular atingiu a confluência de 80%, um sub-cultivo foi realizado por tratamento com 0,05% tripsina - 0,53 mM EDTA (Gibco). A cada passagem 1/2 das células foi transferida para uma nova garrafa. As células foram usadas até a passagem 12.

3.2.2 Caracterização fenotípica

A caracterização imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo nas células na quinta passagem (P5) sendo estudadas as moléculas CD105, CD90, CD44, CD73, CD45, CD11c, CD11b e CD34 em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD, San Jose, Estados Unidos). Os dados foram representados como histograma utilizando o software FlowJO 7.5 (Tree Star, Ashland, EUA) sendo a população celular positiva compensada pelos controles isotípicos para os anticorpos monoclonais ligados aos determinados fluorocromos.

3.3.3 Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica

Para a caracterização funcional das ADMSCs foram empregados três testes de plasticidade: diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica baseando-se em protocolos previamente descritos [15, 135, 136].

Diferenciação adipogênica - As ADMSCs foram cultivadas em placas de 24 poços na densidade de 6×10^4 células/poço até atingirem confluência em 100%. Neste ponto, foi adicionado o meio de indução adipogênica que consiste em meio DMEM

low-glucose suplementado com 1 μ M de dexametasona, 0,5 mM de indometacina, 10 μ g/ml de insulina, 100 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma-Aldrich) e 10% SBF por 3 dias. Como controle negativo, as células foram cultivadas somente em meio DMEM *low-glucose* 10% SBF. O meio de indução foi trocado a cada 3 dias e após 10 dias de cultivo as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e submetidas à coloração de *Oil Red O* para evidenciar vacúolos lipídicos em vermelho.

Diferenciação osteogênica - Para a diferenciação osteogênica das ADMSC o kit de diferenciação osteogênica para células mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis kit*, Millipore, Billerica, EUA) foi utilizado, conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram cultivadas em placas de 24 poços revestidas com vitronectina e colágeno tipo I na concentração de 12 μ g/ml em meio contendo 100 nM dexametasona, 10 mM de glicerol-2-fosfato e 0,05 mM de ácido ascórbico 2-fosfato por 21 dias, sendo o meio de cultura trocado a cada 3-4 dias. No 21º dia de indução, as células foram fixadas por 1h com etanol 70% gelado seguido da coloração de *Alizarin Red S* para evidenciar a presença de cálcio na matriz óssea em vermelho.

Diferenciação condrogênica – as ADMSC foram diferenciadas em meio específico para diferenciação em condrócitos contendo 6,5 μ g/ml de insulina (Sigma-Aldrich), 10 ng/ml de TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, EUA) e 50 nM de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma-Aldrich) durante 21 dias sendo o meio trocado a cada 3-4 dias. Após esse período, foi realizada a coloração de Safranina O (Sigma-Aldrich) para evidenciar a matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos em vermelho.

3.3.4 Inibição da proliferação de células T CD4+ por ADMSC

A propriedade de inibição da proliferação de linfócitos T CD4+ pelas ADMSC foi avaliada co-cultivando essas células com linfócitos T CD4+ isolados por seleção positiva do baço de camundongos C57BL/6 utilizando-se microesferas magnéticas (L3T4, Miltenyi Biotech, Auburn, EUA) estimulados com anti-CD3 (1 μ g/ml) e anti-

CD28 (2 µg/ml) (ambos da Biolegend, San Diego, EUA) por 4 dias. A proliferação dos linfócitos T CD4⁺ foi verificada por citometria de fluxo utilizando-se o kit de proliferação CellTrace™ Violet (Molecular Probes, Eugene, EUA) conforme recomendações do fabricante.

3.3 Citometria de fluxo

3.3.1 Detecção da produção intracelular de citocinas

As células foram obtidas do baço ou linfonodos pancreáticos (LPs) para análise por citometria de fluxo. Para isso, o baço ou LPs dos animais foram macerados com o êmbolo de uma seringa em uma placa de *petri* e a suspensão celular obtida foi então centrifugada a 300 g por 5 minutos para obtenção de um *pellet* celular. As hemácias foram então lisadas e seguido da contagem das células vivas pelo método de azul de Tripan 0.4% em PBS em câmara de Neubauer. Para a análise da produção intracelular de citocinas, 1 x 10⁶ células foram estimuladas *in vitro* por 5 h a 37 °C em atmosfera de CO₂ (5%) pela adição de phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 100 ng/ml) e ionomicina (1 µg/ml) na presença de brefeldina A (1 µg/ml) (todos adquiridos da Sigma-Aldrich) em meio RPMI 10% SBF. Após esse período, as células foram centrifugadas a 300 g por 5 min e lavadas pela adição de 500 µl de tampão FACS (2% de soro bovino fetal e 0,02% azida sódica em PBS) seguido de uma nova centrifugação. As células foram então incubadas por 30 minutos a 4 °C na presença do anticorpo anti-CD4 PerCP (1:100) (eBioscience, San Diego, EUA) seguido da permeabilização utilizando-se o kit BD *Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization* (BD Biosciences). A marcação intracelular de TNF-α e IFN-γ foi realizada utilizando-se os anticorpos anti-TNF-α APC (1:100) (Biolegend) e anti-IFN-γ FITC (1:100) (Biolegend), respectivamente.

3.3.2 Imunofenotipagem de células T reguladoras

As células foram obtidas do baço ou LPs conforme descrito previamente. Para a determinação da frequência de células T reguladoras, inicialmente a marcação das moléculas de superfície foi realizada incubando 1×10^6 células por 30 minutos a 4°C na presença dos anticorpos CD4 (PerCP) e CD25 (FITC). Após a incubação, 500 µl de tampão FACS foram adicionados as amostras e as mesmas centrifugadas a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e os tubos foram agitados no vórtex por 5 segundos para o desprendimento das células. A marcação do fator de transcrição intracelular Foxp3 foi então realizada utilizando-se o kit APC *anti-mouse/rat Foxp3 staining* (eBioscience), conforme recomendações do fabricante. Após a marcação, as células foram suspendidas em 300 µl de tampão FACS e 80.000 eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo (FACSCanto II).

3.4 Modelo de diabetes autoimune experimental em camundongos NOD e protocolo de tratamento com ADMSC

Para o estudo das propriedades imunomoduladoras das ADMSC *in vivo* foi utilizado o modelo experimental de diabetes autoimune experimental em camundongos NOD (*non-obese diabetic*) [137]. A glicemia foi verificada no sangue obtido da extremidade da cauda em fêmeas a partir da 12ª semana de idade, semanalmente, até a 30ª semana de idade utilizando-se o glicosímetro Accu-Chek Advantage (Roche, Mannheim, Alemanha). Os animais foram considerados diabéticos quando o valor da glicemia foi maior que 240 mg/dl por duas vezes consecutivas [130]. Para o tratamento dos animais, 1×10^6 ADMSC foram suspendidas em 200 µl de PBS e administradas pela via intraperitoneal (i.p.) em fêmeas NOD diabéticas (n=9) nos dias 0, 7 e 14. Além disso, um grupo controle de camundongos diabéticos (n=7) foi injetado com PBS (controle negativo). Além disso, as fêmeas que não desenvolveram diabetes (hiperglicemia) foram utilizadas como controles normoglicêmicos (n=5). Os valores de glicemia foram determinados

semanalmente após o tratamento por 28 dias, sendo a eutanásia dos animais realizada no dia 35. Em outro grupo experimental, para avaliar a manutenção do efeito terapêutico por um longo período de tempo, a eutanásia dos animais foi realizada 12 semanas após a primeira administração das ADMSCs (n=9 grupo tratado; n= 15 grupo controle diabético).

3.5 Teste de tolerância a glicose

Após 12 h de jejum foi realizado o teste de tolerância a glicose nos animais tratados ou não com ADMSC, assim como nos animais normoglicêmicos, 32 dias após o tratamento. A solução de glicose foi administrada na cavidade intraperitoneal na concentração de 1,5 mg por grama de animal (em PBS) e a glicemia monitorada antes da injeção de glicose, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração. O sangue foi coletado a partir da extremidade da cauda de cada animal nos determinados períodos de tempo e os níveis de glicose determinados utilizando-se o glicosímetro Accu-Check Advantage (Roche).

3.6 Análise histológica e imunohistoquímica

Cortes histológicos do pâncreas embebido em parafina de 5 µm foram realizados utilizando-se um micrótomo, seguido da coloração de hematoxilina e eosina (HE). A quantificação do infiltrado celular inflamatório (escore de insulite) nas ilhotas pancreáticas foi determinando pela contagem de aproximadamente 60 ilhotas/grupo experimental provenientes de 5 animais/grupo utilizando-se a seguinte classificação: 0% (ausência de infiltrado celular), 0-25%, 25-50%, > 50% e 100% de insulite em cada ilhota, conforme descrito previamente [138, 139].

A expressão de insulina e do fator de transcrição PDX-1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) foi verificada pela técnica de imunohistoquímica utilizando-se os anticorpos anti-insulina (anti-mouse insulin, diluição 1:400; C27C9, Cell

Signalling, Danvers, EUA) e anti-PDX-1 (anti-mouse PDX-1, diluição 1:500, ab47267, Abcam, Cambridge, EUA), respectivamente, conforme recomendações do fabricante. Para o desenvolvimento da reação foi utilizado o kit *Envision Dual Link System-HRP* (Dako, Glostrup, Dinamarca), de acordo com recomendações do fabricante. Após a reação, foi realizada a contra coloração das lâminas pela coloração HE.

3.7 Separação de células T CD4+

As células T CD4+ foram isoladas do baço de animais C57BL/6 Foxp3 GFP *knock in* (KI) utilizando-se microesferas magnéticas que se ligam a molécula de CD4 (L3T4, Miltenyi) nos linfócitos T. O baço foi macerado utilizando-se o êmbolo de uma seringa de 1 ml e a suspensão celular obtida foi então centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos para obtenção do *pellet* celular. As células foram suspendidas em um tampão de separação (PBS, 0,5 % de soro-albumina bovina – BSA e 2 mM EDTA seguido do procedimento de separação em coluna LS (Miltenyi), conforme recomendações do fabricante. Ao final do processo, a pureza das células foi verificada por citometria de fluxo, sendo $\geq 90\%$.

3.8 Separação de células T CD4+62L+Foxp3- e CD4+Foxp3+ por FACS (“*fluorescence activated cell sorting*”)

O processo de separação de células T CD4+ naïve (CD4+62L+Foxp3-) e células T CD4+Foxp3+ a partir do baço e linfonodos de camundongos C57BL/6 Foxp3-GFP KI foi realizado por FACS. Inicialmente, um enriquecimento da população de células T CD4+ foi realizada utilizando-se de microesferas magnéticas. Após esse procedimento, as células foram marcadas para as moléculas CD4 e CD62L e submetidas ao processo de separação celular no equipamento BD FACS Aria II da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) para separação de células CD4+CD62L+GFP- (Foxp3-) e CD4+GFP+ (Foxp3+). As células obtidas no final do processo de separação apresentaram uma pureza $\geq 99\%$.

3.9 Quantificação de citocinas no extrato pancreático

Os níveis das citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α foram quantificados no lisado pancreático por meio da metodologia de Bio-Plex (*Bio-Plex Cytokine assay kit*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). Para obtenção do lisado de proteínas do pâncreas, uma parte do órgão foi homogeneizada em 1 ml de tampão RIPA (Sigma-Aldrich) contendo inibidores de proteases (Complete Mini EDTA-free cocktail, Roche), utilizando-se um homogeneizador de amostras (Polytron, Littau-Lucerne, Suíça). As amostras foram então centrifugadas a 600 g por 10 min a 4 °C, sendo as citocinas quantificadas nos sobrenadantes obtidos após a centrifugação. A normalização entre as amostras foi realizada utilizando-se a quantidade de proteína total tecidual, determinada pela metodologia de Bradford (DC protein assay, Bio-Rad). Os resultados foram expressos como níveis de determinada citocina (pg)/100 mg de proteína total. Para análise dos dados foi utilizado o software *Bio-Plex Manager* versão 4.0 (Bio-Rad).

3.10 Quantificação de hormônios no soro

Os hormônios GLP-1 (peptídeo-1 semelhante ao glucagon), GIP (polipeptídeo inibitório gástrico), PYY (polipeptídeo Y), amilina, leptina e insulina foram quantificados no soro dos animais utilizando-se o kit *Mouse Gut Multiplex Assay* (Millipore, Billerica, EUA). O sangue foi obtido a partir de punção cardíaca dos animais anestesiados no dia da eutanásia (35 dias após o tratamento). A curva de detecção do método foi de 3.0 pg/ml a 50.000 pg/ml para insulina e leptina, 41.0 a 30.000 pg/ml para GLP-1 e amilina, 3.0 a 2.000 pg/ml para GIP e 7.0 a 5.000 pg/ml para PYY.

3.11 ELISA para TGF- β 1

Os níveis de TGF- β 1 no lisado pancreático e meios condicionados obtidos dos ensaios *in vitro* foram quantificados pela metodologia de ELISA (TGF- β 1 E_{max}[®], Promega, Madison, EUA) de acordo com recomendações do fabricante. Por meio desta técnica, a quantidade de TGF- β 1 total e biologicamente ativo pôde ser detectada em uma faixa de 15.6 a 1.000 pg/ml sendo os resultados expressos como: quantidade de TGF- β 1 (pg)/100 mg de proteína total quantificada nos lisados pancreáticos.

3.12 “Homing” das ADMSC após administração em camundongos NOD

A detecção *in vivo* do “homing” das ADMSC administradas pela via intraperitoneal (i.p.) para outros tecidos foi realizada utilizando-se as técnicas de citometria de fluxo (para o baço, linfonodo pancreático e lavado peritoneal) e imunofluorescência (para o pâncreas), baseando-se nos estudos de Fiorina et al. (2009) [127] e Madec et al. (2009) [128]. Para isso, 2×10^6 ADMSC foram marcadas por 10 min a 37 °C com CFSE 5 μ M (5,6-carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester, Molecular Probes) e injetadas i.p. em camundongos NOD diabéticos. A presença de células CFSE+ foi então pesquisada 18 h e 72 h após a administração das ADMSC CFSE+ no baço, lavado peritoneal e linfonodos pancreáticos, por citometria de fluxo e no pâncreas, por imunofluorescência. Fêmeas NOD diabéticas não tratadas com ADMSC foram utilizadas para verificar e considerar a autofluorescência basal de cada tipo tecidual. Um total de 500.000 eventos foi adquirido para cada amostra utilizando-se o citômetro FACS Canto II. Além disso, cortes congelados do pâncreas de 6 μ m de diâmetro foram realizados no criostato para análise por imunofluorescência.

3.13 Expansão/proliferação *in vitro* de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ por ADMSC

Para determinar a capacidade das ADMSCs em expandir células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ *in vitro*, linfócitos T CD4⁺ foram isolados a partir do baço de camundongos C57BL/6 Foxp3-GFP KI por meio de microesferas magnéticas (CD4 microbeads, L3T4, Miltenyi Biotec). As células T CD4⁺ totais (1×10^6) foram co-cultivadas com ADMSCs (1×10^5) em placas de 6 poços na proporção de 10:1 na presença de IL-2 (50 U/ml). Para estudar a necessidade de contato celular entre os linfócitos T CD4⁺ e as ADMSCs, as células foram co-cultivadas em um sistema de transwell (Millipore), sendo separadas por uma membrana de 3 µm de diâmetro. A proliferação dos linfócitos T CD4⁺ foi verificada utilizando-se o kit de proliferação celular *Cell Trace™ Violet* (Molecular Probes). A frequência e a proliferação de células CD25⁺Foxp3⁺, no *gate* de linfócitos T CD4⁺, na presença ou ausência de ADMSCs, foi analisada após 4 dias por citometria de fluxo. Para bloqueio do receptor PD-L1 foi utilizado o anticorpo neutralizante anti-PD-L1 (Biolegend, clone 10F.9G2) na concentração de 0,2 a 5 µg/ml [140].

