

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

O IMPACTO DAS VIAS INTRAPANCREÁTICA, INTRAVENOSA
E INTRACAPSULAR RENAL NO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS – REGENERAÇÃO
MORFOFUNCIONAL DO DIABETES TIPO 1 EXPERIMENTAL.

BIANCA MARIANI GONÇALVES

Botucatu – SP
Fevereiro, 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

O IMPACTO DAS VIAS INTRAPANCREÁTICA, INTRAVENOSA
E INTRA-CAPSULAR RENAL NO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS – REGENERAÇÃO
MORFOFUNCIONAL DO DIABETES TIPO I EXPERIMENTAL.

BIANCA MARIANI GONÇALVES

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo
Machado

Co-orientador: Prof. Dra. Célia Regina
Nogueira

Botucatu – SP
Fevereiro, 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gonçalves, Bianca Mariani.

O impacto das vias intrapancreática, intravenosa e intra-capsular renal no transplante de células-tronco mesenquimais : Regeneração morfofuncional do diabetes tipo I experimental / Bianca Mariani Gonçalves. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado

Coorientador: Célia Regina Nogueira

Capes: 50501003

1. Terapia celular. 2. Diabetes Mellitus experimental. 3. Imunomodulação. 4. Regeneração. 5. Transplante de Células-Tronco.

Palavras-chave: diabetes experimental; efeito parácrino; imunomodulação; reparação tissular; terapia celular.

Nome do autor: BIANCA MARIANI GONÇALVES

Título: O impacto das vias intrapancreática, intravenosa e intra-capsular renal no transplante de células-tronco mesenquimais – regeneração morfofuncional do diabetes tipo I experimental.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro

Membro titular

Departamento de Patologia e Medicina Forense

FMRP – USP – Ribeirão Preto

Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro titular

Departamento de Patologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

DATA DA DEFESA: 16/02/2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida. Dedico-o também aos meus pais, ao meu futuro marido e ao meu querido orientador; sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP por ter sido essencial para a minha formação, ao longo desses 10 anos.

Agradeço ao CNPQ, por ter concedido auxílio financeiro em forma de bolsa para a realização deste trabalho.

Agradeço à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e a todos os funcionários pertencentes a unidade, por me fornecerem todos os subsídios necessários para a execução deste trabalho.

Agradeço à Prof. Célia Regina Nogueira, minha co-orientadora de mestrado e orientadora de doutorado, por ter me dado a chance de ingressar no melhor grupo de pesquisa da UNIPEX.

Agradeço ao Prof. Alexandre Todorovic Fabro, por ter sido tão participativo nestes dois anos, contribuindo significativamente para o sucesso deste projeto.

Agradeço à Heloísa Vicente Garcia e Prof. Elenice Deffune, do Laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) pela concessão das células utilizadas neste estudo e por todo auxílio durante o andamento da pesquisa.

Agradeço aos meus amigos do grupo de pesquisa: Bases Genéticas das Doenças Endocrinológicas da UNIPEX, cujo eu também faço parte, por todo o apoio imprescindível durante o projeto, sem vocês, nada disso teria sido concluído.

Agradecimento mais do que especial ao meu querido amigo e orientador, Prof. Luiz Henrique de Araújo Machado, por toda paciência, parceria, amizade e paternidade durante todos esses anos. Um dia espero ter um terço da paixão que você tem por ensinar.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -- Classificação do diabetes mellitus de acordo com a etiologia, segundo a American Diabetes Association

FIGURA 2 - Resposta auto-imune adaptativa do DM 1

GONÇALVES, B.M. O impacto das vias intrapancreática, intravenosa e intra-capsular renal no transplante de células-tronco mesenquimais – regeneração morfofuncional do diabetes tipo I experimental. Botucatu, 2018. 87p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma das doenças que mais tem aumentado sua incidência na última década. As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTMs-TA) possuem características imunomoduladoras e reparadoras, sendo capazes de reverter efeitos sistêmicos da doença. Sendo assim, nosso trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do transplante de CTMs-TA pelas vias intravenosa, intrapancreática e intra-capsular renal em ratos diabéticos e comparar a que melhor exerce efeito regenerador. Para o estudo, utilizamos 45 ratos, *wistar*, fêmeas, divididos em 5 grupos: GCS – controle sadio; GCD – controle diabético; GIV – diabético, via intravenosa; GIP – diabético, via intrapancreática; GIR – diabético, via cápsula renal. Para a indução, utilizamos uma única aplicação intraperitoneal (i.p) de Aloxana (120mg/kg), e após 3 dias, os animais foram submetidos ao transplante com as CTMs-TA (2×10^6 cel/animal). Após 15 dias do transplante, os animais foram eutanasiados. O transplante de CTMs-TA pela cápsula renal foi capaz de reverter a hiperglicemia, além de restaurar o diâmetro das ilhotas e restabelecer a função das massa β -pancreática. Concluímos que a cápsula renal foi a que apresentou melhores resultados na regeneração morfofuncional do pâncreas diabético. As CTMs-TA utilizadas neste estudo foram capazes de exercer um importante efeito parácrino, podendo ser utilizadas como alternativa para a melhoria da qualidade de vida de indivíduos diabéticos.

Palavras-Chave: terapia celular, células β , reparação tissular, efeito parácrino.

GONÇALVES, B.M. The impact of mesenchymal stem cell transplantation on intrapancreatic, intravenous and renal capsule routes - morpho functional regeneration of alloxan-induced diabetic rats. Botucatu, 2018. 87 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

ABSTRACT

Diabetes mellitus is one of the diseases that has increased your incidence in the last decade. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ATMSCs) have immunomodulatory and regenerate characteristics, thus are capable of reverse the damages of the disease. Therefore, our study aimed to evaluate the impact of ATMSCs transplantation by the intravenous, intrapancreatic and intra-capsular renal routes in diabetic rats and detect the best route to promote regenerative effects. We used 45 female wistar rats, divided into 5 groups: GCS – healthy control; GCD - diabetic control; GIV - diabetic, intravenous; GIP - diabetic, intrapancreatic route; GIR - diabetic, via renal capsule. For induction, we used a single intraperitoneal application (i.p) of Alloxan (120mg / kg) and after 3 days, the animals were transplanted with the ATMSCs (2×10^6 / animal). After 15 days of transplantation, the animals were euthanized. The transplantation of ATMSCs by the renal capsule were able to reverse hyperglycemia, besides restoring the islet diameter and restoring the function of β -pancreatic mass. We conclude that the renal capsule presented the best results in the morphofunctional regeneration of the diabetic pancreas. The stem cells used in this study were able to exert an important paracrine effect, and could be used as an alternative to improve the quality of life on diabetic patients.

Key Words: cellular therapy, β cellular, tissue repair, paracrine effects

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 DIABETES MELLITUS	15
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA	15
2.1.2. DEFINIÇÃO	16
2.1.3. CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES	17
2.1.3.1. <i>Atual classificação do diabetes: segundo a etiologia</i>	17
2.1.3.2. <i>Perspectivas futuras</i>	19
2.1.4. FISIOPATOLOGIA DM 1	20
2.1.5. OS DESAFIOS ATUAIS	22
2.2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO	24
2.2.1. AVANÇOS DA TERAPIA GÊNICA NO DIABETES MELLITUS.	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVOS GERAIS:.....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	28
4. ARTIGO CIENTÍFICO	30
5. DISCUSSÃO GERAL	71
6. CONCLUSÕES GERAIS	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	87

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma síndrome designada a um conjunto de sintomas secundários a deficiência da ação insulina, seja devido à resistência ou ausência de produção. Sabe-se há décadas que portadores de diabetes mellitus tipo 1 apresentam aspectos autoimunes perpetuantes nas células beta pancreáticas, levando a deficiência de sua função. (SKYLER et al., 2016)

Atualmente, reporta-se que independente da classificação etiológica do diabetes, seja tipo 1 ou 2, os fatores que resultarão em perda progressiva de células beta pancreáticas e consequente hiperglicemia, conferem a todos os pacientes os mesmos riscos de desenvolverem graves complicações (ASSOCIATION, 2017; SKYLER et al., 2016).

O paciente diabético acaba por ser predisposto a sofrer graves complicações durante toda a vida, como: cetoacidose diabética, alterações micro e macro vasculares levando à perda de membros, doenças cardíacas, e por final, ser portador de falência renal devido ao agravamento da nefropatia diabética (BLOOM; RAND, 2013; BOSE; SHENOY P, 2016; FLOYEL; KAUR; POCIOT, 2015; IN'T VELD, 2011; JHA et al., 2016).

A doença vem aumentando sua incidência consideravelmente nos últimos 10-20 anos, deixando-a entre as principais doenças com maior taxa de mortalidade do mundo, algumas vezes ficando à frente da AIDS e de neoplasias. (ASSOCIATION, 2017; DIAZ-VALENCIA; BOUGNÈRES; VALLERON, 2015)

Atualmente, sabe-se que uma das formas de tentar melhorar a qualidade de vida desses pacientes e controlar as principais complicações, é investir em

terapias que controlem a disfunção das células β -pancreáticas (BENTHUYSEN; CARRANO; SANDER, 2016; CARLSSON; KORSGREN; LE BLANC, 2015; MA; ZHU, 2017). Todavia, é necessário elucidar os diferentes mecanismos que podem culminar na falência da massa β pancreática e com isso, investir individualmente em terapias regeneradoras e imunomoduladoras (SKYLER et al., 2016)

A terapia celular vem sendo amplamente estudada como alternativa às técnicas atuais de melhoria de qualidade de vida do paciente diabético (HASHEMIAN; KOUHNAVARD; NASLI-ESFAHANI, 2015; TAKESHITA et al., 2008; WANG et al., 2014).

As células-tronco mesenquimais têm sido amplamente estudadas, devido a sua plasticidade, capacidade de diferenciação e imunomodulação, e com isso, possibilidade de auxiliar na regeneração de células beta pancreáticas lesionadas. (ABDI et al., 2008; CARLSSON; KORSGREN; LE BLANC, 2015; FIORINA et al., 2011).

As células-tronco de tecido adiposo têm obtido melhores desempenhos em relação ao uso em pacientes diabéticos, tanto pela fácil obtenção quanto pela resposta positiva, mesmo anos após o transplante. (DAVE et al., 2015; KHORSANDI et al., 2015; NGUYEN et al., 2016). Sendo assim, é extremamente importante estabelecer melhores vias de aplicação e, atualmente, há inúmeras vias sendo estudadas, entre elas: intravenosa, intrapancreático, intra-capsular renal, intra-esplênica, intra-hepática (KHORSANDI et al., 2015; MOSHREFI et al., 2015; PHAN et al., 2014; YAOCHITE et al., 2015), porém, nenhuma comparação in vivo em relação a viabilidade/vantagem do uso dessas vias.

Devido à ausência desta comparação, nos propusemos a estudar os efeitos de três principais vias de aplicação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo em ratos experimentalmente diabéticos, bem como avaliar a inclusão de células beta-pancreática nos pâncreas lesionados por avaliação de variáveis de interesse.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

2.1.1 Epidemiologia

O diabetes mellitus é uma das doenças que mais aumenta sua prevalência no Brasil e no mundo. Dados epidemiológicos recentes mostraram que no início de 2014, estimava-se que cerca de 382 milhões de pessoas no mundo eram portadoras da doença, sendo que a estimativa era a de atingir cerca de 470 milhões de indivíduos somente em meados de 2035.

No entanto, no final deste mesmo ano, novos dados epidemiológicos revelaram um número alarmante: a estimativa de indivíduos diabéticos já era de aproximadamente 422 milhões (ORGANIZATION, 2016).

Ao comparar a prevalência atual com a prevalência da década de 80, onde cerca de 108 milhões de indivíduos eram acometidos pela doença, nota-se um crescimento de 4,7% para 8,5% em portadores adultos, ou seja, praticamente o dobro. Em relação ao Diabetes tipo 1 (DM 1), os estudos epidemiológicos são restritos, visto que os sintomas são muito característicos (DIAZ-VALENCIA; BOUGNÈRES; VALLERON, 2015), entretanto, estima-se no Brasil que a cada 100 mil crianças até 15 anos, pelo menos 7,6% delas são diabéticas.(SBD, 2015). Tanto a prevalência quanto a incidência do DM 1 vêm aumentando em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento e em crianças com menos de 5 anos de idade. No Brasil, essa incidência aumenta cerca de 3%

ao ano, em meados de 1980 as crianças diabéticas possuíam em média 12 anos frente a 9,5 nos anos 2000.(DE CASTRO, 2015; DIAZ-VALENCIA; BOUGNÈRES; VALLERON, 2015; SBD, 2015).

