

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

## 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- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  35 dias após o tratamento. Além disso, no pâncreas, uma redução do infiltrado celular inflamatório e nos níveis de IFN- $\gamma$  e aumento de TGF- $\beta$ 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- $\gamma$ + and CD4+TNF- $\alpha$ + cells) and expansion of Tregs (CD4+CD25+Foxp3+) in PLN verified 35 days after treatment. Moreover, insulinitis and IFN- $\gamma$  levels were also reduced while insulin, PDX-1 and active TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 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  $\beta$ -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.

# 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 colagenase 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].

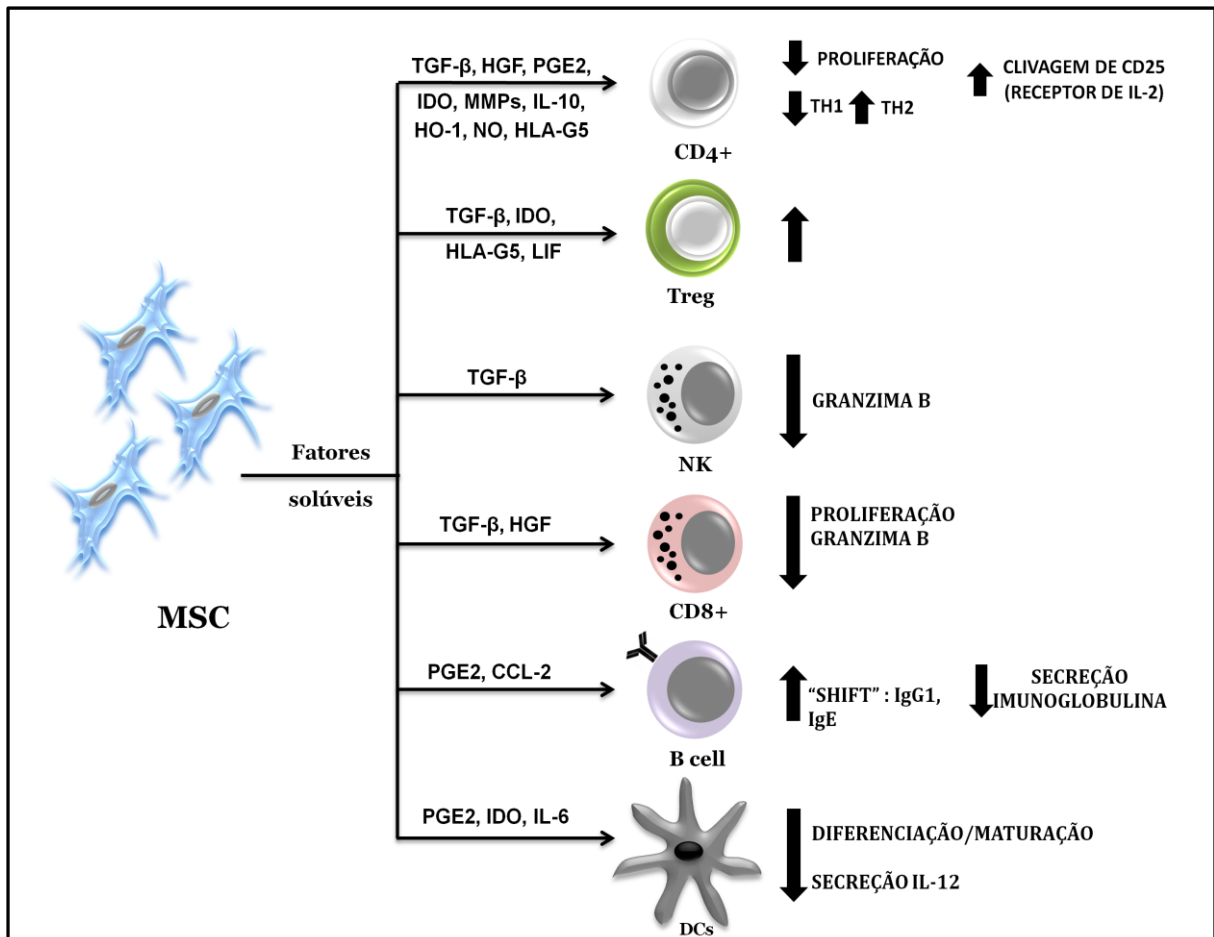
Bartholomew et al. [31] foram os primeiros a mostrar que a administração endovenosa de MSCs alogênicas prolongava a sobrevida de enxerto de pele, suprimindo a resposta de células T *in vivo*. Nos anos seguintes, diversos estudos avaliaram as propriedades imunossupressoras das MSCs em diversos modelos 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- $\beta$ 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- $\gamma$ , 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- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  [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<sup>+</sup> em murinos. Essas células expressam constitutivamente a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dentro de um curto período de tempo pós-transferência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 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- $\beta$ 1 [60-62]. As células Tregs podem atuar suprimindo a resposta imune por diversos mecanismos envolvendo fatores solúveis, como por meio das citocinas TGF- $\beta$ 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- $\gamma$  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- $\beta$  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- $\beta$  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<sup>-/-</sup> 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- $\gamma$  e células T CD4<sup>+</sup> 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- $\alpha$  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- $\beta$  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<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> 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  $\beta$  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<sup>+</sup> efectoras com um perfil do tipo Th1 [102]. Durante o seu desenvolvimento ocorre a infiltração nas ilhotas pancreáticas de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, linfócitos B e macrófagos, resultando em um processo inflamatório denominado insulite [102, 103]. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> reagem então contra os auto-antígenos expressos nas células  $\beta$  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  $\beta$  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<sup>+</sup> produzem citocinas pró-inflamatórias como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que induzem a apoptose das células  $\beta$  [105]. O tratamento de camundongos NOD (do inglês, “*non-obese diabetic*”), modelo experimental de DMT1, com anticorpo anti-IFN- $\gamma$  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 $\beta$ , 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 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  aumenta a vulnerabilidade da célula  $\beta$  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<sup>+</sup> e CD68<sup>+</sup> presentes no infiltrado mononuclear [112]. Assim, a morte celular decorrente da insulite é causada principalmente pelo contato direto das células  $\beta$  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 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), 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  $\beta$ , 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  $\beta$  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  $\beta$ , 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+ efetoras 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.

## 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  $\beta$  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 $\gamma$ + e TNF- $\alpha$ + (perfil Th1) foi observada nos linfonodos pancreáticos;
- no pâncreas, o tratamento com ADMSCs atenuou a resposta imune Th1 (IFN- $\gamma$ ) combinada ao aumento da expressão de TGF- $\beta$ 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. Gnecci 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 BXSb 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. *Cytherapy*. 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, Lonnie 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](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, Klotting 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 IFN-gamma 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.