3.14 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão (SEM). A diferença entre os grupos experimentais foi determinada utilizando-se os testes t de Student, para comparação entre dois grupos experimentais, ou ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey-Kramer), para comparação entre vários grupos experimentais. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad PRISM® 4.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e caracterização das ADMSCs

As ADMSCs foram isoladas a partir do tecido adiposo de camundongos Balb/c machos conforme protocolos previamente descritos [135, 141]. As células aderentes apresentaram uma morfologia fusiforme (Figura 2A) sendo possível observar a formação de unidades formadoras de colônia de fibroblastos (CFUs), propriedade característica de células-tronco mesenquimais (Figura 2B) [21, 142]. De acordo com a “*International Society for Cellular Therapy*”- ISCT, para uma célula ser caracterizada MSC, três características devem ser avaliadas: expansão *in vitro* como células aderentes, imunofenotipagem e potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica [143]. Assim, a multipotencialidade das ADMSCs foi verificada pela capacidade de diferenciação em linhagens celulares de origem mesodérmica: osteogênica, adipogênica e condrogênica, utilizando-se métodos preconizados para diferenciação *in vitro* MSCs [23]. As ADMSCs puderam ser diferenciadas *in vitro* para as linhagens de origem mesodérmica: adipócitos (Figura 2C), condrócitos (Figura 2D) e osteócitos (Figura 2E).

A expressão de moléculas de superfície características de MSCs foi verificada por meio de citometria de fluxo. Na imunofenotipagem, as células mostraram-se positivas para as moléculas CD105, CD90, CD44 e CD73, características de MSCs, e negativas para marcadores característicos de células hematopoiéticas e endoteliais (CD45 e CD34, respectivamente) conforme mostrado na figura 2F. De forma importante, as células não apresentaram positividade para as moléculas CD11b (macrófagos) e CD11c (células dendríticas). Além disso, as ADMSCs inibiram a proliferação de linfócitos T CD4⁺ estimulados com anti-CD3 e anti-CD28, demonstrando um potencial imunossupressor, característico das MSCs (Figura 2G).

Figura 2 - Isolamento e caracterização das ADMSCs.

A) Coloração de hematoxilina evidenciando células aderentes com formato fusiforme ou fibroblastóide obtidas durante a primeira semana de cultivo *in vitro* após o isolamento. Aumento de 100X. B) Microscopia de contraste de fase mostrando na ponta da seta uma unidade formadora de colônia de fibroblastos (CFU) característica de MSCs. Aumento de 200X. C) Diferenciação adipogênica: coloração de Oil Red O realizada após 10 dias de cultivo em meio de diferenciação adipogênica. c: controle negativo. Em vermelho, verifica-se a presença de gotículas de gordura presente em adipócitos. Aumento de 400X. D) Diferenciação condrogênica: coloração de Safranina O realizada após 21 dias de cultivo em meio de indução condrogênica. O acúmulo de matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos foi verificado pela forte coloração em vermelho. c: controle negativo. Aumento de 200X. E) Diferenciação osteogênica: coloração de vermelho de alizarina (Alizarin Red S) para depósitos de cálcio após 21 dias de cultivo das ADMSCs em meio de diferenciação osteogênica. c = controle negativo. Aumento de 200X. F) Caracterização imunofenotípica para detecção de moléculas de superfície características de células-tronco mesenquimais (CD105, CD90, CD44 e CD73) e ausência da expressão de marcadores hematopoiéticos e endoteliais (CD45, CD11c, CD11b, CD34). G) Histograma representativo da inibição da proliferação de linfócitos T CD4⁺ ativados por anti-CD3 e anti-CD28 na presença de ADMSCs. p.i.= índice de proliferação.

Fonte: Bassi [144].

4.2 Modelo de diabetes autoimune experimental em camundongos NOD

Para estudar as propriedades imunomoduladoras das ADMSCs em condições patológicas em um processo de autoimunidade, o modelo de diabetes autoimune experimental em camundongos NOD foi implantado em nosso laboratório. Essa linhagem de camundongos é o modelo experimental mais ideal para o estudo do DMT1 humano, sendo que os animais desenvolvem uma autoimunidade espontânea, resultando na destruição das células β pancreáticas [137]. Inicialmente, a glicemia foi monitorada semanalmente em camundongos NOD fêmeas da 10^a a 30^a semana de idade e os animais foram considerados diabéticos quando os valores de glicemia foram maiores que 240 mg/dl por duas vezes consecutivas. A incidência de diabetes em fêmeas em nossa colônia até a 30^a semana foi de 75%, sendo que a maioria dos casos de hiperglicemia foi detectada entre 18 a 22 semanas de idade (Figura 3A). A análise histológica do pâncreas revelou um intenso infiltrado celular inflamatório nas ilhotas pancreáticas, processo denominado de insulite, a partir da 12^a semana de idade (Figura 3B). Nos animais hiperglicêmicos também foi possível observar a presença de lesão renal, evidenciada por um aumento nos espaços da região glomerular e túbulos disformes (Figura 3F).

Além disso, a frequência de células T CD4⁺ produtoras de TNF- α e IFN- γ nos linfonodos pancreáticos (LPs) foram determinadas em diferentes estágios de desenvolvimento da doença. Para isso, um grupo de camundongos pré-diabéticos (6 semanas de idade), normoglicêmicos (12-14 semanas de idade) e diabéticos foram comparados (n=4-6/grupo experimental). A frequência de células CD4⁺TNF- α ⁺ (Figura 3C e 3E) e CD4⁺IFN- γ ⁺ (Figura 3D e 3E) foi maior no LP do grupo diabético quando comparado ao grupo normoglicêmico e pré-diabético, confirmando assim o perfil Th1 pró-inflamatório das células T CD4⁺ neste modelo experimental, observado em outros estudos [145, 146].

Figura 3 - Modelo experimental de diabetes autoimune experimental em camundongos NOD.

A) A glicemia foi determinada uma vez por semana em animais NOD fêmeas (n=12) da 10^a a 30^a semana de idade. A incidência da doença até 30 semanas de idade foi de 75%. Em vermelho são mostrados os animais hiperglicêmicos que desenvolveram hiperglicemia no período estudado e em preto os animais que permaneceram normoglicêmicos até a 30^a semana de idade. B) Coloração de hematoxilina-eosina (HE) no pâncreas em diferentes estágios do desenvolvimento da diabetes autoimune mostrando um intenso infiltrado celular inflamatório nas ilhotas pancreáticas conforme o decorrer do desenvolvimento da doença. C e D) Produção de citocinas de perfil Th1 pró-inflamatório por linfócitos T CD4+ obtidos a partir do linfonodo pancreático (LP) de fêmeas NOD em diferentes estágios da doença. *Density-plots* representativas das frequências (%) de células T CD4+TNF-α+ (C) e CD4+IFN-γ+ (D) mostrada em E. F) Coloração de HE em rins provenientes de animais Balb/c (controle) e NOD diabéticos hiperglicêmicos. Aumento de 400X.

Fonte: Bassi [144].

4.3 Tratamento com ADMSCs reverte a hiperglicemia em camundongos NOD recém-diabéticos

Para avaliar a capacidade das ADMSCs em reverter a hiperglicemia em camundongos recém-diabéticos, 1×10^6 ADMSCs (grupo tratado) ou PBS (grupo não tratado) foram administradas nos dias 0, 7 e 14 pela via intraperitoneal em camundongos NOD diabéticos. A média dos valores de glicemia no início do tratamento foi semelhante entre os grupos ($p=ns$).

O tratamento com ADMSCs reverteu a hiperglicemia em 80% dos animais tratados 28 dias após o tratamento (7 de 9 animais) conforme mostrado na figura 4A. Os valores de glicemia dos animais na ausência de jejum foram mais baixos no grupo tratado (Figura 4A) quando comparados ao grupo não tratado (Figura 4B), que permaneceram hiperglicêmicos durante todo o período analisado. Além disso, a área sobre a curva correspondente ao período de 28 dias foi menor para os animais tratados (Figura 4C). Para obter uma melhor avaliação da atenuação da hiperglicemia obtida pelo tratamento com ADMSCs, os níveis de glicemia após 12 h de jejum foram determinados 32 dias após o tratamento. Interessantemente, no grupo tratado, os níveis de glicemia após o jejum foram menores, próximos a normoglicemia, quando comparados ao grupo não tratado ($147.8 \text{ mg/dl} \pm 25.0$ grupo tratado vs $487.3 \text{ mg/dl} \pm 8.5$ grupo não tratado, $p<0,001$) conforme mostrado na figura 4D.

Figura 4 - Tratamento com ADMSC reverte a hiperglicemia de camundongos NOD recém-diabéticos.

A) Curva glicêmica na ausência de jejum dos animais tratados com ADMSC. Linhas em preto: animais que apresentaram uma redução nos valores de glicemia após o tratamento (n=7/9). Uma redução da glicemia foi observada principalmente 21 dias após o tratamento com ADMSC. Linhas em cinza: animais que não apresentaram uma redução da glicemia após o tratamento (n=2/9). B) Curva glicêmica do grupo não tratado: um grupo de camundongos diabéticos foi tratado com PBS (n=7) nos mesmos dias da administração de ADMSC no grupo tratado. Região pontilhada e preenchida: denota valores de glicemia abaixo de 240 mg/dl. A média $\pm$ s.e.m. dos valores de glicemia no início do tratamento é mostrada e não diferiu entre os grupos (p=ns). C) Área sob a curva dos níveis de glicemia compreendidos do dia 1 ao 28 após o tratamento. A área sob a curva foi determinada para cada animal e a média $\pm$ s.e.m. para cada grupo é mostrada. D) Glicemia após 12h jejum 32 dias após o tratamento. Níveis mais baixos de glicemia foram detectados em camundongos tratados quando comparado ao grupo não tratado. E) Peso (g) dos animais tratados e não tratados no período de 28 dias após o tratamento. Os resultados são expressos como média $\pm$ s.e.m. **p<0.01, *** p < 0.0001.

Fonte: Bassi [144].

4.4 Teste de tolerância a glicose e glicosúria e aumento nos níveis de insulina após o tratamento com ADMSCs

A avaliação da resposta periférica a glicose foi realizada por meio do teste de tolerância a glicose intraperitoneal (IGTT) no grupo tratado e não tratado. A

tolerância à glicose de um grupo de animais NOD normoglicêmicos também foi adicionada e analisada no teste, para comparar com os animais tratados ou não com ADMSCs.

Conforme mostrado na figura 5A e 5B, os animais que receberam o tratamento com ADMSCs apresentaram uma melhora significativa na resposta à administração de glicose. A glicemia de jejum apresentou valores normoglicêmicos e 60 min após a administração da glicose a mesma retornou aos valores iniciais nos animais tratados, sendo o mesmo não observado para o grupo não tratado. Após 120 min da administração de glicose os valores de glicemia observados foram: $71,7 \pm 23,7$ mg/dl para o grupo tratado com ADMSC, $69,0 \pm 8,2$ mg/dl para o grupo de animais NOD normoglicêmicos e $355,0 \pm 84,2$ mg/dl para o grupo não tratado. Além disso, ao calcular a área sob a curva para o período analisado, uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) foi observada ao comparar o grupo tratado e não tratado (15.388 ± 5.042 vs. 52.135 ± 5.351 , $p < 0,01$) (Figura 5B). Uma melhora significativa na glicosúria também foi observada nos animais após o tratamento (Figura 5C).

Devido ao tratamento promover uma melhora significativa na resposta periférica à glicose, verificado pelo teste de IGTT, foi interessante avaliar os níveis de insulina no soro dos animais. Conforme mostrado na figura 5D, níveis maiores de insulina foram detectados no grupo tratado quando comparados ao grupo não tratado diabético ($552,2 \pm 186,0$ pg/ml vs. $198,5 \pm 38,14$ pg/ml, respectivamente, $p < 0,05$), sendo similares ao do grupo controle normoglicêmico ($462,6 \pm 85,85$ pg/ml).

Figura 5 - Teste de tolerância a glicose administrada por via intraperitoneal e níveis de insulina no soro de animais após tratamento com ADMSCs.

A) Curva glicêmica do teste de tolerância a glicose intraperitoneal realizado 32 dias após o tratamento com ADMSC. Uma dose de 1.5 mg/kg foi administrada por via intraperitoneal e a glicemia determinada 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração (n=5 animais/grupo). B) A área sob a curva correspondente ao tempo de 0 a 120 minutos foi determinada para cada animal e a média $\pm$ s.e.m. de cada grupo é mostrada. C) Níveis de glicose na urina (glicosúria) foram quantificados 28 dias após o tratamento. As amostras de urina foram diluídas em solução fisiológica para que as amostras ficassem dentro dos limites de detecção do glicosímetro. D) Detecção de insulina (pg/ml) por ELISA no soro dos animais eutanizados no dia 35 conforme descrito na Metodologia. Resultados expressos como média $\pm$ s.e.m. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Fonte: Bassi [144].

4.5 Tratamento com ADMSCs promove o aumento de diversos hormônios relacionados à melhora do diabetes autoimune em camundongos NOD

Diversos hormônios, como amilina, GIP e GLP-1 foram descritos como tendo um efeito benéfico para a melhora do quadro clínico de DMT1; assim, os níveis destes hormônios foram quantificados no soro dos animais (Figura 6). Os níveis de amilina, um hormônio peptídico secretado simultaneamente com a insulina pelas

células β , foram mais elevados no grupo tratado comparando-se ao grupo não tratado ($65,33 \pm 8,27$ pg/ml grupo tratado vs. $29,43 \pm 7,54$ pg/ml grupo não tratado, $p < 0,05$) conforme mostrado na figura 6A. De forma interessante, o tratamento com ADMSCs também promoveu um aumento significativo nos níveis de GLP-1 conforme mostrado na figura 6E ($104,5 \pm 25,98$ pg/ml grupo tratado vs. $38,82 \pm 7,55$ pg/ml grupo não tratado, $p < 0,05$).

Figura 6 - Administração de ADMSCs promove aumento de hormônios que contribuem para a melhora do diabetes autoimune.

Os níveis de (A) amilina (pg/ml), (B) leptina (ng/ml), (C) PYY (pg/ml), (D) GIP (pg/ml) e (E) GLP-1 (pg/ml) foram quantificados no soro dos animais 35 dias após o tratamento pela metodologia de *Milliplex*. Os resultados foram expressos como média $\pm$ s.e.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. $n = 5$ /grupo experimental.

Fonte: Bassi [144].

4.6 Tratamento com ADSMC diminui o infiltrado celular inflamatório (insulite) mantendo a expressão de insulina e PDX-1 nas ilhotas pancreáticas

O pâncreas dos animais foi coletado e processado para análise histológica para avaliação da presença de infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas. Para isso, foram analisados os seguintes grupos experimentais: 1 - grupo de camundongos NOD com

6 semanas de idade (onde há um elevado número de ilhotas ainda sem infiltrado celular); 2 - grupo de camundongos NOD normoglicêmicos com idade superior a 12 semanas (considerado pré-diabético); 3 - grupo não tratado com ADMSC e 4 - grupo tratado com ADMSC. Com o objetivo de analisar quantitativamente o resultado obtido, aproximadamente 60 ilhotas de cada grupo experimental foram analisadas individualmente, sendo realizada uma classificação (escore) para cada ilhota, conforme a intensidade de insulite observada: 0%, 0-25%, 25-50%, >50% e 100%. Conforme mostrado na figura 7G nos animais com 6 semanas de idade há ausência de insulite em 85% das ilhotas analisadas. Por outro lado, nos camundongos com idade superior a 12 semanas (pré-diabéticos) esse número cai para 30%. A análise dos grupos 1, 2 e 3 demonstrou um aumento da severidade da insulite conforme o desenvolvimento da doença neste modelo experimental (Figura 7G).

Nas ilhotas pancreáticas dos animais não tratados um escore mais severo de insulite pôde ser observado, sendo que em 45% das ilhotas analisadas, o infiltrado celular recobriu totalmente a área da ilhota (escore de 100% de insulite) (Figuras 7C, 7D e 7G). Por outro lado, o tratamento com ADMSCs promoveu uma redução significativa na insulite quando comparado ao grupo não tratado ($p < 0,0001$), sendo que a maioria das ilhotas analisadas apresentaram ausência de infiltração ou somente peri-insulite (Figuras 7E, 7F e 7G).