Cabe ressaltar que o cenário brasileiro quando se fala de diabetes mellitus é extremamente preocupante, dados do Ministério da Saúde demonstraram que em 2010, a doença foi responsável por levar a morte de 68,5mil brasileiros, frente a 42 mil mortes por acidentes de trânsito e 12 mil mortes pela aids, ou seja, 4 vezes mais. (ORGANIZATION, 2016; SBD, 2015).

Sendo assim, o impacto da doença para a população tem sido cada vez mais catastrófico, tanto pela necessidade de manejo frequente, custo alto da terapia e indisponibilidade de melhores recursos em sistemas públicos de saúde. (DIAZ-VALENCIA; BOUGNÈRES; VALLERON, 2015; ORGANIZATION, 2016)

2.1.2. Definição

O diabetes mellitus caracteriza-se por um conjunto de sintomas decorrentes de hiperglicemia persistente originária de defeitos na secreção de insulina.(DIABETES, 2010). As complicações agudas são altamente contribuintes para aumentar a taxa de mortalidade da doença ou reduzir a qualidade de vida do paciente. A curto prazo, as altas taxas glicêmicas podem predispor o paciente a cetoacidose diabética, principalmente no DM 1. E as quedas glicêmicas bruscas, geralmente secundário a excesso de exercício físico ou altas doses de medições, podem levar o paciente às perdas de consciência e/ou convulsões. Entretanto, a longo prazo, recorrentes falhas de manejo podem

gerar graves lesões irreversíveis em olhos, rins, nervos periféricos, coração e vasos sanguíneos (DIABETES, 2010; WHO, 2006).

Atualmente, estudos demonstram que o diabetes é o maior causador de amputação de membros pélvicos em seres humanos e a porcentagem de casos tanto no Brasil quanto no mundo, só aumenta. (PAISEY et al., 2017; SAYURI et al., 2010). Sendo assim, cabe ressaltar a necessidade de mais estudos em busca de uma melhor qualidade de vida para estes pacientes, visto que a melhor estratégia para evitar tais complicações, é o manejo precoce e eficaz da doença, muitas vezes impossíveis devido ao alto custo requerido.(DIAZ-VALENCIA; BOUGNÈRES; VALLERON, 2015).

2.1.3. Classificação do diabetes

2.1.3.1. Atual classificação do diabetes: segundo a etiologia

O diabetes mellitus tipo 1 e 2 são apresentações heterogêneas da mesma doença, cuja apresentação clínica e progressão podem variar consideravelmente. A classificação do paciente é um quesito imprescindível para a escolha da terapia correta, sendo assim, o consenso *da American Diabetes Association* afirma que pacientes portadores de qualquer tipo de diabetes podem necessitar de insulina em alguma fase da doença e que o uso dela não é satisfatória para a classificação etiológica (ASSOCIATION, 2014)

Contudo, o diagnóstico tem sido cada vez mais desafiador e muitos pacientes não podem ser claramente identificados etilogicamente no momento do diagnóstico, principalmente devido a crescente ocorrência de paradigmas,

como: aumento da incidência da obesidade infantil; acometimento tardio do tipo 1 em adultos jovens, sem sintomas característicos; ocorrência de cetoacidose em pacientes portadores de DM 2 e, entre outros (ASSOCIATION, 2014; WHO, 2006)

Embora haja dificuldades na distinção inicial do paciente, com o tempo, o diagnóstico tende a tornar-se mais óbvio. Em 1997, a *American Diabetes Association* revisou os termos de classificação e eliminou as seguintes classificações: DM tipo 1 ou diabetes mellitus insulín dependente ou diabetes juvenil; DM tipo 2 ou diabetes mellitus não insulín dependente ou diabetes do adulto. Sendo assim, desde então, a ADA tem proposto a classificação do diabetes de acordo com 4 categorias gerais (ASSOCIATION, 2014, 2017; DIABETES, 2010):

- Diabetes tipo 1 (Destruição da célula beta pancreática levando a deficiência absoluta de insulina)
- Diabetes tipo 2 (Perda progressiva da produção de insulina pela célula beta pancreática secundário a distúrbios metabólicos que geram resistência)
- Diabetes Mellitus Gestacional (GDM) (Quando diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre de gravidez e que não era claramente declarada antes da gestação)
- Tipos específicos de Diabetes secundário a inúmeras outras causas (FIGURA 1)

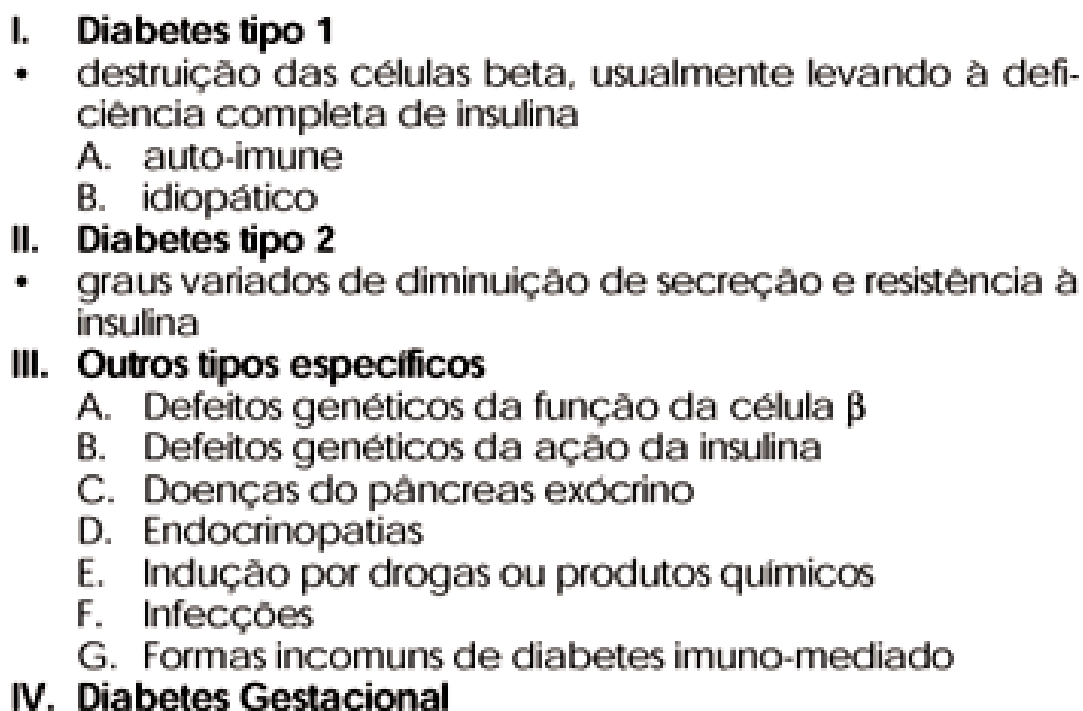
- 
- I. Diabetes tipo 1**
 - destruição das células beta, usualmente levando à deficiência completa de insulina
 - A. auto-imune
 - B. idiopático
 - II. Diabetes tipo 2**
 - graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina
 - III. Outros tipos específicos**
 - A. Defeitos genéticos da função da célula β
 - B. Defeitos genéticos da ação da insulina
 - C. Doenças do pâncreas exócrino
 - D. Endocrinopatias
 - E. Indução por drogas ou produtos químicos
 - F. Infecções
 - G. Formas incomuns de diabetes imuno-mediado
 - IV. Diabetes Gestacional**

FIGURA 1 -- Classificação do diabetes mellitus de acordo com a etiologia, segundo a American Diabetes Association

2.1.3.2. Perspectivas futuras

Embora as classificações estejam estabelecidas, em outubro de 2015, a ADA, JDFR, o European Association for the Study of Diabetes e a American Association of Clinical Endocrinologists se uniram em um simpósio que visava discutir os determinantes genéticos e ambientais e riscos de progressão para o DM 1 e 2 além de determinar abordagens terapêuticas apropriadas baseadas tanto na fisiopatologia quanto no estágio da doença com o intuito de estabelecer um consenso para o diagnóstico personalizado.

O ponto mais relevante do consenso é o de que tanto o DM 1 quanto o DM 2 podem envolver fatores genéticos e ambientais que resultam em perda

progressiva da massa e/ou função das células beta pancreáticas, resultando no estado de hiperglicemia. Uma vez hiperglicêmico, pacientes com todas as formas de diabetes possuem o mesmo risco de desenvolverem complicações, embora muitas das vezes, a taxa de progressão possa ser diferente. Concluindo assim, que independente da etiologia inicial, futuramente, o sucesso de uma terapia individualizada para o diabetes exigirá uma melhor caracterização acerca das muitas vias envolvidas no processo de morte e função das células produtoras de insulina.(ASSOCIATION, 2017; SBD, 2015)

2.1.4. Fisiopatologia DM 1

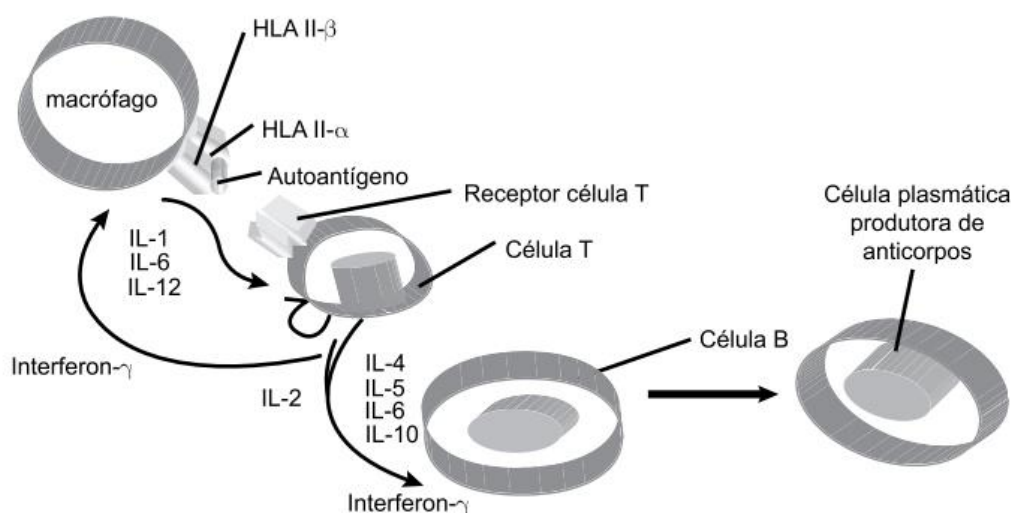
O DM tipo 1 costuma afetar cerca de 5-10% da população e, de um modo geral, esta forma da doença relaciona-se com deficiência absoluta da secreção insulínica por destruição das células β -pancreáticas, envolvendo mecanismos autoimunes ou até mesmo, idiopática. (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999; DIABETES, 2010)

Os linfócitos são células produzidas pela medula óssea e são responsáveis por conferir resposta imune específica ao nosso organismo, sendo capazes de reconhecer e distinguir antígenos e devido a uma falha neste reconhecimento, inicia-se o processo de destruição das ilhotas pancreáticas, denominado insulite. Sendo assim, há infiltração de linfócitos T CD4+; linfócitos T CD8+; linfócitos B e células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. Além dos linfócitos, também há o envolvimento de células do tipo “*Natural Killer*”, ou célula NK, que não necessitam de ativação antigênica específica e são capazes de gerar uma cascata de reações, liberando citocinas

pró-apoptóticas para destruir células tumorais ou infectadas por vírus.(BALDA; PACHECO-SILVA, 1999).

No início do processo inflamatório, a ativação de linfócitos T CD4+ age liberando citocinas, como: interleucina 1 (IL-1), interferon γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α), contribuindo significativamente para a morte das células beta (imunidade celular) e ativando os linfócitos T-CD8 e B, produtores de auto anticorpos (imunidade humoral) (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999; GEPTS; LECOMPTE, 1981; SESTERHEIM; SAITOVITCH; STAUB, 2007).

Este período que antecipa o diabetes e é tido como uma fase subclínica ou assintomática da doença, denominado período de autoimunidade adaptativa (FIGURA 2), pode ter duração de meses a anos, entretanto neste momento, já há possibilidade de detecção dos anticorpos circulantes na circulação sistêmica.(JAYASIMHAN; MANSOUR; SLATTERY, 2014)



α 6. Resposta auto-imune adaptativa.

FIGURA 2 - Resposta auto-imune adaptativa do DM1

Mesmo sabendo que o processo depende da ação da imunidade celular, os mecanismos humorais incluem a presença de alguns auto anticorpos específicos para antígenos das ilhotas pancreáticas, sendo detectados na circulação sanguínea de cerca de 80-85% dos indivíduos portadores da doença, entre eles, podemos citar: auto anticorpo anti-ilhota (ICA), anti-insulina (IAA), anti-tirosinafosfatase (anti-IA2) e ácido glutâmico-descarboxilase (GAD-65) (DIABETES, 2010; FLOYEL; KAUR; POCIOT, 2015; IN'T VELD, 2011).

Sendo assim, a detecção desses anticorpos circulantes podem predizer a ocorrência de autoimunidade que provavelmente culminará no desenvolvimento da síndrome.(ZIEGLER et al., 2013)

Podemos dizer, então, que o indivíduo portador de DM 1 possui uma predisposição genética ao desenvolvimento da doença e que vários fatores parcialmente conhecidos são responsáveis por iniciarem uma cascata de reações autoimunes levando a disfunção e destruição das células β -pancreáticas, culminando com o aparecimento da síndrome (KRISHNA; SRIKANTA, 2015)

2.1.5. Os desafios atuais

O maior desafio para a medicina, ainda nos dias de hoje, é detectar o real fator desencadeante da reação inflamatória envolvida no DM 1. (KRISHNA; SRIKANTA, 2015) Pesquisadores atuais têm focado no envolvimento crucial dos linfócitos B na progressão da doença por um mecanismo distinto e aleatório da produção de anticorpos. (HINMAN; SMITH; CAMBIER, 2014)

Antes da contenção destes fatores, é necessário entender qual o alvo inicial do sistema autoimune, ou seja, o antígeno específico da célula-beta responsável por desencadear todo o processo inflamatório. Além de diversos possíveis disruptores ambientais, como: alimentação, medicamentos, vírus, serem possivelmente envolvidos neste processo(JAYASIMHAN; MANSOUR; SLATTERY, 2014), há a possibilidade de predisposição genética (FLOYEL; KAUR; POCIOT, 2015), ou até, alterações moleculares epigenéticas capazes de gerar modificações químicas irreversíveis (FENG; XING; XIE, [s.d.]), levando ao aparecimento da síndrome. Sabemos que a maior dificuldade na busca de tratamentos para melhorar a qualidade de vida de indivíduos portadores de DM 1 é a contenção dos fatores autoimunes presentes nas ilhotas pancreáticas (KRISHNA; SRIKANTA, 2015)

A busca por terapias alternativas para restabelecimento da massa β -pancreática, bem como contenção dos fatores autoimunes destrutivos e regeneração do tecido pancreático como um todo continuam sendo constantes (A.L. MÁRQUEZ-AGUIRRE, A.A. CANALES-AGUIRRE, E. PADILLA-CAMBEROS, 2015; GEORGIA; BHUSHAN, 2004; WEIR; BONNER-WEIR, 2013).

Uma das técnicas empregadas por pesquisadores para regeneração da massa β -pancreática é o transplante de ilhotas pancreáticas pela cápsula renal e mesmo sendo comprovado a eficácia da técnica na reversão da função pancreática e reestabelecimento da massa celular perdida (DHOLAKIA et al., 2016; GEPTS; LECOMPTE, 1981; RYAN et al., 2005). Contudo, a técnica não é suficiente para conter a reação autoimune presente no pâncreas e exige altas doses de imunossupressão, mesmo assim, há chance de aparecimento de auto

anticorpos anti-ilhotas e destruição de mais da metade da quantidade de ilhotas transplantadas, horas após o procedimento (BENNET et al., 1999; RYAN et al., 2005)

Com os avanços da biotecnologia, há diversas técnicas que visam o restabelecimento da massa beta-pancreática (MA; ZHU, 2017) e reprogramação de alterações genéticas, entre elas, diferenciação de células-tronco embrionárias em células produtoras de insulina (A.L. MÁRQUEZ-AGUIRRE, A.A. CANALES-AGUIRRE, E. PADILLA-CAMBEROS, 2015) ou reprogramação de células exócrinas em células produtoras de insulina, com uso de vetores (ZHOU et al., 2008)

Entre as formas estudadas, o uso de células-tronco mesenquimais como terapia alternativa tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. (HASHEMIAN; KOUHNAVARD; NASLI-ESFAHANI, 2015; HOSSAIN et al., 2016; OH et al., 2008)

2.2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO

Levando em consideração as dificuldades de tratamento e manutenção de qualidade de vida de pacientes portadores de doenças crônicas, os estudos com o uso de células-tronco como busca de regeneração têm aumentado cada vez mais. Um tipo celular que vem ganhando espaço pela sua capacidade imunomoduladora e plasticidade são as células-tronco de origem mesenquimal

(GRIFFIN et al., 2016; HASHEMIAN; KOUHNAVARD; NASLI-ESFAHANI, 2015; JUN; YOON; CELLS, 2005).

Células-tronco mesenquimais são células somáticas adultas que possuem elevada plasticidade (MONTEIRO; NETO; CARLO, 2009) e capacidade de diferenciação em tecidos mesodermis como adipócitos, condroblastos, osteoblastos e também células renais, epiteliais, cardíacas, pancreáticas, entre outras (HASHEMIAN; KOUHNAVARD; NASLI-ESFAHANI, 2015; PITTENGER et al., 1999).

São consideradas multipotentes e estão presentes em regiões perivasculares de praticamente todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, tecido adiposo, o tecido muscular, o periósteo e também órgãos parenquimatosos(DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

As MSCs possuem características altamente imunomoduladoras e anti-apoptóticas, visto que são capazes de promoverem reparação tecidual por meio da secreção de inúmeras moléculas bioativas pró e anti-inflamatórias - fator de crescimento vascular endotelial, fator de crescimento de fibroblasto básico, fator de crescimento dos hepatócitos, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 e adrenomedulina - conferindo a elas características autócrinas e parácrinas (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; YARAK; OKAMOTO, 2010).

São responsáveis por restabelecerem o suprimento vascular por neovascularização e manter a homeostasia tissular, contribuindo positivamente em um processo de injúria e isquemia, exemplificando deste modo a vantagem de seu emprego em terapia celular (NI et al., 2015)

A célula mesenquimal originária de tecido adiposo possui características morfológicas e fenotípicas semelhantes às encontradas em células de medula óssea e do cordão umbilical, porém com a vantagem de maior biodisponibilidade e rendimento (BELL et al., 2013; MOSHREFI et al., 2015) além de parecerem não diminuir sua capacidade de replicação com a idade, outra característica vantajosa em relação a outras linhagens (KERN et al., 2006).

2.2.1. Avanços da terapia gênica no diabetes mellitus.

Em relação ao diabetes mellitus, as pesquisas são cada vez mais promissoras. (BHONDE et al., 2014; VANIKAR; TRIVEDI; THAKKAR, 2016) Alguns estudos relatam que quanto mais precoce a intervenção, maior é a chance de reduzir a progressão da destruição β -pancreática, para isso, a realização de transplante de células-tronco em pacientes recém diagnosticados pode conferir melhores qualidades de vida e menor requerimento na dose de insulina.(CARLSSON; KORSGREN; LE BLANC, 2015).

Estudos também reportam que o transplante de células-tronco em indivíduos diabéticos pode ser capaz de regenerar as ilhotas lesionadas por diferenciação em novas células beta competentes, restaurando a função pancreática, além de conferir importante efeito anti-inflamatório evitando novas reações autoimunes. (ABDI et al., 2008; HAMDY; NEMR; AL, 2014).

Sendo que elas também já foram descritas como moduladoras de resposta T celular contra o antígeno ácido glutâmico descarboxilase presente nas ilhotas pancreáticas através de um estudo in vitro de sangue de pacientes com diabéticos(LEE et al., 2006)

As três vias de transplante mais estudadas atualmente incluem: via intravenosa, intra-capsular renal e intrapancreática sendo que cada uma delas apresenta uma vantagem/desvantagem em relação a parâmetros comumente testados para confirmação de regeneração de células produtoras de insulina, porém não há comparação entre essas vias.(BORG et al., 2014; PHAN et al., 2014; YAOCHITE et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS:

Determinar o melhor método de aplicação da terapia celular para a regeneração morfofuncional do diabetes experimental.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Padrão funcional: avaliar a reposta clínica dos animais diabéticos submetidos ao transplante, por meio da avaliação de estabelecimento de peso, níveis glicêmicos e requerimento insulínico

2) Padrão proteico: avaliar qualitativamente a presença da proteína Insulina no tecido pancreático de ratos diabéticos submetidos a diferentes métodos de aplicação das células tronco mesenquimais;

3) Padrão morfométrico tecidual: Avaliar a morfologia das ilhotas pancreáticas e comparar área (um^2) x diâmetro (um), por histologia em H.E em ratos diabéticos submetidos a diferentes métodos de aplicação das células tronco mesenquimais;

Capítulo II

Trabalho científico

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho submetido para a revista *Diabetes* (ISSN: 0012-1797; *Amer Diabetes Assoc*). Site da revista: <http://diabetes.diabetesjournals.org/>. As normas para submissão de manuscritos podem ser encontradas através do link: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/instructions-for-authors>.

Número da submissão: DB18-0230 – em anexo

Adipose-derived mesenchymal stem cells transplantation under renal capsule restores β -cell function in a experimental autoimmune diabetes model

Running title: Stem cell transplantation restores β -cell function

Authors: Bianca M. Gonçalves ¹, Maria T. Sibio ², Miriane Oliveira ², Fernanda C. F. Moretto ², Regiane M.C. Olimpo ², Heloísa G Duarte ³, Elenice Deffune ³, Alexandre T Fabro, Célia R Nogueira ², Luiz H. A Machado ^{1*}.

¹ Department of Veterinary Clinics, College of Veterinary Medicine and Animal Sciences, São Paulo State University, Botucatu, Brazil.

² Departament of Clinics, Medical School of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, Brazil.

³ Hemocenter of Botucatu, Medical School of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, Brazil.

⁴ Department of Pathology and Forensic Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

*** Correspondence should be addressed to:**

Luiz Henrique A. Machado, MSc, Ph.D
Department of Veterinary Clinics,
College of Veterinary Medicine and Animal Sciences
São Paulo State University (UNESP), Campus Botucatu
Email: henrique@fmvz.unesp.br.

Abstract

Diabetes mellitus is one of the diseases that has increased its incidence in the last decade. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ATMSCs) have immunomodulatory and regenerative characteristics, thus are capable of reverse the damages of the disease. Therefore, our study aimed to evaluate the impact of ATMSCs transplantation by the intravenous, intrapancreatic and intra-capsular renal routes in diabetic rats and detect the best route to promote regenerative effects. We used 45 female wistar rats, divided into 5 groups: GCS – healthy control; GCD - diabetic control; GIV - diabetic, intravenous; GIP - diabetic, intrapancreatic route; GIR - diabetic, via renal capsule. For induction, we used a single intraperitoneal application (i.p) of Alloxan (120mg / kg) and after 3 days, the animals were transplanted with the ATMSCs (2×10^6 / animal). After 15 days of transplantation, the animals were euthanized. The transplantation of ATMSCs by the renal capsule were able to reverse hyperglycemia, besides restoring the islet diameter and restoring the function of β -pancreatic mass. We conclude that the renal capsule presented the best results in the morpho functional regeneration of the diabetic pancreas. The stem cells used in this study were able to exert an important paracrine effect, and could be used as an alternative to improve the quality of life on diabetic patients.

Sabe-se há décadas que portadores de diabetes mellitus tipo 1 apresentam perpetuantes aspectos autoimunes nas células beta pancreáticas, levando a deficiência de sua função (SKYLER et al., 2016). Atualmente, reporta-se que independente da classificação etiológica do diabetes, seja tipo 1 ou 2, os fatores que resultarão em perda progressiva de células beta pancreáticas e consequente hiperglicemia, confere a todos os pacientes os mesmos riscos de desenvolverem graves complicações (ASSOCIATION, 2017; SKYLER et al., 2016). Uma das formas de tentar melhorar a qualidade de vida desses pacientes e controlar as principais complicações, é investir em terapias que controlem a disfunção e destruição das células β -pancreáticas (BENTHUYSEN; CARRANO; SANDER, 2016; CARLSSON; KORSGREN; LE BLANC, 2015; MA; ZHU, 2017). Todavia, é necessário elucidar os diferentes mecanismos que podem estar envolvidos na falência da massa β pancreática e com isso, investir individualmente em terapias regeneradoras e imunomoduladoras (SKYLER et al., 2016). Além de diversos possíveis disruptores ambientais, como: alimentação, medicamentos, vírus, serem possivelmente envolvidos neste processo (JAYASIMHAN; MANSOUR; SLATTERY, 2014), há a possibilidade de predisposição genética (FLOYEL; KAUR; POCIOT, 2015), ou até, alterações moleculares epigenéticas capazes de gerarem modificações químicas irreversíveis (FENG; XING; XIE, [s.d.]