Figura 7 - Diminuição do infiltrado celular inflamatório (insulite) nas ilhotas pancreáticas após o tratamento com ADMSCs.

A-F) Análise histológica do pâncreas pela coloração de HE para verificação de insulite nas ilhotas pancreáticas. A) Grupo de camundongos NOD fêmeas normoglicêmicas com 6 semanas de idade. B) Grupo controle normoglicêmico com idade superior a 12 semanas. C e D) Grupo não tratado. E e F) Grupo tratado com ADMSCs. Aumento de 400X. F) Análise quantitativa da insulite nas ilhotas pancreáticas. Foram analisadas aproximadamente 60 ilhotas individualmente para cada grupo experimental sendo realizado um escore conforme a intensidade do infiltrado celular observado: 0% - ausência de infiltrado; 0-25% - peri-insulite ou infiltrado presente em até 25% da área da ilhota pancreática; 25-50% - infiltrado presente entre 25 a 50% da ilhota; >50% - infiltrado que abrange mais de 50% da área da ilhota; 100% - infiltrado celular recobrindo toda a área da ilhota pancreática.

Fonte: Bassi [144].

Devido ao tratamento com ADMSCs reduzir o infiltrado celular nas ilhotas pancreáticas foi interessante analisar a expressão de insulina e do fator de transcrição PDX-1 (do inglês “*pancreatic and duodenal homeobox 1*”), os quais podem indicar a manutenção/sobrevivência de células β funcionais nos animais após o tratamento. Interessantemente, as ilhotas do grupo de animais tratados com ADMSCs apresentaram uma elevada expressão de insulina quando comparadas ao grupo não tratado diabético (Figura 8A e Figura 9; $p < 0,05$). Além disso, as ilhotas do grupo tratado apresentaram uma expressão de PDX-1 similar ao grupo controle normoglicêmico, enquanto no grupo não tratado, a expressão deste fator de transcrição foi pouco detectada (Figura 8B).

Figura 8 - Expressão de insulina e PDX-1 nas ilhotas pancreáticas após o tratamento com ADMSCs.

Análise imunohistoquímica para insulina (A) e PDX-1 (B) realizada no pâncreas de animais tratados com ADMSCs, não tratados e normoglicêmicos (controle). Fotomicrografia representativa de ilhota pancreática após a imunohistoquímica utilizando o kit Envision (DAKO), conforme descrito na metodologia. Aumento de 400X.

Fonte: Bassi [144].

Figura 9 - Quantificação da área positiva para insulina nas ilhotas pancreáticas após o tratamento com ADMSC.

Após realizar a imunohistoquímica, a área positiva para insulina nas ilhotas pancreáticas foi determinada utilizando o software NIS-Elements AR 3.2 (Nikon). Gráfico da análise quantitativa da expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas do grupo tratado, não tratado e normoglicêmico (controle). Resultado expresso como média $\pm$ s.e.m da percentagem da área positiva para insulina/pixel². * $p < 0,05$.

Fonte: Bassi [144].

4.7 Modulação da resposta imune mediada por células T CD4⁺ de perfil Th1 nos linfonodos pancreáticos (LPs) após o tratamento com ADMSC

Devido ao fato do diabetes autoimune ser uma doença caracterizada por uma resposta imune de perfil Th1 foi interessante avaliar se o tratamento com ADMSCs pôde atenuar os elevados níveis IFN- γ e TNF- α produzidos por células T CD4⁺ nos LPs dos animais após o tratamento. Conforme mostrado na figura 10A e 10B, a frequência e o número absoluto de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD4⁺TNF- α ⁺ foi menor nos LPs dos animais tratados quando comparada ao grupo não tratado. Embora o baço dos animais também tenha sido analisado, não verificamos diferença estatisticamente significativa na frequência destas células neste órgão, indicando que o efeito imunossupressor provavelmente tenha ocorrido somente no sítio regulador da resposta autoimune desenvolvida.

Figura 10 - Tratamento com ADMSCs modula a resposta imune Th1 diminuindo a frequência de células T CD4+IFN- γ + e CD4+TNF- α + no LP de camundongos recém-diabéticos.

As células foram obtidas a partir do LP e estimuladas *in vitro* com PMA + ionomicina na presença de brefeldina A por 5h para posterior análise da produção de citocina intracelular por citometria de fluxo. Dot-plots representativos da frequência de células (A) CD4+IFN- γ + e (B) CD4+TNF- α + no gate de células CD4+ no grupo de animais normoglicêmicos (controle), não tratado e tratado, respectivamente. A média $\pm$ s.e.m. é mostrada no interior do gate para cada grupo experimental. C e D) Gráfico representativo da frequência (%) e número absoluto de células CD4+IFN- γ + e CD4+TNF- α +, respectivamente. n=5-8/grupo experimental. Os resultados foram expressos como média $\pm$ s.e.m. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Fonte: Bassi [144].

4.8 Terapia com ADMSCs aumenta a frequência de células T reguladoras nos LPs

As células Tregs são encontradas em órgãos linfóides secundários exibindo uma potente atividade supressora tanto *in vitro* como *in vivo*, inibindo células T autoreativas e mantendo a tolerância imunológica. Essas células suprimem a proliferação de células T CD4+CD25- e células T CD8+, assim como a secreção de IFN- γ [147]. Recentemente, foi mostrado que as células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de expandir células T reguladoras [73]. Assim, para avaliar a hipótese de que o efeito terapêutico do tratamento com ADMSCs poderia estar associado com a expansão de células T reguladoras, a frequência de células T

CD4+CD25+Foxp3+ nos LPs foi analisada nos animais tratados comparando-se com o grupo não tratado e normoglicêmico (controle).

A frequência de células T CD4+CD25+ (Figura 11B) e T CD4+Foxp3+ (Figura 11A e 11C) foi maior no grupo tratado comparada ao grupo não tratado. Além disso, a frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ foi maior no LP dos animais tratados quando comparado ao grupo não tratado ($12,55 \pm 1,22\%$ grupo tratado vs. $5,96 \pm 1,12\%$, $p < 0,01$ grupo não tratado) conforme mostrado na figura 11D.

Figura 11 - Frequência de células Tregs nos LPs de camundongos NOD diabéticos após o tratamento com ADMSCs.

A frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ foi analisada por citometria de fluxo em células obtidas a partir dos LPs. A) *Dot-plots* representativos da frequência de células CD4+Foxp3+ no *gate* de células T CD4+. B, C e D) Gráficos representativos da frequência de células T CD4+CD25+, CD4+Foxp3+ e CD4+CD25+Foxp3+ no *gate* de células T CD4+, respectivamente, para cada grupo experimental. n=5/grupo. Os resultados são mostrados como média ± s.e.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fonte: Bassi [144].

4.9 Tratamento com ADMSCs atenua a resposta imune de perfil Th1 no pâncreas combinada ao aumento da expressão de TGF- β 1 ativo

Após avaliar o efeito imunomodulador das ADMSCs no LP, foi interessante verificar se o tratamento com essas células poderia ocasionar um efeito supressor na resposta autoimune Th1 no pâncreas. Assim, os níveis de citocinas Th1 pró-inflamatórias IL-2, IFN- γ e TNF- α foram quantificadas no lisado pancreático. De forma interessante, uma significativa redução nos níveis de IFN- γ pôde ser observada nos animais após o tratamento comparado ao grupo não tratado ($3,2 \pm 0,89$ pg/100 mg de proteína total no grupo tratado vs. $21,33 \pm 6,38$ pg/100mg de proteína total no grupo não tratado, $p < 0,05$) (Figura 12B). Embora valores menores de IL-2 e TNF- α puderam ser detectados no grupo tratado quando comparado ao grupo não tratado, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 12A e 12C).

O TGF- β 1 é uma citocina supressora associada a melhora da resposta autoimune desenvolvida no DMT1. De forma interessante, níveis aumentados de TGF- β 1 biologicamente ativo puderam ser detectados no pâncreas de animais do grupo tratado comparando-se ao grupo não tratado (6.183 ± 184 vs. 3.590 ± 217 pg/100mg de proteína total, $p < 0.001$) e ao grupo normoglicêmico (3.956 ± 232 pg/100mg de proteína total, $p < 0.001$) (Figure 12D).

Figura 12 - Supressão da resposta imune Th1 e aumento da expressão de TGF- β 1 ativo no pâncreas após tratamento com ADMSC.

Os níveis de IL-2 (A), IFN- γ (B) e TNF- α (C) foram quantificados no lisado pancreático tecidual. A normalização entre as amostras foi realizada pela quantificação de proteína total e os resultados foram expressos como nível de citocina (pg)/100 mg de proteína total. (D) TGF- β 1 total e biologicamente ativo no lisado pancreático tecidual quantificado pela metodologia de ELISA. Os resultados foram expressos como pg TGF- β 1/100 mg de proteína total (média $\pm$ s.e.m.). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Fonte: Bassi [144].

4.10 “Homing” das ADMSCs após administração em camundongos NOD diabéticos

Para o estudo do “homing” *in vivo* das ADMSCs, as células foram previamente marcadas com CFSE (Figura 13B) e administradas por via intraperitoneal em camundongos NOD fêmeas diabéticas. Após um período de 18 h e 72 h, a presença das células CFSE+ foi avaliada no baço, LPs e lavado peritoneal por citometria de fluxo, e no pâncreas, por imunofluorescência.

Conforme mostrado na figura 13C, a presença das ADMSC (CFSE+) foi detectada somente no lavado peritoneal 18h após a administração. No entanto, 72h após a administração, as células puderam ser detectadas tanto no lavado peritoneal quanto nos LPs (Figura 13C). De forma interessante, as ADMSCs expressam os receptores de quimionas CCR4 e CCR7, conforme mostrado na figura 13A, envolvidos com o *homing* para sítios inflamatórios e linfonodos, respectivamente.

Figura 13 - Expressão de CCR4 e CCR7 e “homing” das ADMSCs *in vivo* 18h e 72h após administração em camundongos NOD diabéticos.

A) Expressão dos receptores de quimiocinas CCR4 e CCR7 nas ADMSCs verificado por citometria de fluxo. B) As ADMSC foram marcadas com CFSE e administradas i.p. em fêmeas NOD diabéticas. A frequência de células CFSE+ foi analisada no baço, linfonodos pancreáticos e lavado peritoneal 18h e 72h após a administração por citometria de fluxo. Foram adquiridos 500.000 eventos para cada amostra por meio do citômetro FACS Canto II. O baço, linfonodos e lavado peritoneal de camundongos NOD fêmeas não tratadas (PBS) foram utilizados como controle negativo.

Fonte: Bassi [144].

O pâncreas foi coletado e processado para confecção de cortes congelados (6 μm de espessura) em criostato para análise de imunofluorescência. Conforme mostrado na figura 14, a presença das ADMSCs (CFSE+) pode ser visualizada no pâncreas dos animais tratados 72h após a administração. Assim, constatou-se que as ADMSCs puderam migrar para os LPs e pâncreas de animais diabéticos após a administração sistêmica por via intreaperitoneal.

Figura 14 - “Homing” das ADMSCs *in vivo* para o pâncreas 72h após administração em camundongos NOD diabéticos.

As ADMSC foram coradas com CFSE e administradas i.p. em fêmeas NOD diabéticas. A presença de células CFSE+ foi analisada no pâncreas dos animais 72h após a administração pelo método de imunofluorescência. Amostras de pâncreas de camundongos NOD fêmeas não tratadas foram utilizadas como controle negativo. A coloração de DAPI (do inglês “4’-6-diamidino-2-phenylindole”) foi utilizada como contra-coloração para visualização do núcleo celular. A sobreposição de imagens (*merge*) foi realizada utilizando-se o software ImageJ versão 1.44. A) Controle negativo. B) Representação de diversos cortes histológicos de pâncreas obtidos do grupo de animais tratados com ADMSCs CFSE+. Aumento de 200 X. n= 3 animais/grupo experimental.

Fonte: Bassi [144].

4.11 Expansão de células T reguladoras *in vitro* por ADMSCs

Para o estudo das propriedades imunomoduladoras de expansão de células Tregs por ADMSCs *in vitro*, inicialmente a separação de linfócitos T CD4⁺ foi realizada a partir do baço e linfonodos de animais C57BL/6 Foxp3 GFP KI por meio de microesferas magnéticas. Além disso, para estudos de proliferação celular, as células foram marcadas com o *Cell Trace Violet* (Molecular Probes).

As células T CD4⁺ totais foram então co-cultivadas por 4 dias na presença ou ausência de ADMSCs. Conforme mostrado na figura 15, uma maior frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foi observada após cultivo na presença das ADMSCs em uma maneira dose-dependente.

Figura 15 - Expansão de células T reguladoras *in vitro* por ADMSCs.

Co-cultivo de linfócitos T CD4⁺ com ADMSCs. As células T CD4⁺ foram cultivadas com diferentes quantidades de ADMSC na presença de IL-2 (50U/ml). Após um período de 4 dias, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para determinação da frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. *Density-plot* representativo da frequência de células CD4⁺Foxp3⁺ e CD25⁺Foxp3⁺ no *gate* de linfócitos CD4⁺ de 1 de 3 experimentos independentes.

Fonte: Bassi [144].

Para avaliar se as células T CD4+Foxp3+ sofreram uma expansão/proliferação na presença de ADMSCs, a proliferação celular foi estudada utilizando-se o kit *Cell Trace Violet*. Assim, na presença das ADMSCs pôde-se verificar uma proliferação no *gate* de células T CD4+Foxp3+ e não de células T CD4+Foxp3- (Figura 16A e B), o que provavelmente tenha resultado no aumento da frequência dessas células, observada anteriormente.

Figura 16 - Proliferação de células T CD4+Foxp3+ *in vitro* na presença de ADMSCs.

As células T CD4+ foram marcadas com o *Cell Trace Violet* para análise da proliferação celular e co-cultivadas com ADMSCs na proporção de 10 linfócitos : 1 ADMSCs na presença de IL-2, conforme descrito na metodologia. A) Na presença de ADMSCs, a proliferação/expansão de células T CD4+Foxp3+ e não de células T CD4+Foxp3- pode ser verificada por citometria de fluxo. B) *Density-plot* representativo da proliferação de células CD4+Foxp3+ no *gate* de células CD4+ de maneira dose-dependente.

Fonte: Bassi [144].

Devido a frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ ter sido aumentada na presença das ADMSCs, foi interessante avaliar a expansão/proliferação dessa população celular *in vitro* na presença das ADMSCs. Conforme mostrado na figura 17, uma maior frequência (Figura 17A) e proliferação (Figura 17B e 17C) de células T CD4+CD25+Foxp3+ pôde ser observada na condição em que as células T CD4+ foram co-cultivadas por 4 dias na presença de ADMSCs, de uma maneira dose-dependente.

Figura 17 - Expansão e proliferação de células T CD4+CD25+Foxp3+ após co-cultura com ADMSCs.

Células T CD4+ marcadas com *Cell Trace Violet* (Molecular Probes) foram co-cultivadas com diferentes quantidades de ADMSCs. A) *Dot-plots* representativos da frequência de células CD4+CD25+Foxp3+ obtida após 4 dias de co-cultivo na presença ou ausência de ADMSCs. B) Análise da proliferação celular de células CD4+CD25+Foxp3+. *Density-plot* representativo da frequência de células CD4+CD25+Foxp3+ que proliferaram após 4 dias de co-cultivo com ADMSC. C) Histograma representativo da proliferação de células CD4+CD25+Foxp3+ co-cultivadas por 4 dias na presença ou ausência de ADMSCs.

Fonte: Bassi [144].