A uso da terapia celular pode ser alternativa às técnicas atuais de restabelecimento das ilhotas lesionadas (HASHEMIAN; KOUHNAVARD; NASLI-ESFAHANI, 2015; TAKESHITA et al., 2008; WANG et al., 2014). As células-tronco mesenquimais de tecido adiposo são altamente indicadas pela sua característica imunomoduladora e capacidade de neovascularização (DAVE et al., 2015; KHORSANDI et al., 2015; NGUYEN et al., 2016). Sendo assim, é extremamente importante estabelecer melhores vias de aplicação e, atualmente, há inúmeras vias sendo estudadas, entre elas: intravenosa,

intrapancreática, intra-capsular renal, intra-esplênica, intra-hepática (KHORSANDI et al., 2015; MOSHREFI et al., 2015; PHAN et al., 2014; YAOCHITE et al., 2015), porém, comparações *in vivo* em relação a viabilidade/vantagem do uso dessas vias e o respectivo impacto no restabelecimento morfofuncional do pâncreas diabético ainda necessitam ser melhores elucidadas.

In the present study, we evaluated the impact of three frequently reported aMSC transplantation routes on alloxan- diabetic rats. The rats that received aMSC under renal capsule had improvement of hyperglycemic state and reduction of insulin requirements. Overall, these findings support the helpful paracrine effects for renal capsule transplantation of undifferentiated stem cells to promote b-cell replacement.

Material e Métodos

Obtenção e isolamento das CTM-TA: As células utilizadas neste estudo foram adquiridas a partir de um banco local de células congeladas do Laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina Botucatu (FMB / Botucatu). As células provenientes de tecido adiposo de rato, foram produzidas por Garcia *et al.*, 2015 em um protocolo específico e diferenciado que inclui um processo de dissociação mecânica, além de posterior bioestimulação com LED pulsado. Estes mecanismos possuem o intuito de preservar os fatores bioativos imunomoduladores, muitas vezes reduzidos após o procedimento de dissociação enzimática.

Caracterização e imunofenotipagem das CTM-TA: As células foram caracterizadas por citometria de fluxo e apresentaram marcadores de superfície positivos para CD 90 -P, CD44-FITC e CD71-FITC e negativo para CD11b-APC, CD31-PE e CD45-PE (Figura

S1). Posteriormente, para provar o potencial multi-linhagem, as células foram submetidas ao processo de diferenciação em células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas em um processo de co-cultura previamente descrito.

Descongelamento e expansão das CTM-TA: Para a expansão celular, uma amostra de rato de 6 passagem foi descongelada e uma alíquota de 100 µl foi corada com solução de Trypan Blue 0,4% (diluição 1: 1) e contada em uma câmara de Neubauer. O total de células de $1,21 \times 10^6$ foi lavado para remover a solução de criopreservação restante e subdividido em quatro frascos de 75 cm² para células aderentes (TPP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) contendo 3×10^5 células / balão. As células foram incubadas em meio de cultura DMEM / F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 20% de soro bovino fetal (FBS, Gibco, Sydney, Austrália), 100 µg / ml de penicilina / estreptomicina (Xangai Biociência Shangai, China), anfotericina B (Gilead Sciences, Inc., San Dimas, CA, EUA), 5 ng / ml de factor de crescimento epidérmico (EGF; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 5 ng / ml de factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF; Sigma-Aldrich) a 37 ° C e 5% de CO₂ durante 21 dias. O meio foi substituído semanalmente e os aspectos morfológicos das culturas foram analisados com um microscópio invertido (Axiovert 25; Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) (Figura 1).

Tripsnização celular: Após cerca de 21 dias de cultivo, as células atingiram a confluência necessária e foram submetidas ao processo de tratamento enzimático com uso da enzima Tripsina EDTA 0,25% (Gibco®). O procedimento tem início com a lavagem dos frascos com HEPES em fluxo laminar e em seguida, o HEPES foi aspirado e a tripsina adicionada. Os frascos contendo tripsina permaneceram na estufa por alguns minutos até

ocorrer o desprendimento das células aderentes, sendo submetidas a observação em microscópio para confirmar tal evento. Após confirmação, as células foram submetidas ao teste de contagem e viabilidade celular, que foi de 99% de viabilidade e um total de 54×10^6 células. Para finalização do processo, foi adicionado meio HEPES com cerca de 10% de SFB aos frascos visando a inativação da enzima e estes foram submetidos à centrifugação à 1200 rpm por cerca de 10 minutos. Após isso, o *pellet* celular foi re-suspenso em meio PBS e dividido em 27 alíquotas individuais contendo 2×10^6 célula/0,5ml de PBS estéril e pronto para imediata aplicação.

Animais: Foram utilizados 45 ratos da espécie *Rattus Novergicus* – fêmeas, linhagem Wistar, aproximadamente 160-200g, provenientes do Biotério da Anilab (Animais de Laboratório) de Paulínia, São Paulo. Os animais foram alojados no Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNIPLEX), em gaiolas com dimensões de 40x33x16 cm, totalizando 1.320 cm², com ventilação adequada ($21^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$), luminosidade controlada e alocados em camas de maravalha, trocadas duas a três vezes por semana com fornecimento de água e alimentação “*ad libitum*”.

Delineamento experimental: Ao serem admitidos no biotério, os animais ficaram por cerca de 10-15 dias em período de adaptação, sem qualquer tipo de experimentação durante o período. Após o período inicial, os mesmos foram pesados e foi realizada a primeira aferição Glicêmica com uso do glicosímetro comercial OneTouch Ultra (Johnson & Johnson®). Para início do experimento, os animais foram divididos em 5 grupos: GCS – Grupo controle sadio (n=9): animais saudáveis, não induzidos ao diabetes.; GCD – Grupo controle diabético (n=9): animais induzidos, não submetidos ao transplante de células tronco; GIV (n=9): animais induzidos, submetidos ao transplante

de células-tronco pela via intravenosa; GIP (n=9): animais induzidos, submetidos ao transplante de células-tronco pela via intrapancreática; GIR (n=9): animais induzidos, submetidos ao transplante de células-tronco pela cápsula renal. Todos esses procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética ao Uso Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (concessão 1182/2016), que estão de acordo com o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do NIH (Publicação NIH nº 86-23, revisado 1996)

Protocolo de indução ao diabetes experimental: Para a escolha da droga e do protocolo de indução ao diabetes, um estudo piloto foi realizado, além de uma intensa pesquisa de literatura, visto que há duas drogas mais comumente usadas (Aloxana e Estreptozocina), além de diversas doses (60mg/kg; 120mg/kg; 150mg/kg; 200mg/kg), locais de aplicação (Intravenosa, Intramuscular, Subcutânea, Intraperitoneal), meios de diluição (sol. Salina refrigerada, TRIS-edta) e período de constatação do diabetes (3 dias, 5 dias ou 7 dias); os estudos científicos usados para a análise e padronização deste protocolo estão dispostos na ***Tabela S5***. Sendo assim, os animais induzidos (n=36) passaram por um período de 24 horas de jejum alimentar, sem restrição hídrica. Após as 24 horas de jejum, os animais foram induzidos com uma única aplicação intraperitoneal de Aloxana (120mg/kg; Alloxan®, Sigma-Aldrich). A medicação foi diluída imediatamente antes da aplicação em uma concentração de 60mg/ml com solução salina estéril 0,9% e mantida refrigerada até o momento da indução. Os respectivos pesos e doses de indução estão dispostos na ***Tabela***

Manejo pós-indução e constatação do diabetes: Após meia hora da indução, a comida foi reintroduzida e os animais foram suplementados por 24 horas com solução glicosada

a 10% como única fonte hídrica, visto que a hipoglicemia nesta etapa do experimento pode aumentar a taxa de mortalidade dos ratos. Após as 24 horas iniciais, a solução glicosada foi substituída por água *ad libitum* e os animais foram acompanhados diariamente por meio de aferição glicêmica, temperatura, peso e condição clínica geral, até o completarem as 72 horas iniciais, quando foi realizada a constatação ao diabetes. Após as 72 horas, os animais com glicemias superiores a 200mg/dl, sem estarem em jejum, foram considerados diabéticos, sendo então submetidos a insulinoterapia BID e tratados de acordo com suas condições clínicas (Tabela S1).

Procedimento cirúrgico e cuidados pós-operatórios: O primeiro grupo consiste em animais que receberam o transplante pela via intravenosa (n=9). A veia escolhida para administração foi a veia da cauda. O animal foi colocado em um contensor e em seguida, feita antisepsia da cauda com gaze e álcool 70%, feito isso, a cauda foi aquecida com auxílio de uma lâmpada (em torno de 35°) para promover vasodilatação e melhor localização da veia. Após a injeção do medicamento, os animais foram colocados de volta em suas gaiolas e foram observados até o final do experimento. O segundo grupo foi submetido ao transplante pela via intrapancreática de acordo com a técnica descrita por G.Bell *et al*, 2013, dez sítios pancreáticos foram escolhidos e cada animal recebeu uma amostra de 2×10^6 célula/0.5ml de PBS estéril. Os animais foram induzidos com Isoflurano 3 a 4% em 100% de O₂ a uma taxa de fluxo de 0,8litros/min e mantidos com Isoflurano 1 a 2% em 100% de O₂ a uma taxa de fluxo de 0,8litros/min durante todo o procedimento cirúrgico. O fechamento foi realizado em dois planos, com sutura contínua simples na musculatura e pontos simples isolados na pele, ambas com nylon 4-0. O terceiro grupo foi submetido ao transplante pela cápsula renal. Os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico descrito anteriormente e foram posicionados

em decúbito lateral direito. A incisão foi feita pelo flanco, imediatamente abaixo da última costela com bisturi (lâmina 15) e após localização do rim, este foi exposto e as células-tronco inseridas na cápsula renal, usando como base a técnica utilizada para o transplante de ilhotas pancreáticas, previamente publicado em literatura (MA et al., 2016). O fechamento foi realizado como descrito anteriormente e os animais continuaram em manejo intensivo e monitoramento diário até o momento da eutanásia, 15 dias após o procedimento cirúrgico.

Cuidados pós cirurgicos: Os grupos submetidos ao procedimento cirúrgico foram divididos em gaiolas individuais com papel toalha estéril, aquecidas (T°C média 27 °C a 30 °C) e com pouca exposição a luz até a total recuperação anestésica. A fim de melhorar a recuperação e evitar a desidratação, receberam fluidoterapia aquecida com sol. fisiológica 0.9% pela via subcutânea. Os animais foram avaliados diariamente, de forma intensiva, em relação a sinais potenciais associados a dor e comportamento por 7 dias após o procedimento cirúrgico, sendo medicados regularmente de acordo com o sintoma apresentado (Tabela S2). As medicações usadas durante o experimento foram: Meloxicam 0,2mg/kg pela via subcutânea, Dipirona 150mg/kg pela via subcutânea, Meperidina 20mg/kg pela via subcutânea e Enrofloxacino 10mg/kg pela via subcutânea.

Eutanásia: Os animais foram eutanasiados decorridos 15 dias da cirurgia com células-tronco. O método escolhido para eutanásia segue a regulamentação dos procedimentos de eutanásia animal no Brasil (Resolução do CFMV no 1.000, de 11 de maio de 2012). O procedimento foi realizado com associação de cloridrato de Quetamina 50mg/kg + Xilazina 10mg/kg pela via intramuscular, seguida de Isoflurano inalatório, até o registro de parada cardiorrespiratória.

Ensaio histomorfométrico e imunohistoquímico: Para a histologia do pâncreas, a porção esplênica foi imediatamente fixada em formalina neutra tamponada a 10%. As amostras foram processadas e emblocadas em parafina; secções de 5 µm foram coradas por hematoxilina-eosina (H-E), sendo que a morfologia e extensão da infiltração de células inflamatórias (ou pontuação de insulite) nas ilhotas pancreáticas foram avaliadas com microscópio semi-digital (ZEISS / Axioscop 40). Para a análise morfométrica qualitativa, foram selecionadas 5 ilhotas para cada animal e seu diâmetro foi analisado com o software digital Image J®. Além disso, a coloração imuno-histoquímica para Insulina foi realizada utilizando um anticorpo de Insulina policlonal anti-rat (1: 2000; orb10922; Byorbit, Cambridge, Reino Unido). A reação foi realizada utilizando o kit Envision FLEX High-PH System-HRP / DAB (Dako, Agilent, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a análise da área afetada, as porções das ilhotas marcadas pela insulina foram medidas e divididas pela área total da ilhota (% da área afetada), com o auxílio do programa Image J (Figura S3).

Análise estatística: A análise comparativa entre dois ou mais grupos em relação ao nível de significância estatística foi avaliada pelo método da Análise de Variância ONE-way ANOVA, com pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Quando possível, o Teste t de Student's, também foi utilizado para comprovação entre dois grupos. Os dados dispostos em gráficos e tabelas foram expressos em média ± desvio padrão e os resultados estatísticos serão considerados significativos quando o valor mínimo for $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.1.

Resultados

Aloxana é eficaz na indução ao diabetes grave : O protocolo escolhido para indução ao diabetes experimental foi eficaz em induzir o diabetes grave (glicemias > 600 mg/dl) em 100% dos animais do grupo controle diabético (GCD/ n=9) com somente uma única aplicação i.p de 120 mg/kg, após 24 horas de jejum alimentar. Nota-se que houve um aumento considerado extremamente significativo nos valores de glicemia após 72 horas da indução do GCD (600 mg/dl) quando comparado ao GCS ($p < 0,0001$). (Figura 2 A-B e Tabela S). De acordo com as avaliações histomorfométricas, podemos observar que a indução ao diabetes causou uma significativa atrofia e redução do diâmetro das ilhotas do GCD, quando comparado ao GCS ($p < 0,0001$). (Figura 3B)

Transplante pela cápsula renal reverte hiperglicemia em ratos diabéticos: O transplante de células-tronco pela cápsula renal foi capaz de promover redução significativa ($p < 0,01$) nos valores de glicemia (mg/dl) após 15 dias do procedimento, quando comparado com o estado dos animais antes do transplante (Figura 2 C-D) além de promover uma taxa de sobrevivência de 100% (Figura S2). Não houve redução considerada significativa nas médias glicêmicas em 7 ou 15 dias após o transplante, quando comparado ao estado anterior ao transplante ($p = 0,2$). A aplicação não foi suficiente para melhorar a condição clínica dos animais ou reduzir o requerimento insulínico em quaisquer períodos do estudo. (Figura 2 E-F). Houve redução considerada significativa nas médias glicêmicas em 7 dias após o transplante ($p < 0,05$). Entretanto, essa redução não foi sustentável aos 15 dias após o transplante. A aplicação não foi suficiente para melhorar a condição clínica dos animais visto que os mesmos apresentaram dor constante durante todo o experimento. (Figura 2 G-H)

O transplante pela via intra-capsular renal restabeleceu a morfologia das ilhotas:

Somente os animais do GCR apresentaram aumento considerado significativo ($p < 0,001$) do diâmetro (μm) de suas ilhotas, em relação ao GCD (Figura 3B). Demais grupos transplantados não obtiveram aumento considerado significativo em relação ao GCD e demais grupos ($p > 0,05$) (Figura 3C)

Restabelecimento da função da massa β -pancreática das ilhotas: de acordo com o estudo imunohistoquímico, no grupo cápsula renal, conseguimos detectar aumento significativo na quantidade de células coradas para *Insulina*, quando comparado ao controle diabético e também aos outros animais do experimento ($p < 0,05$), que não obtiveram benefícios significativos com a terapia. (Figura 4)

Discussão

Apresentamos neste estudo, uma comparação *in vivo* de três diferentes vias de aplicação de CTMs em animais induzidos ao diabetes com o objetivo de avaliar a eficácia de cada uma delas, em relação a regeneração morfofuncional do tecido pancreático lesionado. Um aspecto considerado crítico por outros autores em relação ao transplante de células-tronco e a subsequente eficiência terapêutica está na seleção da melhor via de aplicação visto que a melhor técnica é aquela que oferece o maior nível de regeneração com menores efeitos colaterais (KURTZ, 2008)

Alguns estudos têm relatado que a melhor forma de otimizar o uso das células-tronco mesenquimais seria realizar a aplicação diretamente no órgão alvo, pois isso poderia maximizar o efeito reparador e imunomodulador e a quantidade de células viáveis se diferenciando no sítio de lesão (LI et al., 2015). Nosso estudo utilizou a via

intrapancreática para aplicação das células-tronco em animais diabéticos, em um modelo que visava mimetizar o diabetes tipo 1 com diagnóstico recente, ou seja, teoricamente representando um processo inflamatório ativo. Notamos uma rápida queda nos índices glicêmicos após 7 dias do transplante pela via intrapancreática, tendendo até à reversão ao estado diabético. Essa redução foi considerada significativa em relação aos níveis glicêmicos no período anterior ao protocolo de transplante, indo de acordo com outros trabalhos que demonstraram o mesmo quadro em relação a rápida redução nos índices glicêmicos após 7 dias de transplante (YAOCHITE et al., 2015). Entretanto, os mesmos animais que apresentaram reversão do estado hiperglicêmico, foram os que vieram a óbito apresentando sintomas clínicos instáveis, como: dor intensa, inapetência, tremores e diarreia; compatíveis com pancreatite e que mais tardiamente, foi comprovado pela análise histológica (suplementar). A ocorrência de pancreatite após transplante de células-tronco em ratos diabéticos já foi previamente citada na literatura (CHANG et al., 2009). Sendo assim, em nosso modelo, o uso da via intrapancreática não se demonstrou eficiente na reparação do órgão lesado, quando comparamos com o efeito benéfico e duradouro relatado por outros autores e também ao comparar com outra via que utilizamos, a via intra-capsular renal. (LI et al., 2015; YAOCHITE et al., 2015)

Outro fator que deve ser levado em questão, além da via a ser escolhida e o tempo de diagnóstico, é a padronização de uma quantidade de células administradas de acordo com a via a ser escolhida. A maioria dos trabalhos utiliza volumes entre 5×10^5 (WANG et al., 2014), 1×10^6 (YAOCHITE et al., 2015) e 2×10^6 células (AMMAR et al., 2015) e o nosso estudo utilizou o volume de 2×10^6 células/0,5ml por aplicação, em todas as vias estudadas. Um outro estudo recente relatou que a administração de pequenas quantidade de células ($1,5 \times 10^3$ células máximas) pelo parênquima pancreático pode ser extremamente útil para proliferação e até transdiferenciação em diversos outros tipos

celulares, visto que o excesso de células infundidas pode predispor a ativação de injúria local (SATO et al., 2017).

Em relação a via intravenosa, sabe-se que as células-tronco transplantadas são primeiramente captadas no pulmão, sendo que somente cerca de 40-50% do volume aplicado é redistribuído para a circulação sistêmica (FISCHER et al., 2009; WU et al., 2017). Neste modelo proposto, o uso da via intravenosa não foi eficiente em reduzir os níveis glicêmicos e de melhorar a condição clínica dos animais, que apresentaram graves sintomas respiratórios, como: taquipneia, cansaço fácil e morte súbita.

Inúmeros relatos demonstraram que a via intravenosa pode gerar redução da circulação sistêmica (FISCHER et al., 2009), além de graves sintomas de taquipneia, apneia e morte por embolia pulmonar em 25-40% dos animais transplantados (FURLANI et al., 2009). Neste presente estudo, o transplante pela via intravenosa gerou uma taxa de mortalidade de 33%, a mesma taxa gerada pela via intrapancreática.

Em relação a via intra-capsular renal, a literatura demonstra que a cápsula renal ainda é um dos principais locais para o transplante de ilhotas pancreáticas e de células-tronco, tanto pelo seu fácil acesso quanto à rápida velocidade de recuperação e possibilidade de reimplantação (GABR et al., 2015; MA et al., 2016; PARK et al., 2011). Pesquisadores também detectaram aumento na vascularização renal após transplante de células tronco pela cápsula renal de ratos diabéticos (BORG et al., 2014), assim como já demonstraram que o transplante de células mesenquimais de tecido adiposo foi capaz de reduzir a injúria renal pela diminuição do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias em ratos (BAI, 2012).

Destarte, em nosso estudo, podemos comprovar a eficácia previamente relatada, posto que, a técnica foi a que apresentou melhor benefício quando comparado às outras duas técnicas, sendo a única técnica que promoveu maior taxa de sobrevivência (100%),

além de reversão do estado hiperglicêmico em alguns animais, restabelecimento de peso e redução do requerimento insulínico, corroborando com o achado em estudos anteriores recentes (WU et al., 2017). Muitos pesquisadores atribuem o efeito positivo do transplante fora do órgão alvo como sendo um efeito imunomodulador, entretanto, um outro recente estudo comprovou a transdiferenciação de células não diferenciadas em hepatócitos após transplante pela cápsula renal. (CHEN et al., 2017)

De acordo com outros pesquisadores, a redução de citocina pró-inflamatórias pode representar o possível mecanismo pelo qual o transplante de células mesenquimais previne a morte das células beta pancreáticas e promove imunomodulação.(NAVARRO et al., 2016). Nosso estudo priorizou o uso de células-tronco mesenquimais não diferenciadas em células produtoras de insulina antes do transplante, com o intuito de avaliar o real efeito imunomodulador deste tipo celular, corroborando com estudos que afirmam a possibilidade de uso das células-tronco mesenquimais não diferenciadas em indivíduos diabéticos devido ao seu excelente potencial imunomodulador.(FIORINA et al., 2011)

As CTM possuem importante efeito imunomodulador nos processos inflamatórios por secretarem inúmeros fatores bioativos capazes de regular a inflamação presente no tecido alvo e promover reparação tecidual (KAPLAN; YOUD; LODIE, 2011; NAVARRO et al., 2016). Por conseguinte, é importante assegurar que as células escolhidas para a terapia gênica sejam realmente capazes de secretar tais substâncias, como as citocinas: IL-4, IL-10, TNF e IFN. A técnica utilizada para obtenção das células-tronco pode ser crucial na manutenção destes fatores anti-inflamatórios e devem ser levados em consideração de acordo com o tipo de doença a ser utilizado e o tempo de diagnóstico, uma vez que a escolha da melhor via de aplicação deve ter como principal função exercer um efeito autócrino e regenerador direto ou parácrino e imunomodulador/sinalizador. As células-tronco utilizadas nesta pesquisa foram obtidas

por técnica de digestão mecânica e bioestimulação por LED, ou seja, eram células altamente viáveis e positivas para presença de citocinas imunomoduladoras e em maior concentração quando comparadas às células obtidas por digestão mecânica (GARCIA, 2015). De acordo com Garcia *et al*; 2015, o uso de luz pulsátil na dose de 1 e 3J/cm² em culturas de CTM é extremamente importante para estimular a proliferação de interleucinas pró-inflamatórias como IL-4 e IL-10, importantes no processo de reparação tecidual e crucial para o diabetes (GARCIA, 2015). Efeito este que provavelmente justifica o excelente efeito parácrino visto neste estudo após transplante pela cápsula renal.

Conclusão: O uso de ATMSc foi eficaz em promover efeito imunomodulador quando utilizado pela cápsula renal, estando provavelmente associado ao estado da doença e ao método de obtenção das células que priorizou a manutenção de substâncias bioativas cruciais para o processo anti-inflamatório. Tanto a cápsula renal, quanto o uso de células bioestimuladas por LED parecem eficazes para uso em terapia gênica de pacientes diabéticos, visando contenção de fatores destruidores da função pancreática e promovendo melhores condições de vida.

Article information

Funding: This work was maintained by Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ – Grant 134517/2016-4) and São Paulo Research Foundation (FAPESP – Grant 15/23876-4)

Conflicts of interest: The authors assert that they have no conflicts of interest

References

- A.L. MÁRQUEZ-AGUIRRE, A.A. CANALES-AGUIRRE, E. PADILLA-CAMBEROS, H. E.-S. AND N. E. D.-M. Development of the endocrine pancreas and novel strategies for β -cell mass restoration and diabetes therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 765–776, 2015.
- ABDI, R. et al. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: A potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 7, p. 1759–1767, 2008.
- AMMAR, H. I. et al. Comparison of adipose tissue- and bone marrow- derived mesenchymal stem cells for alleviating doxorubicin-induced cardiac dysfunction in diabetic rats. **Stem Cell Res Ther**, v. 6, n. 1, p. 148, 2015.
- ASSOCIATION, A. D. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. Suppl.1, 2014.
- ASSOCIATION, A. D. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 40, n. Suppl. 1, p. 11–24, 2017.
- BAI, S. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats by inhibiting oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and the p38 MAPK signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, p. 85–92, 2012.
- BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 175–180, 1999.
- BELL, G. I. et al. **Transplantation models to characterize the mechanisms of stem cell-induced islet regeneration**. [s.l: s.n.]. v. 1
- BENNET, W. et al. Incompatibility between human blood and isolated islets of langerhans: A finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? **Diabetes**, v. 48, n. 10, p. 1907–1914, 1999.

BENTHUYSEN, J. R.; CARRANO, A. C.; SANDER, M. Advances in cell replacement and regeneration strategies for treating diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 10, p. 3651–3660, 2016.

BHONDE, R. R. et al. Making surrogate B-cells from mesenchymal stromal cells: Perspectives and future endeavors. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 46, n. 1, p. 90–102, 2014.

BLOOM, C. A.; RAND, J. S. Diabetes and the Kidney in Human and Veterinary Medicine. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 43, n. 2, p. 351–365, 2013.