4.12 Papel do contato celular na expansão de células T CD4+CD25+Foxp3+ por ADMSCs

Para investigar a importância do contato celular entre os linfócitos T CD4+ e as ADMSCs no mecanismo de expansão/proliferação de células Tregs, as células foram separadas por uma membrana com microporos, evitando assim o contato entre as células (*transwell*). Assim, após 4 dias, uma maior frequência e proliferação de células T CD4+CD25+Foxp3+ foi verificada na condição em que as células foram mantidas em contato (Figura 18A, B e C). Por outro lado, quando as ADMSCs foram separadas dos linfócitos T CD4+ pelo sistema de *transwell*, uma menor frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ pode ser observada (Figura 18C), mostrando a importância do contato celular no mecanismo de expansão de Tregs *in vitro*. Além disso, os níveis de TGF- β 1 ativo foram significativamente maiores na condição em que as células foram co-cultivadas em contato, quando comparados tanto as condições de ausência das ADMSCs, como ao co-cultivo em *transwell* (Figura 18D).

Figura 18 - Papel do contato celular e níveis de TGF- β 1 no mecanismo de expansão de células T CD4+CD25+Foxp3+ por ADMSC.

Células T CD4+ foram co-cultivadas com ADMSC por 4 dias na condição em contato célula-célula ou separadas por uma membrana de 3 μ m de diâmetro para evitar o contato entre linfócitos T CD4+ e ADMSC. A) *Dot-plot* representativo da frequência de células CD25+Foxp3+ no *gate* de células T CD4+. B) Gráfico representativo da frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ (média $\pm$ s.e.m). C) Proliferação de células T CD4+CD25+Foxp3+ verificada por citometria de fluxo utilizando o kit *Cell Trace Violet*. D) Níveis de TGF- β 1 ativo quantificados por ELISA nos meios condicionados obtidos a partir das condições mostradas em A.

Fonte: Bassi [144].

4.13 Expansão de células T CD4+CD25+Foxp3+ por ADMSCs em uma condição de estímulo alogênico

A capacidade das ADMSCs expandirem células Tregs frente a um estímulo alogênico também foi investigada. Para isso, células apresentadoras de antígeno (APCs) ($1,5 \times 10^5$ células) foram isoladas a partir do baço de camundongos Balb/c SCID (do inglês "*severe combined immune deficiency mutation*") e co-cultivadas por 4 dias com linfócitos T CD4+ isolados de camundongos C57BL/6 Foxp3 GFP KI ($1,5 \times 10^5$ células) na presença ou ausência de ADMSCs ($1,5 \times 10^4$ células). Conforme

mostrado na figura 19, a frequência de células CD4+CD25+ e CD4+CD25+Foxp3+ foi maior na presença de ADMSCs.

Figura 19 - Expansão de células T reguladoras por ADMSCs na condição de um estímulo alogênico.

APCs de camundongos Balb/c SCID foram utilizadas como estímulo alogênico para linfócitos T CD4+ isolados de camundongos C57BL/6 Foxp3 GFP KI e co-cultivadas na presença ou ausência de ADMSC por 4 dias. *Dot-plots* representativos da frequência de células CD4+CD25+ e CD25+Foxp3+ no *gate* de células CD4+.

Fonte: Bassi [144].

Além disso, uma maior proliferação de célula T CD4+CD25+Foxp3+ na presença das ADMSCs frente a um estímulo alogênico (APC Balb/SCID) também foi observada (Figura 20) e níveis maiores de TGF- β 1 foram detectados, conforme mostrado na figura 20.

Figura 20 - Análise da proliferação de células T CD4+CD25+Foxp3+ no co-cultivo de células T CD4+ e APCs alogênicas na presença ou ausência de ADMSCs.

Células T CD4+ foram marcadas com Cell Trace Violet e co-cultivadas com APCs alogênicas por 4 dias na presença ou ausência de ADMSC. A) A proliferação de células CD25+Foxp3+ no *gate* de células CD4+ foi analisada por citometria de fluxo. B) *Density-plot* representativo da frequência (%) de células CD4+CD25+Foxp3+ que proliferaram após 4 dias de cultivo. C) Histograma representativo da frequência de proliferação de células CD4+CD25+Foxp3+ na presença ou ausência de ADMSCs após 4 dias de cultivo frente a um estímulo alogênico. D) Detecção de TGF-β1 ativo (pg/ml) por ELISA nos meios de cultura. Resultado expresso como média ± s.e.m. *p<0,05.

Fonte: Bassi [144].

4.14 Expansão de células Tregs *in vitro* por ADMSCs é mediada pela molécula PD-L1

Conforme mostrado previamente na figura 18, a expansão de células Tregs por ADMSCs *in vitro* foi parcialmente dependente do contato celular entre os linfócitos T CD4+ e as ADMSCs, sugerindo o papel de uma molécula de superfície envolvida neste mecanismo. Estudos recentes mostraram o papel da molécula coestimuladora PD-L1 no desenvolvimento, manutenção e função de células Tregs ao interagir com o receptor PD-1 presente nos linfócitos, principalmente em Tregs [148, 149]. Inicialmente, verificamos que as ADMSCs expressam PD-L1 em sua superfície (Figura 21A). Assim, a nossa hipótese foi que essa molécula poderia estar envolvida no mecanismo de expansão de células Tregs pelas ADMSCs *in vitro*. De forma

interessante, o bloqueio dessa molécula, utilizando um anticorpo neutralizante para PD-L1 [140], pode inibir a expansão de células T CD4+Foxp3+ pelas ADMSCs (figura 21B e 21C) de uma maneira dose-dependente (Figura 22).

Figura 21 - ADMSCs promovem a expansão de células Tregs em um mecanismo dependente de PD-L1.

A) Expressão de PD-L1 por ADMSC. Histograma representativo da frequência de células positivas (%) e da mediana da intensidade de fluorescência da molécula PD-L1 em ADMSCs. B) ADMSCs foram co-cultivadas com linfócitos T CD4+ na presença de anticorpos neutralizantes para PD-L1 (clone 10F.9G2) ou isotipo controle. *Density-plot* representativo da frequência de células CD4+Foxp3+ no *gate* de células CD4+ após 4 dias de co-cultivo. C) Gráfico da frequência de células CD4+Foxp3+ correspondente a 3 experimentos independentes (média $\pm$ s.e.m.). * $p < 0,05$.

Fonte: Bassi [144].

Figura 22 - Bloqueio de PD-L1 reverte parcialmente a expansão de células Tregs por ADMSCs de uma maneira dose-dependente.

Células T CD4⁺ foram co-cultivadas com ADMSCs (10:1) na presença de diferentes concentrações (de 0,2 a 5 µg/ml) do anticorpo anti-PD-L1 (clone 10F.9G2) ou isotipo controle. *Density-plots* representativos da frequência de células CD4⁺Fcγp3⁺ e CD4⁺CD25⁺Fcγp3⁺, respectivamente, analisados por citometria de fluxo após 4 dias de cultura celular *in vitro*.

Fonte: Bassi [144].

4.15 Conversão x Expansão/manutenção de células CD4⁺Fcγp3⁺ *in vitro* por ADMSCs

Após verificar a expansão/proliferação de células T CD4⁺CD25⁺Fcγp3⁺ a partir de linfócitos T CD4⁺ totais promovida por ADMSCs, foi interessante avaliar a possibilidade da geração/conversão de células Tregs a partir de células naïve (CD4⁺CD62L⁺Fcγp3⁻) ou somente a expansão/manutenção dessas células por ADMSCs *in vitro*. A separação de células CD4⁺CD62L⁺Fcγp3⁻ e células T CD4⁺Fcγp3⁺ de camundongos C56BL/6 Fcγp3 GFP KI foi então realizada por “*cell sorting*” no equipamento FACS Aria II. A utilização dos linfócitos T CD4⁺ desse camundongo possibilitou a separação de células CD4⁺ GFP⁺ (ou Fcγp3⁺) das células GFP⁻ (ou Fcγp3⁻). As células T CD4⁺62L⁺Fcγp3⁻ e CD4⁺Fcγp3⁺ foram então co-cultivadas com ADMSCs na proporção de 10:1, conforme mostrado na figura 23.

Figura 23 - Co-cultivo de linfócitos T CD4+ com ADMSC.

Microscopia óptica da co-cultura de linfócitos CD4+ com ADMSCs. A) Linfócitos T CD4+CD62L+Foxp3- 24h após separação celular em cultura. B) Linfócitos T CD4+CD62L+Foxp3- e ADMSCs após 24h de co-cultivo. Aumento de 200X.
Fonte: Bassi [144].

A capacidade das ADMSCs promoverem a conversão de células T CD4+CD62L+Foxp3- para células CD4+CD25+Foxp3+ foi então investigada. Para isso, células T CD4+CD62L+Foxp3- foram co-cultivadas com ADMSCs em diferentes condições: na presença de IL-2 (50 U/ml), frente a um estímulo alogênico (APCs de Balb/SCID) ou estimuladas com anti-CD3 (1 µg/ml) (Figura 24). Após 4 dias de co-cultivo, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo para determinar a frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ na presença ou ausência de ADMSCs. Conforme mostrado na figura 24, as ADMSCs não promoveram a conversão de células Foxp3- para células T CD4+CD25+Foxp3+ em nenhuma das condições avaliadas. Na presença do estímulo com anti-CD3, uma maior frequência de células T CD4+CD25+ foi observada (Figura 24), no entanto, essa população celular foi negativa para Foxp3. Assim, pôde-se concluir que as ADMSCs, nas condições estudadas, não promoveram a conversão de células CD4+CD62L+Foxp3- para células CD4+CD25+Foxp3+.

Figura 24 - Análise da conversão de células CD4+62L+Foxp3- em células CD4+CD25+Foxp3+ após o co-cultivo com ADMSCs.

Células T naive CD4+CD62L+Foxp3- foram separadas a partir de linfócitos T CD4+ totais obtidos de camundongos C57BL/6 Foxp3 GFP KI por meio de FACS. As células foram então co-cultivadas com ADMSC na proporção de 10 linfócitos: 1 ADMSC por 4 dias na presença de IL-2 (50U/ml), estímulo alogênico (APC Balb/SCID) ou anti-CD3 por 4 dias. Esquerda: Dot-plot representativo da frequência das células CD4+ após o processo de separação celular. Direita: co-cultivo de linfócitos T CD4+62L+Foxp3- e ADMSCs. Dot-plots representativos da frequência de células T CD25+Foxp3+ no gate de células T CD4+ após 4 dias de co-cultivo com ADMSC. Resultado representativo de 1 experimento.

Fonte: Bassi [144].

A possibilidade de expansão/manutenção de células Tregs putativas a partir de uma população celular T CD4+Foxp3+ por ADMSCs, foi então investigada. Para isso, células T CD4+Foxp3+ foram separadas a partir de linfócitos T CD4+ totais pela metodologia de FACS utilizando o equipamento FACS Aria II. Após o processo de separação celular uma pureza maior que 99% de células T CD4+Foxp3+ foi obtida. Como a IL-2 é uma citocina importante para sobrevivência e manutenção de células Tregs *in vitro*, avaliamos a expansão/manutenção de células T CD4+Foxp3+ a partir de uma população celular T CD4+Foxp3+ promovida pelas ADMSCs na presença desta citocina (50U/ml). As células foram então co-cultivadas com ADMSCs na presença de IL-2, sendo a frequência de células T CD4+Foxp3+ e T CD4+CD25+Foxp3+ analisada após 4 dias, por citometria de fluxo. Conforme mostrado na figura 25A, as ADMSCs promoveram uma maior manutenção/expansão de células T CD4+Foxp3+ e T CD4+CD25+Foxp3+. Além disso, níveis menores de IL-2 foram detectados na presença das ADMSCs (figura 25B), devido, provavelmente, ao maior consumo desta citocina pela maior frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ presentes (Figura 25A). Um aumento de IL-6 também foi observado na presença das ADMSCs (Figura 25B).

Figura 25 - Análise da expansão/manutenção de células T CD4+CD25+Foxp3+ a partir de células Foxp3+ após co-cultivo com ADMSCs na presença de IL-2 (50U/ml).

Células T CD4+Foxp3+ foram separadas a partir de linfócitos T CD4+ totais obtidos de camundongos C57BL/6 Foxp3 GFP KI. A) As células foram co-cultivadas com ADMSC e IL-2 (50U/ml) por 4 dias sendo a frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ analisada por citometria de fluxo. Resultado representativo de 2 experimentos independentes. B) Detecção de citocinas Th1/Th2/Th17 no meio de cultura pela metodologia de CBA (Cytometric bead array, BD Biosciences).

Fonte: Bassi [144].

Por meio desse experimento foi possível concluir que as ADMSCs puderam atuar na manutenção/expansão de células T CD4+Foxp3+, contribuindo para elucidar o mecanismo de ação dessas células sobre células Tregs *in vitro*. No entanto, as ADMSCs não promoveram a conversão de células T CD4+Foxp3+ a partir de células CD4+CD62L+Foxp3- nas condições e períodos de co-cultivo estudados.

Para avaliar o papel de PD-L1 no efeito das ADMSCs sobre a subpopulação de células T CD4+Foxp3+, realizamos um co-cultivo dessas células com ADMSCs por 4 dias na presença ou ausência de um anticorpo neutralizante para PD-L1. Conforme

mostrado na figura 26, o bloqueio de PD-L1 reverteu parcialmente a manutenção/expansão de células T CD4+Foxp3+ e CD4+CD25+Foxp3+ promovido pelas ADMSCs.

Figura 26 - Papel da molécula PD-L1 no mecanismo de manutenção/expansão da subpopulação de células CD4+Foxp3+ por ADMSCs.

Células T CD4+Foxp3+ foram separadas a partir de linfócitos T CD4+ totais obtidos de camundongos C57BL/6 Foxp3 GFP KI. A) As células foram co-cultivadas com ADMSC e IL-2 (50U/ml) na presença do anticorpo anti-PD-L1 sendo a frequência de células T CD4+Foxp3+ e CD4+CD25+Foxp3+ analisada por citometria de fluxo após 4 dias. *Dot-plots* representativos da frequência de células CD4+Foxp3+ e CD4+CD25+Foxp3+ no gate de linfócitos CD4+. MFI: mediana da intensidade de fluorescência de Foxp3 (GFP+).

Fonte: Bassi [144].

4.16 ADMSCs promovem a atenuação da hiperglicemia em camundongos NOD recém-diabéticos por um longo período de tempo após o tratamento

Para avaliar a manutenção do efeito terapêutico da reversão da hiperglicemia após o desenvolvimento recente do diabetes autoimune experimental, camundongos NOD recém-diabéticos foram tratados com ADMSCs e avaliados por um período de

12 semanas após o tratamento. Conforme mostrado na figura 27, todos os camundongos do grupo controle permaneceram hiperglicêmicos durante todo o período analisado. Por outro lado, no grupo tratado, a reversão da hiperglicemia pode ser mantida por até 8 semanas em 78% dos animais tratados com ADMSCs (Figura 27). Além disso, a média da glicemia nos animais que responderam ao tratamento foi reduzida significativamente quando comparada ao grupo não tratado, conforme mostrado na figura 27B.

Figura 27 - Terapia com ADMSCs promove a reversão da hiperglicemia em camundongos NOD recém-diabéticos.

ADMSCs foram administradas intraperitonealmente em camundongos NOD fêmeas diabéticas nos dias 0, 7 e 14. A) Os níveis de glicemia (mg/dl) foram determinados semanalmente na ausência de jejum durante 12 semanas após a primeira administração de ADMSCs. A reversão da hiperglicemia pode ser mantida por até 8 semanas após o tratamento em 78% (7 de 9) dos animais tratados. B) Média $\pm$ s.e.m. da glicemia (mg/dl) dos animais que responderam ao tratamento comparado ao grupo não tratado determinada semanalmente.

Fonte: Bassi [144].

A insulite nas ilhotas pancreáticas no pâncreas dos animais também foi avaliada 12 semanas após o tratamento. No grupo tratado com ADMSCs, foi observada uma diminuição no infiltrado celular inflamatório presente nas ilhotas pancreáticas quando comparado ao grupo controle (Figura 28A). Além disso, uma maior expressão de insulina pode ser detectada por imunohistoquímica nos animais que responderam ao tratamento, indicando a manutenção de ilhotas funcionais 12 semanas após o tratamento com ADMSCs.

Figura 28 - Infiltrado celular inflamatório e a expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD 12 semanas após o tratamento com ADMSCs.