BORG, D. J. et al. Mesenchymal stromal cells improve transplanted islet survival and islet function in a syngeneic mouse model. **Diabetologia**, v. 57, n. 3, p. 522–531, 2014.

BOSE, B.; SHENOY P, S. In Vitro Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Functional B Islets Under 2D and 3D Culture Conditions and In Vivo Preclinical Validation of 3D Islets. **Methods in Molecular Biology**, n. 1341, p. 257–284, 2016.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1445–1451, jun. 2017.

CARLSSON, P.-O.; KORSGREN, O.; LE BLANC, K. Mesenchymal stromal cells to halt the progression of type 1 diabetes? **Current diabetes reports**, v. 15, n. 7, p. 46, 2015.

CHANG, C. et al. Mesenchymal Stem Cells Adopt β -Cell Fate Upon Diabetic Pancreatic Microenvironment. **Pancreas**, v. 38, n. 3, p. 275–281, abr. 2009.

CHEN, Z. et al. Transdifferentiation of human male germline stem cells to hepatocytes <i>in vivo</i> via the transplantation under renal capsules. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 14576–14592, 27 fev. 2017.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v.

119, n. Pt 11, p. 2204–13, 2006.

DAVE, S. D. et al. Novel therapy for insulin-dependent diabetes mellitus : infusion of in vitro-generated insulin-secreting cells. p. 41–45, 2015.

DE CASTRO, L. C. G. Tendência temporal da idade de início do Diabetes mellitus tipo 1 no período de 1981 a 2010 no distrito federal. **tese (doutorado em ciencias da saúde), Universidade de Brasília, Brasília - DF.**, p. 96, 2015.

DHOLAKIA, S. et al. Advances in pancreas transplantation. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 109, n. 4, p. 141–146, 2016.

DIABETES, D. O. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, n. SUPPL. 1, 2010.

DIAZ-VALENCIA, P. A.; BOUGNÈRES, P.; VALLERON, A.-J. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. **BMC public health**, v. 15, p. 255, 2015.

FENG, J.; XING, W.; XIE, L. Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. [s.d.].

FIORINA, P. et al. Immunological Applications of Stem Cells in Type 1 Diabetes. v. 32, n. December, p. 725–754, 2011.

FISCHER, U. M. et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem cells and development**, v. 18, n. 5, p. 683–692, 2009.

FLOYEL, T.; KAUR, S.; POCIOT, F. Genes Affecting β -Cell Function in Type 1 Diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 15, n. 11, 2015.

FURLANI, D. et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? **Microvascular Research**, v. 77, n. 3, p. 370–376, maio 2009.

GABR, M. M. et al. Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Insulin-Producing Cells : Evidence for Further Maturation In Vivo. v. 2015,

2015.

GARCIA, H. V. **Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato sob ação da luz contínua e pulsátil de 630 nm utilizando LED.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.

GEORGIA, S.; BHUSHAN, A. B Cell Replication Is the Primary Mechanism for Maintaining Postnatal BCell Mass. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 7, p. 963–968, 2004.

GEPTS, W.; LECOMPTE, P. M. The pancreatic islets in diabetes. **The American Journal of Medicine**, v. 70, n. 1, p. 105–115, 1981.

GRIFFIN, T. P. et al. The Promise of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Diabetic Kidney Disease. **Current Diabetes Reports**, v. 16, n. 5, p. 42, 2016.

HAMDY, W.; NEMR, E. E.; AL, A. Therapeutic effects of stem cell on hyperglycemia , hyperlipidemia , and oxidative stress in alloxan-treated rats. p. 193–200, 2014.

HASHEMIAN, S. J.; KOUHNAVARD, M.; NASLI-ESFAHANI, E. Mesenchymal Stem Cells : Rising Concerns over Their Application in Treatment of Type One Diabetes Mellitus. v. 2015, 2015.

HINMAN, R. M.; SMITH, M. J.; CAMBIER, J. C. B cells and type 1 diabetes... in mice and men. **Immunology Letters**, v. 160, n. 2, p. 128–132, 2014.

HOSSAIN, M. K. et al. Recent Advances in Disease Modeling and Drug Discovery for Diabetes Mellitus Using Induced Pluripotent Stem Cells. n. Iddm, p. 1–17, 2016.

IN'T VELD, P. Insulitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion. **Islets**, v. 3, n. 4, p. 131–138, 2011.

JAYASIMHAN, A.; MANSOUR, K. P.; SLATTERY, R. M. Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 126, n. 1, p. 1–18, 2014.

JHA, J. C. et al. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 0, n. 0, p. ars.2016.6664, 2016.

JUN, H.; YOON, J.; CELLS, I. Approaches for the Cure of Type 1 Diabetes by Cellular and Gene Therapy. p. 249–262, 2005.

KAPLAN, J. M.; YOUNG, M. E.; LODIE, T. A. Immunomodulatory Activity of Mesenchymal Stem Cells. p. 297–316, 2011.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 5, p. 1294–301, 2006.

KHORSANDI, L. et al. Three-dimensional differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. **Cell and Tissue Research**, v. 361, n. 3, p. 745–753, 2015.

KLINKER, M. W. et al. Mesenchymal stem cells in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases in experimental animal models. v. 7, n. 3, p. 556–567, 2015.

KRISHNA, C. S. M.; SRIKANTA, S. Type 1 diabetes pathogenesis - Prevention???

Indian journal of endocrinology and metabolism, v. 19, n. Suppl 1, p. S58-63, 2015.

KURTZ, A. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. **International journal of stem cells**, v. 1, n. 1, p. 1–7, nov. 2008.

LEE, R. H. et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 46, p. 17438–17443, 2006.

LI, L. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves type 1 diabetes mellitus. 2015.

MA, S.-N. et al. Subcapsular Implantation of Pancreatic Islets in Syngeneic, Allogeneic, and Xenogeneic Mice. **Transplantation Proceedings**, v. 48, n. 8, p. 2821–2825, out.

2016.

MA, X.; ZHU, S. Chemical strategies for pancreatic β cell differentiation, reprogramming, and regeneration. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. 4, p. 298–301, 2017.

MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; CARLO, R. J. DEL. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, p. 1–8, 2009.

MOSHREFI, M. et al. Transplantation of differentiated umbilical cord mesenchymal cells under kidney capsule for control of type I diabetes in rat. **Tissue and Cell**, v. 47, n. 4, p. 395–405, 2015.

NAVARRO, J. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from patients with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus exhibit preserved in vitro and in vivo immunomodulatory properties. **Stem Cell Research & Therapy**, p. 1–16, 2016.

NGUYEN, A. et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 69, n. 2, p. 170–179, 2016.

NI, W. et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation Alleviates Renal Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 63, n. 11, p. 842–53, 2015.

OH, J. Y. et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. **Stem cells**, v. 26, p. 1047–1055, 2008.

ORGANIZATION, W. H. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016.

PAISEY, R. B. et al. Diabetes-related major lower limb amputation incidence is strongly related to diabetic foot service provision and improves with enhancement of services:

peer review of the South-West of England. **Diabetic Medicine**, 11 out. 2017.

PARK, H. et al. Renal capsule as a stem cell niche Renal capsule as a stem cell niche. n. March 2010, p. 1254–1263, 2011.

PHAN, N. K. et al. Preliminary evaluation of intravenous infusion and intra- pancreatic injection of human umbilical cord blood-derived mes-enchymal stem cells for the treatment of diabetic mice. v. 1, n. 3, p. 98–105, 2014.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5411, p. 143–7, 1999.

RYAN, E. A. et al. Five-Year Follow-Up After Clinical Islet Transplantation. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2060–2069, 2005.

SATO, M. et al. Intrapancreatic parenchymal injection of cells as a useful tool for allowing a small number of proliferative cells to grow in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1678, 2 ago. 2017.

SAYURI, M. et al. Caracterização dos portadores de diabetes submetidos à amputação de membros inferiores em Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences Maringá**, v. 32, n. 2, p. 205–213, 2010.

SBD. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes**. [s.l: s.n.].

SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D.; STAUB, H. Diabetes mellitus tipo 1 : multifatores que conferem suscetibilidade à patogenia auto-imune. **Scientia medica**, v. 17, n. 4, p. 212–217, 2007.

SKYLER, J. S. et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. **Diabetes**, p. 1–15, 2016.

TAKESHITA, H. et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. **Cell biochemistry and function**, v. 26, n. 7, p. 813–816, 2008.

VANIKAR, A. V.; TRIVEDI, H. L.; THAKKAR, U. G. Stem cell therapy emerging as

the key player in treating type 1 diabetes mellitus. **Cytotherapy**, v. 18, n. 9, p. 1077–1086, 2016.

WANG, H. et al. Immunological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells and the therapeutic effects of their transplantation on hyperglycemia in diabetic rats. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 2, p. 263–270, 2014.

WEIR, G. C.; BONNER-WEIR, S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1281, n. 1, p. 92–105, 2013.

WHO. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia. **Who2**, p. 50, 2006.

WU, D. et al. Transplantation routes affect the efficacy of human umbilical cord mesenchymal stem cells in a rat GDM model. **Clinica Chimica Acta**, 16 out. 2017.

YAOCHITE, J. et al. Therapeutic efficacy and biodistribution of allogeneic mesenchymal stem cells delivered by intrasplenic and intrapancreatic routes in streptozotocin-induced diabetic mice. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 31, 2015.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: Desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647–656, 2010.

ZHOU, Q. et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 627–632, 2008.

ZIEGLER, A. G. et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. **Jama**, v. 309, n. 23, p. 2473–9, 2013.

Legendas

Figure 1. Período de descongelamento das CTMs - Fotografia das culturas celulares em processo de cultivo e expansão. **A)** Células em 10º dia de cultura. **B)** Células no 15º dia de cultura. **C)** Células no 21º dia de cultura.

Figure 2: A-B) Representação dos valores de glicemia (mg/dl) do grupo controle diabético (GCD) e grupo controle sadio (GCS) nos respectivos tempos de indução. Dados expressos em médias $\pm$ desvio padrão (Teste t Student). A linha de tendência logarítmica demonstra um bom ajuste, com $R\text{-quadrado} = 0,98$ *** *Diferença considerada extremamente significativa, onde $p < 0,0001$.*

C-D) Gráfico em linhas apresentando valores em média $\pm$ desvio padrão (C) e Gráfico de dispersão (scatter plot) apresentando valores individuais (D) da evolução dos níveis de Glicemias (mg/dl) do GCR após o transplante de células-tronco. Diferença estatística considerada significativa em relação ao controle (15 dias x antes), sendo $p < 0,01$. ANOVA, complementada pelo teste de Tukey.

E-F) Gráfico em linhas apresentando valores em média $\pm$ desvio padrão (E) e Gráfico de dispersão (scatter plot) apresentando valores individuais (F) da evolução dos níveis de Glicemias (mg/dl) do GIV após o transplante de células-tronco. Dados não significantes estatisticamente não representados na tabela. ANOVA, complementada pelo teste de Tukey.

G-H) Gráfico em linhas apresentando valores em média $\pm$ desvio padrão (G) e Gráfico de dispersão (scatter plot) apresentando valores individuais (H) dos níveis de Glicemias (mg/dl) do GIP após o transplante de células-tronco. Dados não significantes

estatisticamente não representados na tabela. ANOVA, complementada pelo teste de Tukey.

Figure 3: A) Imagens em Microscopia Digital das lâminas histológicas em H.E correspondentes às ilhotas pancreáticas. CTL: Animal do grupo controle sadio; DIABETIC: Animal do grupo controle diabético; IV: Animal diabético do grupo transplante, via intravenosa; PANCREATIC: Animal diabético do grupo transplante, via intrapancreática; RENAL: Animal diabético do grupo transplante, via cápsula renal.

B) Gráfico de dispersão (scatter plot) dos valores de diâmetro (μm) das ilhotas pancreáticas dos animais sadios e diabéticos. Dados considerados extremamente significantes, onde $p < 0,0001$. Teste t Student com Welch's correction.

C) Gráfico em barras apresentando comparações dos valores do diâmetro (μm) das ilhotas pancreáticas de todos os grupos do estudo. Dados expressos em média e desvio padrão.

*** Diferença considerada extremamente significativa, onde $p < 0,0001$. Análise ANOVA complementado com Tukey.

** Diferença considerada muito significativa, onde $p < 0,001$. Análise ANOVA complementado com Tukey e Teste t Student com Welch's Correction.

Figure 4: Ensaio Imunohistoquímico das ilhotas pancreáticas – representação da marcação das ilhotas pela *Insulina* e Gráfico em barras apresentando comparação da porcentagem da área marcada pela insulina. Somente o GCR apresentou % significativa da área corada pela insulina ($P < 0,05$) em relação a todos os outros grupos do estudo. Análise ANOVA complementado com Bonferroni. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

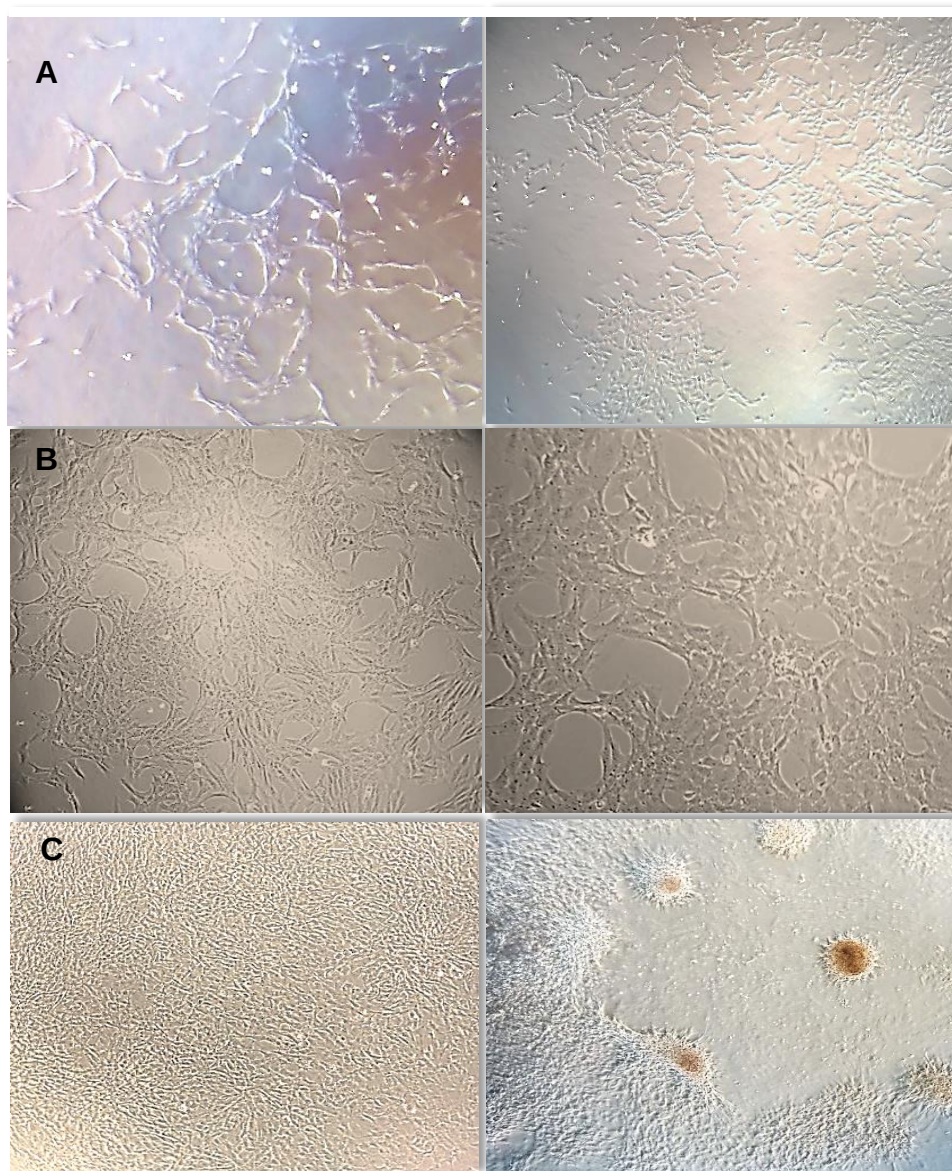
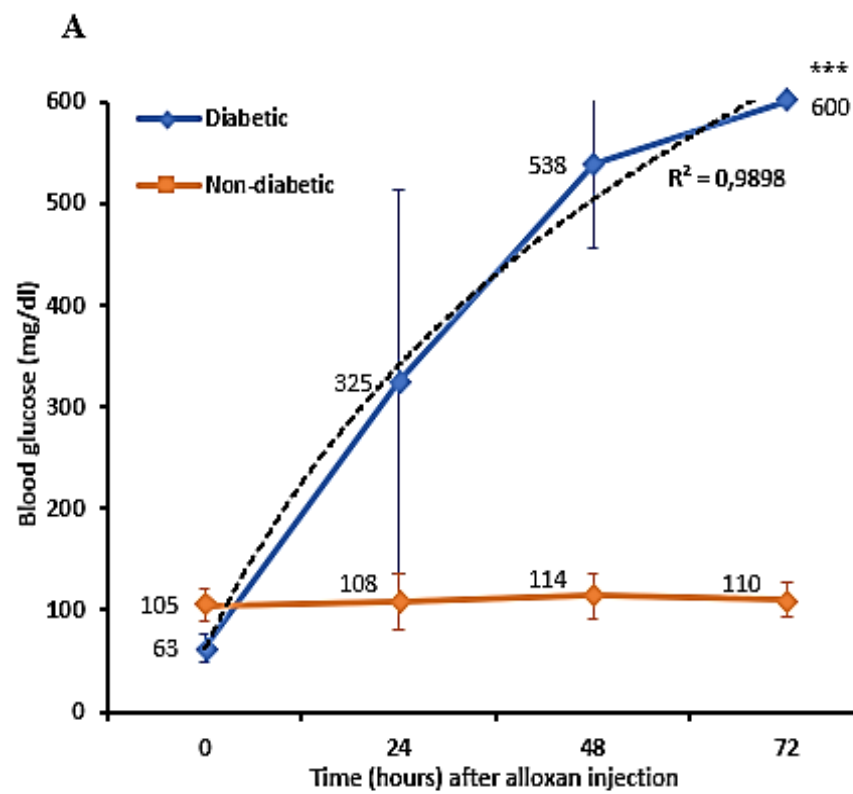


Figure 1

A



B

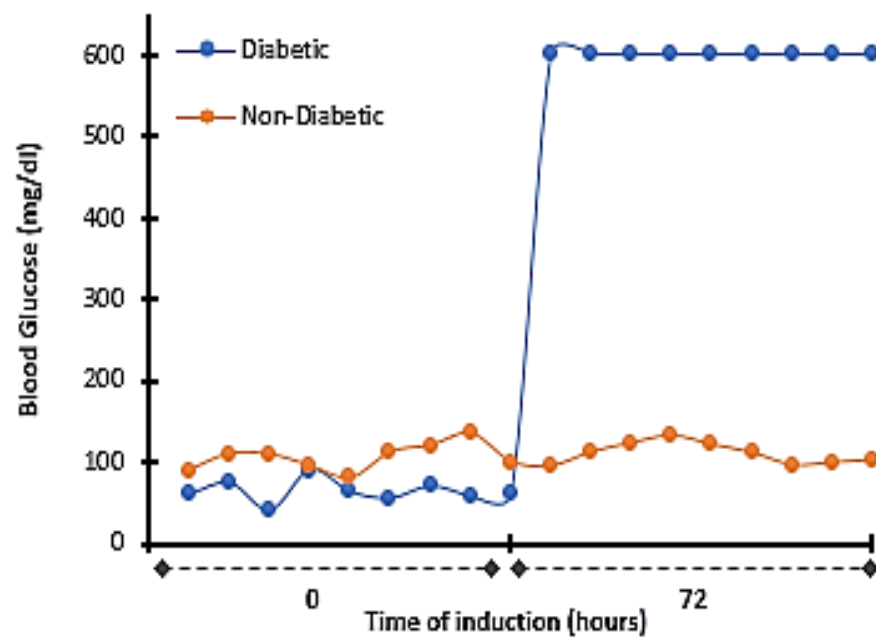
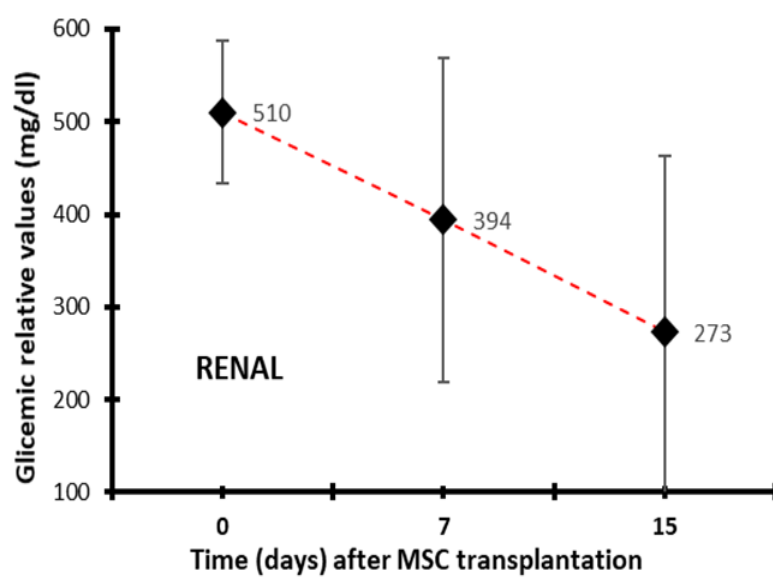
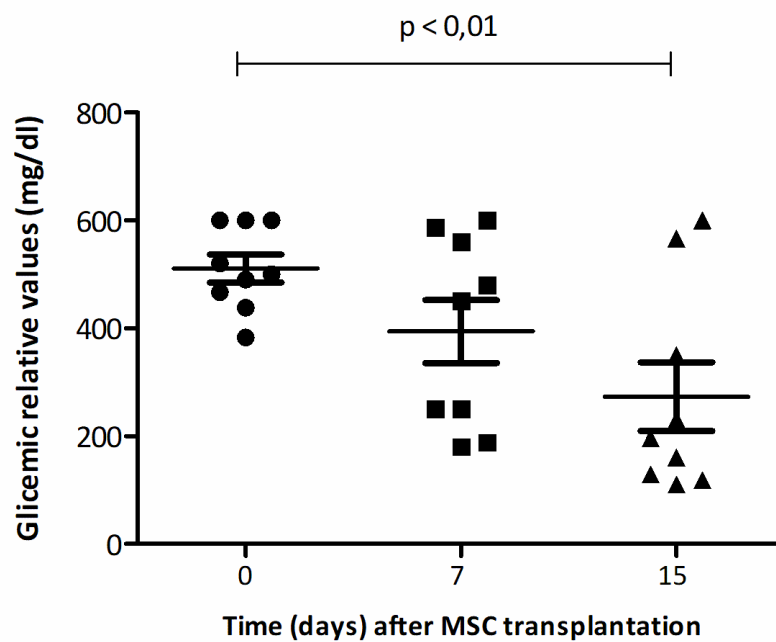
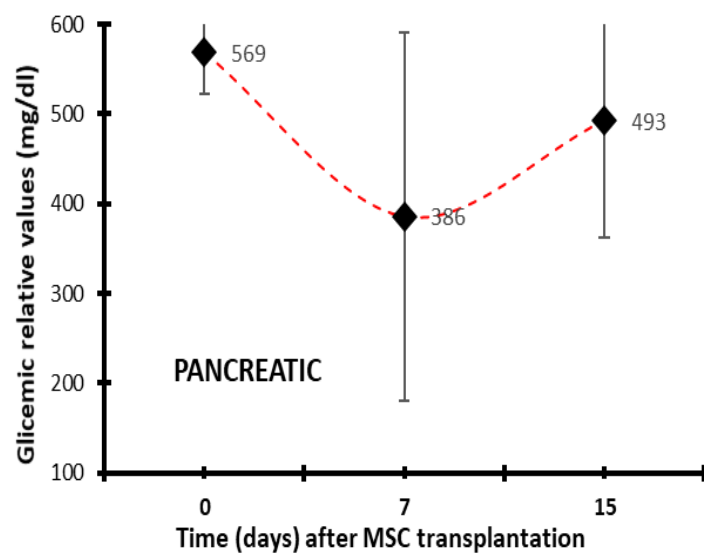
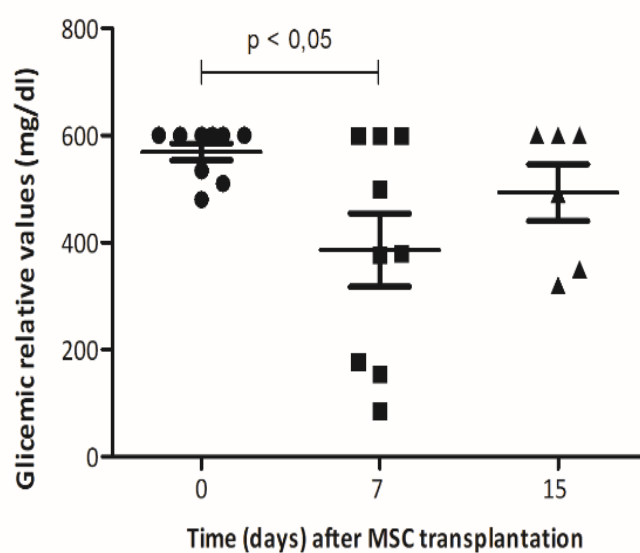
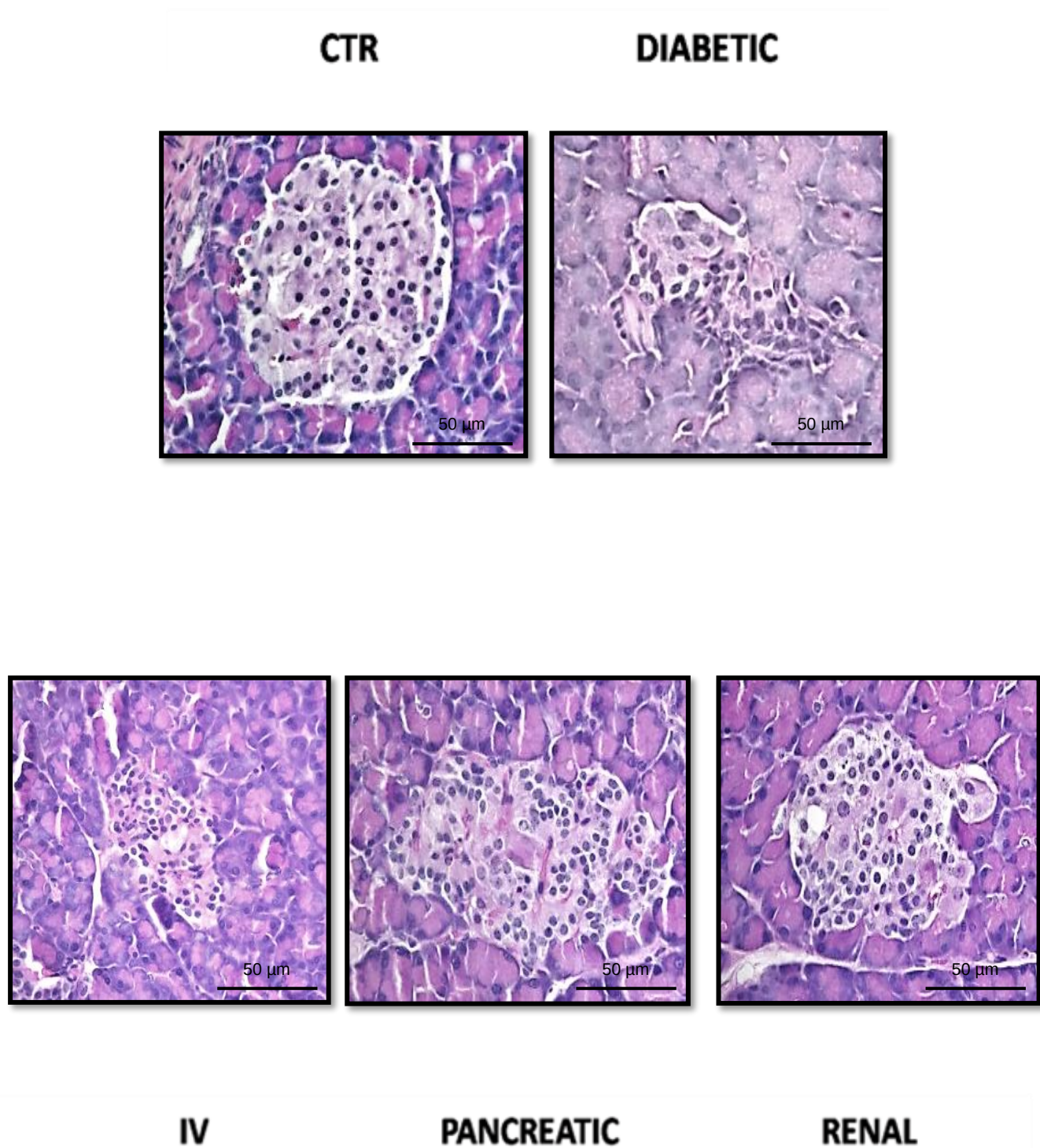