A) Análise histológica das ilhotas pancreáticas por hematoxilina-eosina (HE). B) Imunohistoquímica para insulina. Aumento de 200X. C) Quantificação do infiltrado celular inflamatório (escore de insulite) nas ilhotas pancreáticas. A quantificação da insulite foi determinada pela análise de aproximadamente 80 ilhotas/grupo experimental, de acordo com a classificação: 0 (ausência de insulite), 0-25 (peri-insulite), 25-50, >50 e 100% de insulite em cada ilhota pancreática. n=5/grupo experimental.

Fonte: Bassi [144].

4.17 Terapia com ADMSCs aumenta a frequência de células Tregs nos LPs 12 semanas após o tratamento

Devido aos animais que responderam ao tratamento com ADMSCs apresentarem uma diminuição na insulite e uma manutenção de ilhotas pancreáticas funcionais foi interessante verificar a possibilidade de um aumento na frequência das células Tregs 12 semanas após o tratamento com ADMSCs. Conforme mostrado na figura 29, um aumento significativo na frequência de células T CD4+Foxp3+ pode ser observado no grupo tratado com ADMSC quando comparado ao grupo não tratado ($29,74 \% \pm 4,14$ vs. $14,74 \% \pm 0,72$, respectivamente; $p < 0,01$). Além disso, conforme mostrado na figura 29C, uma maior frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+ também foi observada no grupo tratado ($21,79 \% \pm 2,35$) quando comparada tanto ao grupo não tratado ($11,13 \% \pm 0,59$; $p < 0,01$) quanto ao grupo controle normoglicêmico ($14,10\% \pm 1,80$; $p < 0,05$).

Figura 29 - Terapia com ADMSCs aumenta a frequência de células T CD4+Foxp3+ e CD4+CD25+Foxp3+ nos LPs 12 semanas após o tratamento.

A frequência de células T CD4+Foxp3+ e T CD4+CD25+Foxp3+ nos LPs foi determinada por citometria de fluxo 12 semanas após o tratamento com ADMSC. A) *Dot-plot* representativo da frequência de células T CD4+Foxp3+. B e C) Gráficos representativos da frequência de células T CD4+Foxp3+ e T CD4+CD25+Foxp3+, respectivamente (média $\pm$ s.e.m.). n=5/grupo experimental. *p<0,05. **p<0,001.

Fonte: Bassi [144].

Recentemente, o fator de transcrição Helios tem sido sugerido como um potencial marcador para células Tregs naturais timo-derivadas, devido à ausência deste marcador em células Tregs Foxp3+ induzidas [150]. Assim, avaliamos a presença deste marcador nas células T CD4+Foxp3+ após o tratamento com ADMSCs. De forma interessante, uma maior frequência de células T CD4+Foxp3+Helios+ foi observada 12 semanas após o tratamento com ADMSCs

(Figura 20), indicando que as células Tregs Fxp3+ que aumentaram nos LPs dos animais que responderam ao tratamento seriam principalmente células Tregs naturais.

Figura 30 - Aumento da frequência de células Tregs CD4+Foxp3+Helios+ nos LPs 12 semanas após o tratamento com ADMSCs.

A frequência de células T CD4+Foxp3+Helios+ e T CD4+Foxp3+Helios- nos LPs foi determinada por citometria de fluxo 12 semanas após o tratamento com ADMSC. A) *Dot-plot* representativo da frequência de células T CD4+Foxp3+Helios+ e CD4+Foxp3+Helios-. B e C) Gráficos representativos da frequência de células T CD4+Foxp3+Helios+ e T CD4+Foxp3+Helios-, respectivamente (média $\pm$ s.e.m.). n=5/grupo experimental. *p<0,05. Fonte: Bassi [144].

Para uma melhor caracterização da subpopulação de células Tregs observada 12 semanas após o tratamento com ADMSCs, a frequência de células

CD4+CD25+Foxp3+Helios+ e CD4+CD25+Foxp3+Helios- foi investigada nos animais que responderam ao tratamento. Conforme mostrado na figura 31, um aumento significativo na frequência das células T CD4+CD25+Foxp3+Helios+ combinado a uma diminuição na frequência de células T CD4+CD25+Foxp3+Helios- pode ser constatado, sugerindo a expansão de células Helios+ promovida pelo tratamento com ADMSCs.

Figura 31 - Frequência de células Helios+ e Helios- em células CD4+CD25+Foxp3+ nos linfonodos pancreáticos 12 semanas após o tratamento com ADMSCs.

A frequência de células Helios+ e Helios- na população CD4+CD25+Foxp3+ foi determinada por citometria de fluxo 12 semanas após o tratamento. A) *Dot-plot* representativo da frequência de células T CD25+Foxp3+ no *gate* de linfócitos CD4+. B) *Dot-plot* representativo da frequência de células Helios+Foxp3+ e Helios-Foxp3+ em células CD4+CD25+Foxp3+. C e D) Gráficos representativos da frequência de células CD4+CD25+Foxp3+Helios+ e T CD4+CD25+Foxp3+Helios-, respectivamente (média $\pm$ s.e.m.). n=5/grupo experimental. *p<0,05.

Fonte: Bassi [144].

5 DISCUSSÃO

A incidência do DMT1 tem aumentado no decorrer dos últimos anos fazendo desta doença um importante problema de saúde pública mundial estimulando a pesquisa de novas terapias que sejam seguras e eficazes para controlar, reverter ou até mesmo prevenir o desenvolvimento desta doença [151, 152]. Neste sentido, as terapias celulares tornaram-se alternativas promissoras para a prevenção e o tratamento do diabetes autoimune. O transplante de ilhotas pancreáticas humanas consiste em um tratamento promissor para esta doença, no entanto, a ausência de doadores suficientes, os custos elevados e a necessidade de terapia com imunossuppressores para evitar a rejeição das células transplantadas, tem limitado a ampla utilização deste procedimento [153, 154]. Nos últimos anos, tem-se sugerido que a imunossupressão utilizada em pacientes recém-diagnosticados com DMT1 pode manter as células β pancreáticas residuais funcionais, reduzindo assim, a necessidade da utilização de insulina posteriormente. Dessa forma, foi mostrado que o transplante de células-tronco hematopoiéticas após indução de imunossupressão com ciclofosfamida em pacientes recém-diagnosticados com DMT1 pôde promover a manutenção de células β funcionais [155]. Neste estudo, 15 pacientes foram monitorados por um período de até 36 meses após o tratamento, sendo que 14 pacientes tornaram-se livres da utilização de insulina por uma média de aproximadamente 18 meses (dentre eles, 1 por 35 meses, 4 por 21 meses e 7 por 6 meses) [155].

Durante o início do desenvolvimento do DMT1, as células β residuais ainda produzem insulina, oferecendo assim, uma possibilidade de intervenção terapêutica para bloquear/atenuar a destruição autoimune, recuperando assim a função das células β remanescentes. Nos últimos anos, diversos estudos tem mostrado que as MSCs podem modular a resposta autoimune e inflamatória envolvida em diversas doenças, principalmente devido ao seu efeito imunossupressor, apresentando assim, um potencial terapêutico para diversas doenças autoimunes, incluindo o DMT1 [36].

Embora testes clínicos envolvendo MSCs para o tratamento de diversas doenças tenham sido iniciados, os mecanismos de ação dessas células em doenças autoimunes somente começaram a ser elucidados.

O camundongo NOD é um modelo experimental de diabetes autoimune onde uma combinação da disfunção do sistema imune associada a fatores genéticos e ambientais levam a uma resposta autoimune Th1 pró-inflamatória, culminando na perda da manutenção da tolerância às células β pancreáticas [156]. No presente estudo, nós confirmamos a presença de uma resposta imune de perfil Th1 associada à infiltração celular (insulite) nas ilhotas pancreáticas, destruição das células β e hiperglicemia neste modelo experimental. Estudos recentes mostraram um perfil Th1 (IFN- γ) no diabetes autoimune experimental em camundongos NOD, corroborando com os nossos resultados [145, 146]. Martin-Orozco et al. [145] diferenciaram *in vitro* células T com TCR transgênico para um autoantígeno das células β (clone BDC 2.5) em células Th17, um tipo celular associado com autoimunidade órgão-específica presente em diversas doenças autoimunes como colite, encefalomielite autoimune experimental e artrite reumatóide. As células Th17 foram então transferidas para camundongos NOD/SCID (onde há ausência de linfócitos T e B). Após a transferência, observou-se um rápido desenvolvimento da doença com intenso infiltrado celular inflamatório e destruição das ilhotas pancreáticas. No entanto, o resultado interessante deste estudo foi que as células BDC 2.5+ recuperadas dos camundongos NOD/SCID expressaram maiores quantidades de IFN- γ do que IL-17, indicando assim que as células Th17 transferidas para os animais se diferenciaram em células Th1 no indivíduo linfopênico, sendo essas, as responsáveis pelo desenvolvimento da doença [145]. Em outro estudo, células BDC 2.5+ Th17 não secretoras de IFN- γ foram isoladas e transferidas para camundongos NOD/SCID [146]. Do mesmo modo, as células se converteram em células secretoras de IFN- γ no receptor. Além disso, o desenvolvimento da doença nos animais não foi devido a IL-17, pois o tratamento dos animais com um anticorpo que bloqueia esta citocina não surtiu nenhum efeito benéfico. Por outro lado, a indução do diabetes pela

transferência de células Th1 foi prevenida pelo tratamento com anticorpo neutralizante para IFN- γ , destacando um papel crucial para células Th1 na indução do diabetes neste modelo experimental [146].

Nos últimos anos, diversos estudos mostraram o potencial imunossupressor das ADMSCs sobre a resposta imune de perfil Th1 combinada a capacidade de expandir células Tregs em vários modelos de doença autoimune, como esclerose múltipla, artrite reumatóide e colite experimental [81, 86, 134]. Assim, no presente estudo, a nossa hipótese foi que as ADMSCs poderiam melhorar o desenvolvimento recente do diabetes autoimune em camundongos NOD diabéticos promovendo seu efeito terapêutico via inibição da resposta mediada por células T CD4⁺ de perfil Th1 pró-inflamatório concomitantemente a expansão de células Tregs. Embora estudos anteriores tenham obtido sucesso na utilização de MSCs derivadas da medula óssea (BM-MSCs) para o tratamento e prevenção do diabetes autoimune neste modelo experimental [127-130], o potencial terapêutico das ADMSCs no tratamento desta doença, avaliando e explorando seu efeito imunomodulador, permanece totalmente inexplorado.

No estudo de Fiorina et al. [127], MSCs alogênicas isoladas a partir da medula óssea de camundongos Balb/c não diabéticos administradas por via endovenosa em camundongos NOD diabéticos migraram para o pâncreas e LPs, revertendo temporariamente a hiperglicemia em 90% dos animais após o tratamento. Por outro lado, foi mostrado que a transferência de MSCs autólogas derivadas de camundongos NOD não resultou no mesmo efeito terapêutico observado para células alogênicas, causando ainda a formação de tumores viscerais em diferentes órgãos em 20% dos camundongos NOD tratados. Esse resultado foi correlacionado com a expressão aumentada de genes ligados a proliferação e ciclo celular nas MSCs derivadas de camundongos NOD em comparação com as MSCs de Balb/c [127].

Assim, visto que utilizamos camundongos NOD neste estudo, optamos pela utilização de células ADMSCs alogênicas derivadas de camundongos Balb/c, embora o efeito benéfico do tratamento com células ADMSCs singênicas não possa ser

descartado. Neste sentido, MSCs congênitas isoladas a partir da medula óssea de camundongos NOR (*“non-obese resistant”*) reverteram a hiperglicemia de camundongos NOD diabéticos, diminuindo a frequência de células T efectoras nos linfonodos pancreáticos [129]. No tratamento de ratos diabéticos com BM-MSCs autólogas, as células migraram para o pâncreas, aumentaram os níveis de insulina e promoveram uma normoglicemia sustentada por 60 dias após o tratamento. Ainda, no grupo tratado, foi observada uma maior expressão de PDX-1 e insulina e uma maior frequência de células T CD4+Foxp3+ após o tratamento [125]. Vale ressaltar que o fator de transcrição PDX-1 tem um papel importante na diferenciação/desenvolvimento e manutenção da homeostasia das células β , regulando ainda a expressão do gene da insulina [157].

No presente estudo, uma redução na glicemia acompanhada de uma melhora significativa no teste de tolerância à glicose e aumento dos níveis de insulina no soro foram observados após o tratamento com ADMSCs. Além disso, uma diminuição da insulite combinada a uma acentuada expressão de insulina e PDX-1 nas ilhotas pancreáticas, indicando a manutenção de células β funcionais, foram observadas nos camundongos NOD diabéticos tratados com ADMSCs.

De forma interessante, níveis mais elevados de hormônios que contribuem para a melhora do DMT1, como a amilina e GLP-1, foram observados no soro dos camundongos tratados com ADMSCs. A amilina é um hormônio peptídico secretado pelas células β simultaneamente a secreção de insulina que atua melhorando o controle glicêmico em pacientes com DMT1 [158]. No caso do GLP-1, foi mostrado que o tratamento com a combinação desse hormônio juntamente a gastrina pôde restaurar a normoglicemia em camundongos NOD diabéticos devido principalmente ao aumento na massa de células β pancreáticas e inibição da resposta autoimune [159]. Recentemente, mostrou-se que a sinalização do receptor de GLP-1 pode regular a proliferação linfocitária mantendo células Tregs periféricas em camundongos NOD [160]. Neste estudo, observamos um aumento nos níveis de GLP-1 e na frequência de

células Tregs nos camundongos tratados com ADMSCs, sugerindo uma contribuição desse hormônio na melhora do diabetes autoimune observada após o tratamento.

No modelo experimental de artrite reumatóide e colite, o tratamento com ADMSCs pôde modular a resposta autoimune mediada por células T CD4+ [81, 161]. Na doença inflamatória intestinal, o tratamento de camundongos com ADMSCs tanto de origem murina como humana, administradas pela via intraperitoneal, melhorou significativamente a severidade da doença, diminuindo a perda de peso, diarreia e a inflamação [86, 161]. Além disso, o efeito terapêutico foi associado com uma inibição da resposta inflamatória de perfil Th1 na mucosa intestinal e linfonodos drenantes concomitante a expansão de células Tregs [86, 161].

No DMT1, as células Tregs são essenciais para manutenção da tolerância imunológica podendo ainda atenuar a autoimunidade órgão específica. Essas células têm sido alvo de intensas pesquisas nos últimos anos [53], exibindo uma potente atividade reguladora tanto *in vivo* como *in vitro*, inibindo células T auto-reativas e mantendo a tolerância imunológica. As Tregs possuem uma elevada expressão do fator de transcrição Foxp3, que tem papel central no desenvolvimento e função das Tregs CD25+, sendo o marcador mais específico para essas células [56].

No presente estudo, as ADMSCs foram detectadas no pâncreas e nos LPs 72h após a administração intraperitoneal em camundongos NOD diabéticos. Além disso, uma maior frequência de células CD4+CD25+Foxp3+ concomitante a uma diminuição na frequência de células T CD4+ produtoras de IFN- γ e TNF- α foram detectadas nos LPs dos animais tratados, um importante sítio de regulação imunológica nesse modelo experimental. Weber et al. [162] mostraram que a transferência de células Tregs em camundongos NOD pré-diabéticos pode prevenir o desenvolvimento do diabetes autoimune, devido à diminuição do infiltrado celular inflamatório no pâncreas e ao bloqueio da resposta imune Th1 efetora nos LPs. Interessantemente, a administração de BM-MSCs alogênicas em camundongos NOD fêmeas pré-diabéticas com 4 semanas de idade preveniu o desenvolvimento da insulite espontânea e o desenvolvimento do diabetes com o decorrer da idade nestes

animais [128]. Foi mostrado ainda que as MSCs administradas tanto pela via intraperitoneal como endovenosa migraram para os LPs e preveniram a destruição autoimune das células β pela indução de células Tregs [128].

A propriedade das MSCs em migrar ("*homing*") para sítios lesionados ou inflamatórios e restaurar a função de tecidos injuriados tem sido relatada em diversos estudos [19, 163, 164]. No ano de 2006, Lee e colaboradores, mostraram que BM-MSCs humanas quando transplantadas em camundongos NOD/SCID tornados diabéticos pela administração de estreptozotocina puderam migrar para o pâncreas e glomérulos renais, reparando esses tecidos lesados [126]. Além disso, após a administração das MSCs humanas, a glicemia dos animais diabéticos foi normalizada e a concentração de insulina no soro aumentou em relação aos animais não tratados, embora a presença de insulina humana não tenha sido detectada após o tratamento [126]. Em outro estudo, MSCs alogênicas migraram para o pâncreas e LPs ao serem injetadas por via endovenosa em camundongos NOD diabéticos e reverteram temporariamente a hiperglicemia [127].

A citocina IFN- γ é a citocina predominante em uma resposta imune com perfil Th1. Esta citocina pode ativar macrófagos amplificando a resposta imune envolvida no diabetes autoimune ou ainda sensibilizar as células β pancreáticas, aumentando a expressão de MHC classe I nessas células, tornando-as então mais susceptíveis a citotoxicidade mediada *in vivo* pelos linfócitos T CD8+ [165]. Tanto os linfócitos T CD4+ quando T CD8+ produzem IFN- γ durante a destruição das células β pancreáticas em camundongos NOD [166]. O TNF- α , por sua vez, é uma importante citocina pró-inflamatória envolvida na resposta autoimune e na indução de apoptose nas células β pancreáticas [167-169]. Recentemente, no modelo de diabetes induzido por estreptozotocina em camundongos, a administração de BM-MSCs pode reverter a hiperglicemia por um período de até 90 dias após o tratamento, diminuindo a frequência de células T autoreativas e aumentando a frequência de células Tregs [170], corroborando com os nossos resultados, visto que observamos uma diminuição na frequência de células T CD4+IFN- γ e CD4+TNF- α nos LPs após o tratamento.

É importante ressaltar que nos diversos estudos utilizando MSCs no tratamento de doenças autoimunes, o efeito terapêutico dessas células não parece estar associado com sua transdiferenciação nas células que foram danificadas, como por exemplo, as células β pancreáticas. Geralmente, o efeito terapêutico das MSCs é relacionado ao seu potencial antiinflamatório e imunossupressor, além da produção de citocinas e fatores de crescimento por essas células, estimulando, assim, a sobrevivência e proliferação das células residentes e mantendo um microambiente favorável para o processo regenerativo. A citocina TGF- β 1 é uma importante citocina supressora no DMT1, sendo que nas ilhotas pancreáticas, pode contribuir para a proteção contra os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ efetores [171]. Em camundongos NOD diabéticos, foi mostrado que as células Tregs migram para o interior do pâncreas durante a supressão do diabetes autoimune e inibem células T efectoras e macrófagos em uma maneira dependente de TGF- β 1 [172]. Em nosso estudo, no pâncreas, uma diminuição nos níveis de IFN- γ combinado ao aumento da expressão de TGF- β 1 biologicamente ativo foram detectados após o tratamento com ADMSCs, contribuindo para a manutenção de ilhotas funcionais. Corroborando com nossos resultados, foi mostrado que a administração de BM-MSCs em camundongos NOD recém-diabéticos pode aumentar os níveis de TGF- β 1 no soro dos animais 35 dias após o tratamento [130].

A capacidade das ADMSCs em expandir células Tregs foi confirmada no presente estudo por meio de experimentos realizados *in vitro*. Uma maior frequência e proliferação de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foram detectadas quando linfócitos T CD4⁺ foram co-cultivados com as ADMSCs em uma maneira dose-dependente. Além disso, foi mostrado o papel do contato ADMSC: linfócito T CD4⁺ neste processo, pois quando as células foram cultivadas separadas por uma membrana (*transwell*), uma menor frequência e proliferação de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ pode ser observada. Corroborando com nossos resultados, o papel do contato celular no mecanismo de expansão de Tregs por MSCs alogênicas foi mostrado previamente para BM-MSCs humanas [73]. Por outro lado, em outro estudo foi mostrado que a expansão de

células Tregs por MSCs humanas *in vitro* foi dependente da secreção de HLA-G5 solúvel por essas células [74]. No entanto, o contato celular entre MSCs e células T estimuladas foi necessário para obtenção de uma maior secreção desse fator solúvel e conseguinte uma maior imunomodulação [74].

Além da expansão de Tregs por MSCs, BM-MSCs podem ainda recrutar as células Tregs de uma população de células CD3⁺ (linfócitos) *in vitro* e manter a expressão de Foxp3 e a atividade supressora dessas células por até 15 dias, enquanto na ausência dessas células esse efeito foi perdido em apenas 5 dias de cultura [72]. De forma interessante, no presente estudo, verificamos que as ADMSCs puderam manter um fenótipo regulador em uma população de células CD4⁺Foxp3⁺, verificado por uma maior expressão de Foxp3 nessas células quando co-cultivadas na presença de ADMSCs, corroborando com estes resultados.

A molécula co-estimuladora PD-1 e seu ligantes, PD-L1 e PD-L2 constituem um importante mecanismo regulador inibitório da resposta imune nos mecanismos de tolerância e autoimunidade, sendo que a ativação deste receptor leva a inibição da proliferação e secreção de citocinas pelos linfócitos [149]. A molécula PD-L1 é expressa constitutivamente em células do sistema imune como linfócitos B, células dendríticas, macrófagos e linfócitos T além de uma variedade de células não-hematopoiéticas, como célula endotelial vascular, astrócitos, célula epitelial e em locais imunoprivilegiados como trofoblasto na placenta, células epiteliais do pigmento da retina e neurônios no olho [149].

Estudos recentes mostraram a expressão do receptor PD-L1 na superfície de BM-MSCs [127, 129] e o papel crucial dessa molécula na inibição da proliferação de linfócitos T e B promovida por essas células [173, 174]. Além disso, foi mostrado que a citocina IFN- γ pode aumentar a expressão de PD-L1 em BM-MSCs, ativando (“*priming*”) o efeito supressor dessas células sobre os linfócitos T [174]. Em experimentos *in vitro*, BM-MSCs inibiram a proliferação de linfócitos T diabetogênicos em um mecanismo dependente de PD-L1, visto que a inibição da

expressão dessa molécula nas BM-MSCs utilizando RNA de interferência pode reverter esse efeito imunossupressor [129].

No presente estudo, verificamos uma elevada expressão de PD-L1 em ADMSCs. Corroborando com estes resultados, uma elevada expressão constitutiva de PD-L1 também foi verificada em MSCs isoladas a partir do cordão umbilical humano e a adição de um anticorpo bloqueador para essa molécula reverteu a atividade imunossupressora de inibição da proliferação de linfócitos T por essas células [175].

Devido o papel de PD-L1 na regulação do desenvolvimento, manutenção e função de células Tregs [148], investigamos o papel dessa molécula na expansão dessas células promovida pelo co-cultivo *in vitro* com ADMSCs. Interessantemente, a expansão de células Tregs por ADMSCs foi inibida na presença de um anticorpo neutralizante para essa molécula de uma maneira dose-dependente, indicando um papel crucial dessa molécula no efeito imunossupressor dessas células *in vitro* sobre células Tregs. De acordo com Francisco et al. [148] APCs isoladas de animais PD-L1^{-/-} induzem uma menor conversão de linfócitos T CD4⁺ naïve em células Tregs quando comparado a APCs WT (do inglês, “*wild type*”). Além disso, microesferas recobertas com PD-L1 puderam induzir células Tregs, na presença de TGF- β 1, aumentando e sustentando a expressão de Foxp3 e a função supressora dessas células *in vitro* [148]. Em nosso estudo, observamos um aumento dos níveis de TGF- β 1 quando as ADMSCs foram co-cultivadas com linfócitos T CD4⁺, indicando que provavelmente essa citocina poderia auxiliar na expansão das células Tregs promovida por PD-L1.

Embora o tratamento com ADMSCs tenha melhorado significativamente o desenvolvimento do diabetes autoimune em camundongos NOD recém-diabéticos, foi interessante avaliar por quanto tempo este efeito benéfico poderia ser mantido. Para isso, um novo tratamento foi realizado, seguido de um acompanhamento por 12 semanas após o tratamento. Nesse sentido, o estudo de Fiorina et al. [127] mostrou uma reversão temporária da hiperglicemia por um período de aproximadamente 41 dias após o tratamento de camundongos NOD diabéticos com BM-MSCs alogênicas.

Posteriormente, em outro estudo, a administração de BM-MSCs congênicas isoladas de camundongos NOR manteve a reversão da hiperglicemia por até 12 semanas após o tratamento [129]. No presente estudo, observamos que a reversão da hiperglicemia após o tratamento de camundongos NOD recém-diabéticos pode ser mantida por até 8 semanas após o tratamento com ADMSCs alogênicas em 78% dos animais e por 12 semanas em 4 animais, sugerindo que provavelmente mais administrações seriam necessárias para manutenção do efeito terapêutico por um maior período de tempo. Além disso, uma menor insulite e maior expressão de insulina nas ilhotas pancreáticas foram observadas no grupo tratado com ADMSCs 12 semanas após o tratamento.

Interessantemente, nos linfonodos pancreáticos dos animais tratados com ADMSCs, verificou-se uma maior frequência de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Para uma melhor fenotipagem dessas células, o fator de transcrição Helios, recentemente sugerido como um potencial marcador para células Tregs naturais foi então utilizado [150]. Inicialmente, foi mostrado que células Foxp3⁺ obtidas a partir da diferenciação de linfócitos T naïve estimuladas *in vitro* na presença de TGF- β não expressavam esse marcador [150]. Embora esse fator de transcrição tenha sido apontado como um potencial marcador específico para células Tregs naturais timo-derivadas, esse assunto ainda não é consenso na literatura, visto que recentemente um estudo mostrou a expressão de Helios em células Tregs induzidas em determinadas condições *in vitro* [176]. Estudos recentes mostraram que células Tregs Helios⁺ expressam maiores níveis de TGF- β 1, não secretam citocinas efetoras e proliferam mais *in vivo*, indicando que as células Foxp3⁺Helios⁺ representariam uma subpopulação funcional com características mais supressoras comparada a Tregs Foxp3⁺Helios⁻ [177-179]. De forma interessante, uma maior frequência de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺Foxp3⁺Helios⁺ foi observada nos linfonodos pancreáticos 12 semanas após o tratamento com ADMSCs, indicando a expansão de células Tregs *in vivo* com importantes propriedades imunossupressoras em situações de autoimunidade.

Em resumo, o tratamento com ADMSCs pode modular de forma eficiente a resposta imune mediada por células T CD4⁺ e melhorar o diabetes autoimune em camundongos NOD diabéticos atenuando a resposta imune Th1 e favorecendo a expansão de células Tregs, contribuindo para a manutenção/regeneração de células β pancreáticas funcionais. Embora novos estudos sejam necessários para confirmação da segurança e potencial terapêutico das ADMSCs e suas propriedades imunomoduladoras em doenças autoimunes experimentais, essas células possuem muitas vantagens em comparação a outras fontes celulares para aplicação em medicina regenerativa como o alto rendimento e processo de obtenção minimamente invasivo, podendo ser obtidas a partir do lipoaspirado de doadores saudáveis e expandidas *in vitro*. Assim, os resultados obtidos nesse estudo são promissores, revelando novas perspectivas terapêuticas para o desenvolvimento futuro de novas estratégias de terapia celular baseadas em ADMSCs para o tratamento do DMT1.

6 CONCLUSÕES

- O modelo de diabetes autoimune experimental em camundongos NOD foi caracterizado por uma hiperglicemia, infiltrado celular inflamatório nas ilhotas pancreáticas e resposta imune de perfil Th1 nos linfonodos pancreáticos;
- o tratamento de camundongos NOD recém-diabéticos com ADMSCs pode reverter a hiperglicemia, glicosúria e melhorar o teste de tolerância a glicose intraperitoneal;
- diversos hormônios relacionados à melhora do DMT1, como insulina, amilina e GLP-1 foram aumentados no soro dos animais após o tratamento;
- o tratamento com ADMSCs diminuiu o infiltrado celular inflamatório (insulite) nas ilhotas pancreáticas contribuindo para manutenção/regeneração de células β funcionais expressando insulina e PD-X1;
- uma maior frequência de células Tregs CD4+CD25+Foxp3+ combinada a uma diminuição na frequência de células CD4+IFN γ + e TNF- α + (perfil Th1) foi observada nos linfonodos pancreáticos;
- no pâncreas, o tratamento com ADMSCs atenuou a resposta imune Th1 (IFN- γ) combinada ao aumento da expressão de TGF- β 1 ativo;
- as ADMSCs foram detectadas no lavado peritoneal, linfonodos pancreáticos o pâncreas 72h após administração em camundongos NOD diabéticos;
- a reversão da hiperglicemia em camundongos NOD recém-diabéticos foi mantida em 78% dos animais por um período de até 8 semanas após o tratamento;
- uma maior frequência de células Tregs CD4+CD25+Foxp3+Helios+ nos linfonodos pancreáticos assim como uma diminuição do infiltrado celular inflamatório foi constatada 12 semanas após o tratamento; e
- *in vitro*, ADMSCs promoveram a expansão/proliferação de células T CD4+CD25+Foxp3+ quando co-cultivadas com linfócitos T CD4+ em um mecanismo dependente de contato celular e mediado pela molécula PD-L1.

REFERÊNCIAS*

1. Becker AJ, Mc CE, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-4.
2. Owen RD. Immunogenetic Consequences of Vascular Anastomoses between Bovine Twins. *Science*. 1945;102(2651):400-1.
3. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005;2:8.
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
5. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
6. Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion*. 1971;11(6):345-9.
7. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-74.
8. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-47.
9. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
10. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992;13(1):69-80.
11. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
12. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res*. 1991;262:298-311.

*De acordo com International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from <http://www.icmje.org>.

13. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*.1992;13(1):81-8.
14. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology*. 2000;28(8):875-84.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
16. Gneccchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol*. 2009;482:281-94.
17. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 11):2204-13.
18. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther*. 2008;15(2):109-16.
19. Ding S, Schultz PG. A role for chemistry in stem cell biology. *Nature biotechnology*. 2004;22(7):833-40.
20. Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. 2008;15(10):711-5.
21. Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells*. 2004;6(4):369-74.
22. Bassi EJ, Aita CA, Camara NO. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells*. 2011;3(1):1-8.
23. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
24. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003;5(12):1028-38.
25. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):419-27.

26. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95.
27. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28.
28. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3(4):25-33.
29. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005;54(3):132-41.
30. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Their Application in Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009;15(00):1-13.
31. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*. 2002;30(1):42-8.
32. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-97.
33. Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*. 2005;106(13):4057-65.
34. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;127(5):1293-300.
35. Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Experimental hematology*. 2008;36(6):733-41.
36. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008;57(7):1759-67.
37. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*. 2003;57(1):11-20.

38. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(5):413-21.
39. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 2006;24(2):386-98.
40. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004;103(12):4619-21.
41. Bassi EJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, Camara NO. Exploring the Role of Soluble Factors Associated with Immune Regulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev.* 2012;8(2):329-42.
42. Bassi EJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, Camara NO. Exploring the Role of Soluble Factors Associated with Immune Regulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev.* 2011. (In press).
43. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815-22.
44. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005;12(1):47-57.
45. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003;101(9):3722-9.
46. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* 2005;106(5):1755-61.
47. Deng W, Han Q, Liao L, You S, Deng H, Zhao RC. Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXS mice. *DNA and cell biology.* 2005;24(7):458-63.
48. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107(1):367-72.
49. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005;105(5):2214-9.

50. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2006;177(4):2080-7.
51. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem cells and development.* 2004;13(3):263-71.
52. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology.* 1971;21(6):903-14.
53. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.
54. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 2005;201(5):723-35.
55. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *The Journal of experimental medicine.* 2001;193(11):1285-94.
56. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology.* 2003;4(4):330-6.
57. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1713-22.
58. Baecher-Allan C, Hafler DA. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006;212:203-16.
59. Randolph DA, Fathman CG. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med.* 2006;57:381-402.
60. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine.* 2003;198(12):1875-86.
61. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol.* 2004;172(9):5213-21.

62. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441(7090):231-4.
63. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol*. 2002;168(3):1080-6.
64. Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol*. 2006;177(7):4376-83.
65. You S, Leforban B, Garcia C, Bach JF, Bluestone JA, Chatenoud L. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6335-40.
66. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1353-62.
67. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204(6):1257-65.
68. Engela AU, Baan CC, Dor FJ, Weimar W, Hoogduijn MJ. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Front Immunol*. 2012;3:126.
69. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, 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*. 2005;90(4):516-25.
70. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 2007;92(7):881-8.
71. Ye Z, Wang Y, Xie HY, Zheng SS. Immunosuppressive effects of rat mesenchymal stem cells: involvement of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008;7(6):608-14.
72. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, et al. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol*. 2008;36(3):309-18.

73. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clinical and experimental immunology*. 2009;156(1):149-60.
74. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26(1):212-22.
75. Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation*. 2010;90(12):1312-20.
76. Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol*. 2010;185(1):302-12.
77. Tatara R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytotherapy*. 2011;13(6):686-94.
78. Kavanagh H, Mahon BP. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy*. 2011;66(4):523-31.
79. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, 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*. 2009;57(11):1192-203.
80. Mohajeri M, Farazmand A, Mohyeddin Bonab M, Nikbin B, Minagar A. FOXP3 gene expression in multiple sclerosis patients pre- and post mesenchymal stem cell therapy. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2011;10(3):155-61.
81. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(4):1006-19.
82. Zhou B, Yuan J, Zhou Y, Ghawji M, Jr., Deng YP, Lee AJ, et al. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis. *Clin Immunol*. 2011;141(3):328-37.
83. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(4):1175-86.

84. Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, 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*. 2010;69(1):241-8.
85. Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, et al. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):544-55.
86. Gonzalez-Rey E, Anderson P, Gonzalez MA, Rico L, Buscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2009;58(7):929-39.
87. Zhou K, Zhang H, Jin O, Feng X, Yao G, Hou Y, et al. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice. *Cellular & molecular immunology*. 2008;5(6):417-24.
88. Choi EW, Shin IS, Park SY, Park JH, Kim JS, Yoon EJ, 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 and rheumatism*. 2012;64(1):243-53.
89. Itakura S, Asari S, Rawson J, Ito T, Todorov I, Liu CP, et al. Mesenchymal stem cells facilitate the induction of mixed hematopoietic chimerism and islet allograft tolerance without GVHD in the rat. *Am J Transplant*. 2007;7(2):336-46.
90. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439-41.
91. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81(10):1390-7.
92. Tian Y, Deng YB, Huang YJ, Wang Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells decrease acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Immunological investigations*. 2008;37(1):29-42.
93. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-86.
94. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32(4):457-67.
95. Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Shahin A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol*. 1998;6(1-2):119-28.

96. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med.* 2006;23(8):857-66.
97. National Diabetes Fact Sheet. Center for Disease Control and Prevention. [homepage on internet]. Estados Unidos: 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2005pdf>. [Acesso em: 2012/08/02].
98. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care.* 2000;23(10):1516-26.
99. Kantarova D, Buc M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. *Physiol Res.* 2007;56(3):255-66.
100. Notkins AL. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem.* 2002;277(46):43545-8.
101. Gomes MB, Dib AS, editors. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Sociedade Brasileira de Diabetes. 2006;1-154.
102. Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia.* 2003;46(3):305-21.
103. Gepts W, Lecompte PM. The pancreatic islets in diabetes. *Am J Med.* 1981;70(1):105-15.
104. Shimizu J, Kanagawa O, Unanue ER. Presentation of beta-cell antigens to CD4+ and CD8+ T cells of non-obese diabetic mice. *J Immunol.* 1993;151(3):1723-30.
105. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature.* 2001;414(6865):792-8.
106. Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, et al. HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin. *Nature.* 1987;326(6110):304-6.
107. Gagnerault MC, Luan JJ, Lotton C, Lepault F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med.* 2002;196(3):369-77.
108. Debray-Sachs M, Carnaud C, Boitard C, Cohen H, Gresser I, Bedossa P, et al. Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J Autoimmun.* 1991;4(2):237-48.
109. Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell.* 1988;52(5):773-82.

110. Corbett JA, McDaniel ML. Intraislet release of interleukin 1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1995;181(2):559-68.
111. Wachlin G, Augstein P, Schroder D, Kuttler B, Kloting I, Heinke P, et al. IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. *J Autoimmun.* 2003;20(4):303-12.
112. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2009;155(2):173-81.
113. Moriwaki M, Itoh N, Miyagawa J, Yamamoto K, Imagawa A, Yamagata K, et al. Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1999;42(11):1332-40.
114. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia.* 2001;44(12):2115-33.
115. Christie MR, Hollands JA, Brown TJ, Michelsen BK, Delovitch TL. Detection of pancreatic islet 64,000 M(r) autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. *J Clin Invest.* 1993;92(1):240-8.
116. Kaufman FR. Type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Rev.* 2003;24(9):291-300.
117. Juedes AE, von Herrath MG. Regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004;20(6):446-51.
118. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12(4):431-40.
119. Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10878-83.
120. Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2002;51(5):1367-74.
121. Mukherjee R, Chaturvedi P, Qin HY, Singh B. CD4+CD25+ regulatory T cells generated in response to insulin B:9-23 peptide prevent adoptive transfer of diabetes by diabetogenic T cells. *J Autoimmun.* 2003;21(3):221-37.
122. Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med.* 2010;207(9):1871-8.

123. Robertson P, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DE. Pancreas transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S105.
124. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000;343(4):230-8.
125. Boumaza I, Srinivasan S, Witt WT, Feghali-Bostwick C, Dai Y, Garcia-Ocana A, 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*. 2009;32(1):33-42.
126. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, 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*. 2006;103(46):17438-43.
127. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, et al. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol*. 2009;183(2):993-1004.
128. Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia*. 2009;52(7):1391-9.
129. Jurewicz M, Yang S, Augello A, Godwin JG, Moore RF, Azzi J, et al. Congenic mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes. *Diabetes*. 2010;59(12):3139-47.
130. Zhao W, Wang Y, Wang D, Sun B, Wang G, Wang J, 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*. 2008;253(1-2):23-30.
131. Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, Carpio D, Yanez AJ, Conget PA. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):631-40.
132. Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*. 2003;21(7):763-70.
133. Urban VS, Kiss J, Kovacs J, Gocza E, Vas V, Monostori E, et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 2008;26(1):244-53.

134. Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells*. 2009;27(10):2624-35.
135. Cho KS, Park HK, Park HY, Jung JS, Jeon SG, Kim YK, et al. IFATS Series: Immunomodulatory Effects of Adipose Tissue-Derived Stem Cells in an Allergic Rhinitis Mouse Model. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;27(1):259-65.
136. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997;64(2):295-312.
137. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annual review of immunology*. 2005;23:447-85.
138. Suarez-Pinzon WL, Yan Y, Power R, Brand SJ, Rabinovitch A. Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin increases beta-cell mass and reverses hyperglycemia in diabetic NOD mice. *Diabetes*. 2005;54(9):2596-601.
139. Yoon JW, Yoon CS, Lim HW, Huang QQ, Kang Y, Pyun KH, et al. Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science*. 1999;284(5417):1183-7.
140. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med*. 2010;207(10):2187-94.
141. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45(2):115-20.
142. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999;72(4):570-85.
143. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
144. Bassi EJ. Propriedades imunomoduladoras das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo no tratamento do diabetes autoimune experimental. [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.
145. Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur J Immunol*. 2009;39(1):216-24.

146. Bending D, De La Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, et al. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(3):565-72.
147. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol*. 2001;167(3):1137-40.
148. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015-29.
149. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219-42.
150. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2010;184(7):3433-41.
151. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009;373(9680):2027-33.
152. The global challenge of diabetes. *Lancet*. 2008;371(9626):1723.
153. Rother KI, Harlan DM. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2004;114(7):877-83.
154. Ricordi C, Strom TB. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(4):259-68.
155. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2007;297(14):1568-76.
156. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*. 1997;7(6):727-38.
157. Melloul D, Marshak S, Cerasi E. Regulation of pdx-1 gene expression. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 3:S320-5.
158. Ceriello A, Piconi L, Quagliaro L, Wang Y, Schnabel CA, Ruggles JA, et al. Effects of pramlintide on postprandial glucose excursions and measures of oxidative stress in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(3):632-7.

159. Suarez-Pinzon WL, Power RF, Yan Y, Wasserfall C, Atkinson M, Rabinovitch A. Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin restores normoglycemia in diabetic NOD mice. *Diabetes*. 2008;57(12):3281-8.
160. Hadjiyanni I, Siminovitch KA, Danska JS, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signalling selectively regulates murine lymphocyte proliferation and maintenance of peripheral regulatory T cells. *Diabetologia*. 2010;53(4):730-40.
161. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology*. 2009;136(3):978-89.
162. Weber SE, Harbertson J, Godebu E, Mros GA, Padrick RC, Carson BD, et al. Adaptive islet-specific regulatory CD4 T cells control autoimmune diabetes and mediate the disappearance of pathogenic Th1 cells in vivo. *J Immunol*. 2006;176(8):4730-9.
163. Hall B, Dembinski J, Sasser AK, Studeny M, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. *International journal of hematology*. 2007;86(1):8-16.
164. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26(1):99-107.
165. Kay TW, Campbell IL, Oxbrow L, Harrison LC. Overexpression of class I major histocompatibility complex accompanies insulinitis in the non-obese diabetic mouse and is prevented by anti-interferon-gamma antibody. *Diabetologia*. 1991;34(11):779-85.
166. Suarez-Pinzon W, Rajotte RV, Mosmann TR, Rabinovitch A. Both CD4+ and CD8+ T-cells in syngeneic islet grafts in NOD mice produce interferon-gamma during beta-cell destruction. *Diabetes*. 1996;45(10):1350-7.
167. Dunger A, Cunningham JM, Delaney CA, Lowe JE, Green MH, Bone AJ, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin secretion and cause DNA damage in unweaned-rat islets. Extent of nitric oxide involvement. *Diabetes*. 1996;45(2):183-9.
168. Suk K, Kim S, Kim YH, Kim KA, Chang I, Yagita H, et al. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *J Immunol*. 2001;166(7):4481-9.
169. Kim KA, Lee MS. Recent progress in research on beta-cell apoptosis by cytokines. *Front Biosci*. 2009;14:657-64.

170. Ezquer FE, Ezquer ME, Contador D, Ricca M, Simon V, Conget PA. MSC Anti-Diabetic Effect is Unrelated to Their Trans-Differentiation Potential but to their Capability to Restore Th1/Th2 Balance and to Modify the Pancreatic Microenvironment. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 2012;30(8):1664-74.
171. Moritani M, Yoshimoto K, Wong SF, Tanaka C, Yamaoka T, Sano T, et al. Abrogation of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice and protection against effector lymphocytes by transgenic paracrine TGF-beta1. *J Clin Invest.* 1998;102(3):499-506.
172. Tonkin DR, Haskins K. Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF-beta-dependent manner. *Eur J Immunol.* 2009;39(5):1313-22.
173. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol.* 2005;35(5):1482-90.
174. Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, et al. A critical role of IFNgamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* 2008;18(8):846-57.
175. Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunology and cell biology.* 2010;88(8):795-806.
176. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2012;188(3):976-80.
177. Kim YC, Bhairavabhotla R, Yoon J, Golding A, Thornton AM, Tran DQ, et al. Oligodeoxynucleotides stabilize Helios-expressing Foxp3+ human T regulatory cells during in vitro expansion. *Blood.* 2012;119(12):2810-8.
178. Elkord E. Comment on "expression of helios in peripherally induced foxp3+ regulatory T cells". *J Immunol.* 2012;189(2):500.
179. Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park BV, Ceccato CM, Bruno TC, et al. Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS One.* 2012;7(3):e34547.

APÊNDICES – Artigos científicos publicados

APÊNDICE A – Bassi ÊJ, Moraes-Vieira PMM, Vieira LM, Cunha CS, Hiyane MI, Basso AS, Pacheco-Silva A, Câmara NOS. Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. *Diabetes*, 2012. (In press)

APÊNDICE B – Bassi ÊJ, ALMEIDA DC, Moraes-Vieira PMM, Câmara NOS. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8: 329-42, 2012.

APÊNDICE C – Bassi ÊJ, Aita CAM, Câmara NOS. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World Journal of Stem Cells*, 3:1-8, 2011.

APÊNDICE D - Moraes-Vieira PMM, Bassi ÊJ, Araujo RC, Câmara NOS. Leptin as a link between the immune system and kidney-related diseases: leading actor or just a coadjuvant?. *Obesity Reviews*, 2012. (In press).

APÊNDICE E – Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi ÊJ, Correa-Silva R, Elias RM, Salvador F, Moraes-Vieira P, Cenedeze MA, Reis MA, Hiyane MI, Pacheco-Silva A, Gonçalves GM, Câmara NOS. TLR2, TLR4 and the MYD88 Signaling Pathway Are Crucial for Neutrophil Migration in Acute Kidney Injury Induced by Sepsis. *Plos One.* , v.7, p.e37584 - , 2012. (In press).

Immune Regulatory Properties of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Experimental Autoimmune Diabetes

Enio J. Bassi,¹ Pedro M.M. Moraes-Vieira,¹ Carla S.R. Moreira Sá,¹ Danilo C. Almeida,² Leonardo M. Vieira,¹ Cláudia S. Cunha,¹ Meire I. Hiyane,¹ Alexandre S. Basso,³ Alvaro Pacheco-Silva,² and Nels O.S. Câmara¹

Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) display immunosuppressive properties, suggesting a promising therapeutic application in several autoimmune diseases, but their role in type 1 diabetes (T1D) remains largely unexplored. The aim of this study was to investigate the immune regulatory properties of allogeneic ADMSC therapy in T cell-mediated autoimmune diabetes in NOD mice. ADMSC treatment reversed the hyperglycemia of early onset diabetes in 78% of diabetic NOD mice, and this effect was associated with higher serum insulin, amylin, and glucagon-like peptide 1 levels compared with untreated controls. This improved outcome was associated with downregulation of the CD4⁺ Th1-biased immune response and expansion of regulatory T cells (Tregs) in the pancreatic lymph nodes. Within the pancreas, inflammatory cell infiltration and interferon- γ levels were reduced while insulin, pancreatic duodenal homeobox-1, and active transforming growth factor- β 1 expression were increased. *In vitro*, ADMSCs induced the expansion/proliferation of Tregs in a cell contact-dependent manner mediated by programmed death ligand 1. In summary, ADMSC therapy efficiently ameliorates autoimmune diabetes pathogenesis in diabetic NOD mice by attenuating the Th1 immune response concomitant with the expansion/proliferation of Tregs, thereby contributing to the maintenance of functional β -cells. Thus, this study may provide a new perspective for the development of ADMSC-based cellular therapies for T1D.

Autoimmune type 1 diabetes (T1D) is an inflammatory T cell-mediated autoimmune destruction of insulin-producing β -cells at the pancreatic islets (1). This process is mainly mediated by Th1-effector CD4⁺ cells and by proinflammatory cytokines, such as interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-2, and tumor necrosis factor (TNF)- α (2). Some studies show that the treatment of nonobese diabetic (NOD) mice with anti-IFN- γ antibody prevents the development of diabetes (3), and the transgenic expression of this cytokine in diabetes-resistant mice results in disease development (4). In addition, the *in vitro* combination of IL-1 β , IFN- γ , and TNF- α has been

shown to increase the β -cell vulnerability to autoimmune destruction (5). The autoimmune process in T1D is also composed of regulatory components, such as CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs), which are important for suppressing the activation of the immune system and thereby maintaining homeostasis and tolerance to self-antigens (6). The reduction of Treg frequency by disrupting the B7/CD28 pathway could accelerate the onset of autoimmune diabetes in NOD mice (7), while the expansion of these cells in pancreatic lymph nodes (PLNs) was correlated with disease resistance (8). Several successful experimental therapies for T1D show a correlation between a better outcome and an increased frequency of these cells (9–11).

As a result of their immune suppressive/regulatory and regenerative potential, mesenchymal stem cells (MSCs) have emerged as a potentially new therapy for T1D. Several studies from the past few years show that MSCs are capable of suppressing the immune response by inhibiting the maturation of dendritic cells and suppressing the proliferation/function of T cells, B cells, and NK cells (12–15). Moreover, MSCs have been shown to induce the expansion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (16–18), and some studies evaluate the therapeutic effect of allogeneic or syngeneic bone marrow-derived MSCs in the prevention or reversion of autoimmune diabetes in several experimental models (19–26). It is important that adipose-derived (AD)MSCs, which can be isolated from fat tissue after liposuction and easily expanded in culture, have become an attractive source of MSCs for cell therapy. In addition, it has been shown that ADMSCs can suppress *in vivo* T-cell autoimmune responses in graft-versus-host disease and some experimental models of autoimmune diseases, such as collagen-induced arthritis, experimental colitis, and autoimmune encephalomyelitis (27–29). However, the immunosuppressive effect of ADMSCs in the treatment of T1D remains largely unexplored. In this study, we evaluated the therapeutic potential of ADMSCs in ameliorating the recent onset of experimental autoimmune diabetes in a NOD mouse model with regard to their immune regulatory properties. Therefore, we investigated the potential of ADMSC therapy to simultaneously suppress the Th1 CD4 T cell-mediated immune response involved in this disease and promote the expansion of Tregs.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

NOD (H2-A^b) mice were purchased from Taconic (Gottmansen, NY), and Balb/c mice (H2-A^d) were purchased from The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Professor Alexandre Salgado Basso (Universidade Federal de São Paulo) provided the C57BL/6 Foxp3-GFP knock-in mice. All procedures were conducted in accordance to the Brazilian Committee for Experimental Animals and were approved by the institutional ethics committee on animal use of the University of São Paulo.

From the ¹Department of Immunology, Laboratory of Transplantation Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; the ²Department of Medicine, Division of Nephrology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil; and the ³Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Nels O.S. Câmara, nels@chc.usp.br.

Received 20 June 2011 and accepted 9 April 2012.

DOI: 10.2337/diabetes.2011-0644

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/diabetes.2011-0644/-DC1>.

© 2012 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

Exploring the Role of Soluble Factors Associated with Immune Regulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells

Énio José Bassi · Danilo Cândido de Almeida ·
Pedro Manoel Mendes Moraes-Vieira ·
Nels Olsen Saraiva Câmara

Published online: 1 September 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Mesenchymal stem cells (MSCs) are characterized as multipotent stromal cells with the capacity for both self-renewal and differentiation into mesodermal cell lineages. MSCs also have a fibroblast-like phenotype and can be isolated from several tissues. In recent years, researchers have found that MSCs secrete several soluble factors that exert immunosuppressive effects by modulating both innate (macrophages, dendritic and NK cells) and adaptive (B cells and CD4+ and CD8+ T cells) immune responses. This review summarizes the principal trophic factors that are related to immune regulation and secreted by MSCs under both autoimmune and inflammatory conditions. The understanding of mechanisms that regulate immunity in MSCs field is important for their future use as a novel cellular-based immunotherapy with clinical applications in several diseases.

Keywords Mesenchymal stem cells · Immune regulation · Immune system · Soluble factors · Immunotherapy · Inflammation

É. J. Bassi · P. M. M. Moraes-Vieira · N. O. S. Câmara
Laboratory of Transplantation Immunobiology,
Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV,
Universidade de São Paulo-USP,
05508-000 São Paulo, Brazil

D. C. de Almeida
Nephrology Division, Medicine Department,
Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP,
04039-000 São Paulo, SP, Brazil

N. O. S. Câmara (✉)
Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences IV,
University of São Paulo,
Av. Prof. Linnaeus Pimentes, 1730,
05508-000 São Paulo, SP, Brazil
e-mail: niels@ich.usp.br

Introduction

Multipotent stromal cells or mesenchymal stem cells (MSC) are adult, adherent non-hematopoietic stem cells that were first isolated by Friedenstein et al. in 1970 from bone marrow stroma characterized by long-term self-renewal [1]. In recent years, these cells have been isolated from various post-natal tissues, including bone marrow, placenta, tooth pulp, skin, adipose tissue, the nervous system and kidney [2]. Morphologically, MSCs are cells with fibroblast-like properties (fusiform) and are characterized by their ability to form fibroblast colony-forming units (CFUs) in their early growth in vitro and the potential to differentiate into osteocytes, adipocytes and chondrocytes. Moreover, these cells do not express the hematopoietic surface markers CD14, CD45, CD34, CD133 and endothelial marker CD31 and are positive for CD105, CD166, CD54, CD90, CD65, CD13, CD73, Stro-1 and CD44 [3]. Although MSCs can be isolated from several sources, according to the International Society for Cellular Therapy [4], every MSC should have a plastic-adherent growth pattern, expression of specific surface antigens and the potential for multilineage differentiation (osteogenic, chondrogenic and adipogenic) (Fig. 1) [5]. Moreover, the term "multipotent mesenchymal stromal cells" has been generally used instead of "mesenchymal stem cells" [5].

MSCs have the potential to provide effective treatment for a wide range of diseases and can be used in several applications in regenerative medicine such as tissue repair and gene delivery. In addition, MSCs were among the first stem cells to be introduced into clinical practice. Interestingly, these cells can modulate the immune response by both inhibiting the maturation/differentiation of dendritic cells and by suppressing the activation and/or function of T and B lymphocytes and NK cells in several autoimmune

Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand?

Énio José Bassi, Carlos Alberto Mayora Alta, Niels Olsen Saraiva Câmara

Énio José Bassi, Niels Olsen Saraiva Câmara, Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo, Brazil
Carlos Alberto Mayora Alta, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901 Curitiba, Brazil

Author contributions: Bassi EJ and Alta CAM wrote the manuscript. Saraiva Câmara NO wrote and reviewed the manuscript. Supported by Grants 08/55447-1, 09/51649-1 and 07/07139-3 from the State of São Paulo Foundation for Research Support (FAPESP), Brazilian Council of Scientific and Technologic Development (470533/2007-2, CNPq) and Complex Fluids INCT. Correspondence to: Niels Olsen Saraiva Câmara, MD, Professor, Laboratory of Transplantation Immunobiology, Department of Immunology, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900 São Paulo, Brazil. niels@ich.usp.br
Telephone: +55-11-30917388 Fax: +55-11-30917224

Received: July 21, 2010 Revised: December 18, 2010

Accepted: December 25, 2010

Published online: January 26, 2011

Key words: Immunosuppression; Mesenchymal stem cell; Immune system; Inflammation; Autoimmune disease

Peer reviewer: Guangwen Ren, PhD, Department of Molecular Genetics, Microbiology and Immunology, Robert Wood Johnson Medical School-UMDNJ, 675 Hoes Lane West, Piscataway, NJ 08854, United States

Bassi EJ, Alta CAM, Saraiva Câmara NO. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells* 2011; 3(1): 1-8 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v3/i1/1.htm>
DOI: <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v3.i1.1>

Abstract

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) can be isolated and efficiently expanded from almost every single body tissue and have the ability of self-renewal and differentiation into various mesodermal cell lineages. Moreover, these cells are considered immunologically privileged, related to a lack of surface expression of costimulatory molecules required for complete T cell activation. Recently, it has been observed that MSC are capable of suppressing the immune response by inhibiting the maturation of dendritic cells and suppressing the function of T lymphocytes, B lymphocytes and natural killer cells in autoimmune and inflammatory diseases as a new strategy for immunosuppression. The understanding of immune regulation mechanisms by MSC is necessary for their use as immunotherapy in clinical applications for several diseases.

© 2011 Baishideng. All rights reserved.

INTRODUCTION

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) are adult multipotent non-hematopoietic stem cells capable of self-renewal and generation of different cell lines. Friedenstein and colleagues in 1970 were the first to isolate and report a population of adherent stem cells from the bone-marrow stroma^[1]. Although initially encountered in the bone marrow, they are now shown to reside in almost every type of connective tissue and can be isolated from various post-natal tissues such as bone marrow, cornea and retina, placenta, tooth pulp, skin, nervous system and kidney^[2]. Due to the facility of isolation and extensive differentiation potential, MSC are among the first stem cells to be introduced in clinical practice with a great potential in cell therapy.

Isolation, differentiation and expansion capacity

Generally, these cells can self-renew and are multipotent and therefore have a potential of differentiation more limited than embryonic stem cells which are pluripotent. MSC have been shown to be able to differentiate *in vitro* and *in vivo* into various mesodermal cell lineages including osteocytes, adipocytes, chondrocytes, muscle and myelo-sup-

Obesity Comorbidity/Etiology and Pathophysiology

Leptin as a link between the immune system and kidney-related diseases: leading actor or just a coadjuvant?

P. M. M. Moraes-Vieira¹, E. J. Bassi¹, R. C. Araujo² and N. O. S. Camara¹

¹Immunology Department, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, SP, Brazil; ²Department of Biophysics, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 20 December 2011; revised 29 February 2012; accepted 8 March 2012

Address for correspondence: N. O. S. Camara, Department of Immunology, Institute of Biomedical Science IV, Universidade de São Paulo, Rua Prof. Lineu Prestes, 1730, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: niels@icb.usp.br

Summary

Food intake and nutritional status modify the physiological responses of the immune system to illness and infection and regulate the development of chronic inflammatory processes, such as kidney disease. Adipose tissue secretes immune-related proteins called adipokines that have pleiotropic effects on both the immune and neuroendocrine systems, linking metabolism and immune physiology. Leptin, an adipose tissue-derived adipokine, displays a variety of immune and physiological functions, and participates in several immune responses. Here, we review the current literature on the role of leptin in kidney diseases, linking adipose tissue and the immune system with kidney-related disorders. The modulation of this adipose hormone may have a major impact on the treatment of several immune- and metabolic-related kidney diseases.

Keywords: Foxp3, kidney, leptin, nephrology.

obesity reviews (2012) **13**, 733–743

Introduction

Obesity, a pathological condition that is characterized by excessive fat deposits, is currently a major public health issue and an important risk factor contributing to the development of many different diseases worldwide. Obesity is correlated with low-grade inflammation of white adipose tissue and is accompanied by chronic activation of the innate immune system, insulin resistance, impaired glucose tolerance and diabetes (1). In addition, obesity has been associated with hypertension, hypercholesterolaemia, cardiovascular diseases, several types of tumours and immune dysfunction that leads to higher infection rates and delayed wound healing (1–3). The changes in energy homeostasis associated with obesity have been attributed to both physiological imbal-

ances, which can be caused by neuroendocrine factors, metabolic disturbances, genetic traits or other biological factors, and environmental influences, such as lifestyle changes, excessive energy intake and/or reduced physical activity (4). In this review, we will discuss the current understanding of leptin and its complex role in modulating immune responses, with an emphasis on kidney diseases.

The influence of adipose tissue on kidney diseases

Body fat secretes a variety of soluble factors called adipokines, which are cytokines that are produced mainly by adipocytes (5). The immune-related proteins generated by adipocytes include leptin, adiponectin, resistin, visfatin, tumour necrosis factor (TNF), adipisin and interleukin (IL)-6, as shown in Fig. 1. Among these adipokines, leptin is considered to be a particularly important adipocyte-generated immune-related protein. Adipose tissue functions not only to store energy but also to control immune

Support: This work was supported by the Brazilian Foundation – FAPESP (09/0450-7, 2010/62180-4, 2012/02270-2 and 07/07139-3), International Associated Laboratory in Renal Immunopathology (CNPq/insam), INCT Complex Fluids and CNPq.

TLR2, TLR4 and the MYD88 Signaling Pathway Are Crucial for Neutrophil Migration in Acute Kidney Injury Induced by Sepsis

Angela Castoldi^{1,2}, Tarcio Teodoro Braga², Mathews Correa-Costa², Cristhiane Fávoro Aguiar¹, Ênio José Bassi², Reinaldo Correa-Silva¹, Rosa Maria Elias¹, Fábila Salvador¹, Pedro Manoel Moraes-Vieira², Marcos Antônio Cenedeze¹, Marlene Antônia Reis⁴, Márcia Ioshie Miyane², Álvaro Pacheco-Silva^{1,3}, Giselle Martins Gonçalves², Nils Olsen Saraiva Câmara^{1,2*}

1 Disciplina de Nefrologia, Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Laboratório de Imunobiologia de Transplantes, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** EEP, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil, **4** Patologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Brazil

Abstract

The aim of this study was to investigate the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in sepsis-induced AKI. C57BL/6 TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} and MyD88^{-/-} male mice were subjected to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). Twenty four hours later, kidney tissue and blood samples were collected for analysis. The TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} and MyD88^{-/-} mice that were subjected to CLP had preserved renal morphology, and fewer areas of hypoxia and apoptosis compared with the wild-type C57BL/6 mice (WT). MyD88^{-/-} mice were completely protected compared with the WT mice. We also observed reduced expression of proinflammatory cytokines in the kidneys of the knockout mice compared with those of the WT mice and subsequent inhibition of increased vascular permeability in the kidneys of the knockout mice. The WT mice had increased GR1⁺ cells migration compared with the knockout mice and decreased in GR1⁺ cells migration into the peritoneal cavity. The TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, and MyD88^{-/-} mice had lower neutrophil infiltration in the kidneys. Depletion of neutrophils in the WT mice led to protection of renal function and less inflammation in the kidneys of these mice. Innate immunity participates in polymicrobial sepsis-induced AKI, mainly through the MyD88 pathway, by leading to an increased migration of neutrophils to the kidney, increased production of proinflammatory cytokines, vascular permeability, hypoxia and apoptosis of tubular cells.

Citation: Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi EJ, et al. (2012) TLR2, TLR4 and the MYD88 Signaling Pathway Are Crucial for Neutrophil Migration in Acute Kidney Injury Induced by Sepsis. PLOS ONE 7(5): e37584. doi:10.1371/journal.pone.0037584

Editor: Holger K. Eltzschig, University of Colorado Denver, United States of America

Received: January 23, 2012; **Accepted:** April 22, 2012; **Published:** May 24, 2012

Copyright: © 2012 Castoldi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Brazilian Foundation – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grants Number 07/07129-3; International Associated Laboratory (CNPq – National Council of Technological and Scientific Development), and National Institute of Science and Technology (INCT) Complex Fluids. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: nels@fichusp.br

Introduction

Severe sepsis is the major cause of acute kidney injury (AKI) [2–4]. Despite all efforts to better comprehend this pathology, little progress has been achieved. This might be due to the fact that most research groups have focused more on proving that AKI is mainly caused by changes in kidney hemodynamics, while other groups have shown the importance of non-hemodynamic factors in the establishment of this disease, such as immunological factors [1,2]. The kidney damage after sepsis is likely a result of these two important contributions, starting with the recognition of bacterial products by Toll-like receptors (TLRs), which recognize pathogens, such as PAMPs (pathogen associated molecular patterns) and are responsible for the inflammatory cascade in sepsis.

Signal transduction through TLRs is partially mediated by a TLR adaptor protein MyD88 (MyD88 Differentiation Factor 88). MyD88 can bind to the TIR domain and recruit signaling

proteins, leading to the activation of transcription factors, such as NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) and AP-1 (Activator Protein 1), and the expression of genes related to the inflammatory response, such as tubular necrosis factor TNF- α , interleukin-6 and IL-1 β .

Several studies have shown the importance of TLRs in the development of sepsis, but few studies have correlated the activation of TLRs with the development of AKI. During sepsis, TLRs are activated by bacteria and endogenous ligands such as HMGB-1 and HSP70, which are released during cellular stress, and interact with the immune system in the extracellular environment [3,4]. These alarmins exacerbate the kidney inflammatory process during sepsis, which results in greater damage and necrosis.

Thus, we hypothesized that mice deficient in TLR2 and TLR4 and the adaptor protein MyD88 respond less effectively to bacteria, leading to a milder inflammatory process and therefore weaker protection of renal function compared with wild-type mice.