Figure 2

C**D****Figure 2**

G**H****Figure 2**

A**Figure 3**

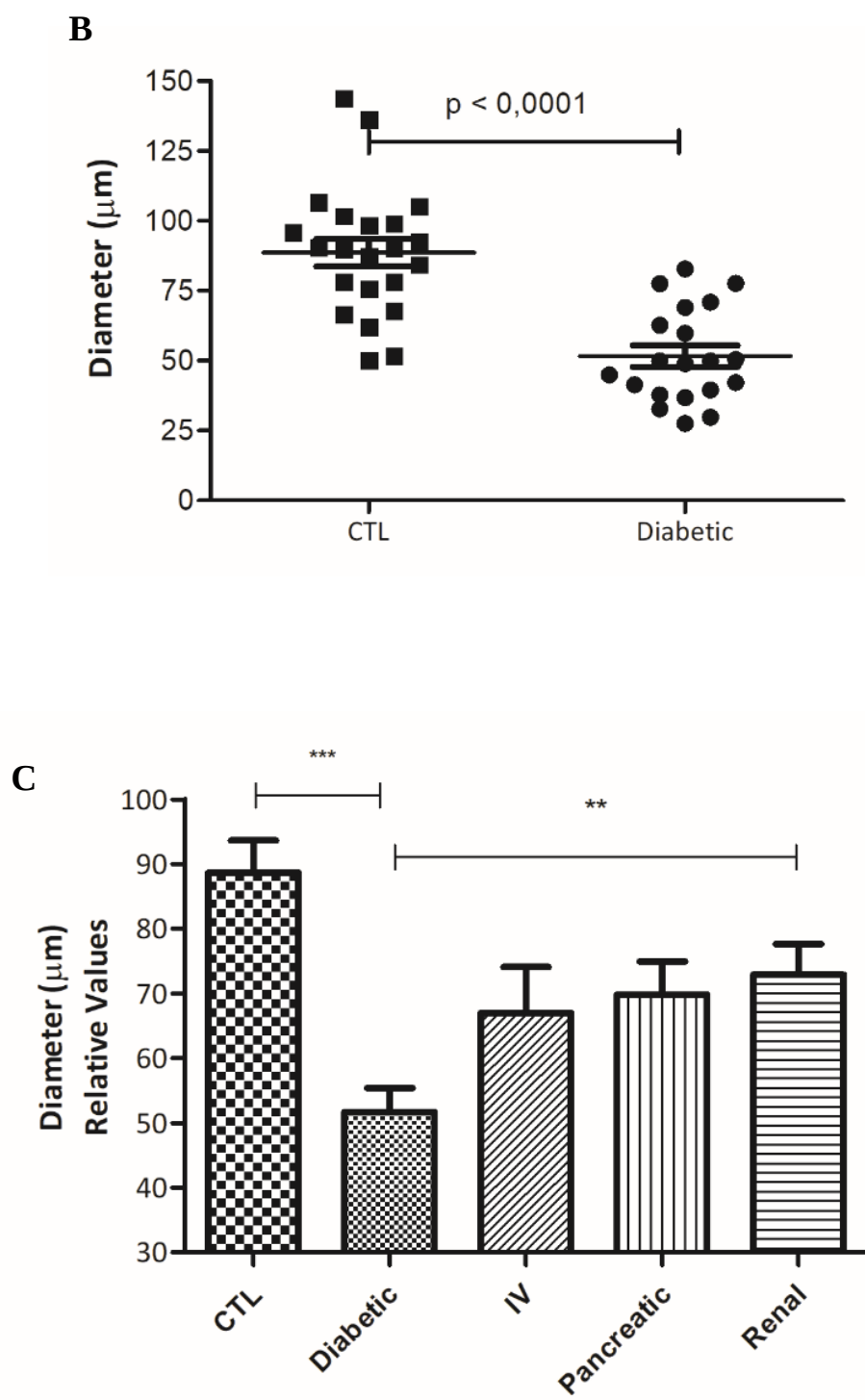
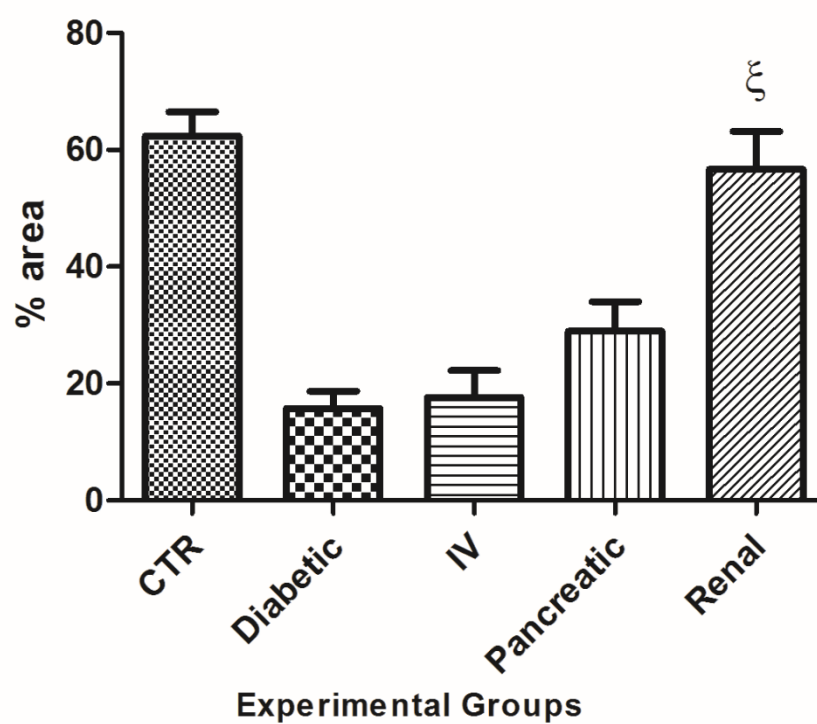
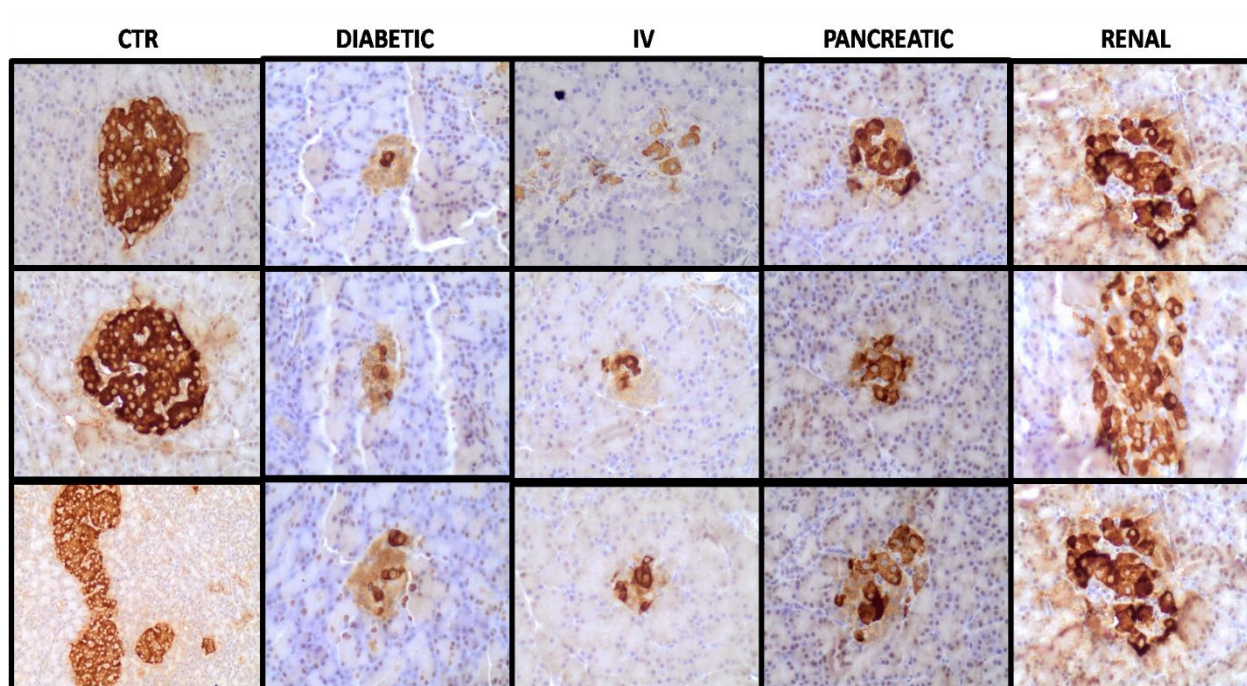


Figure 3

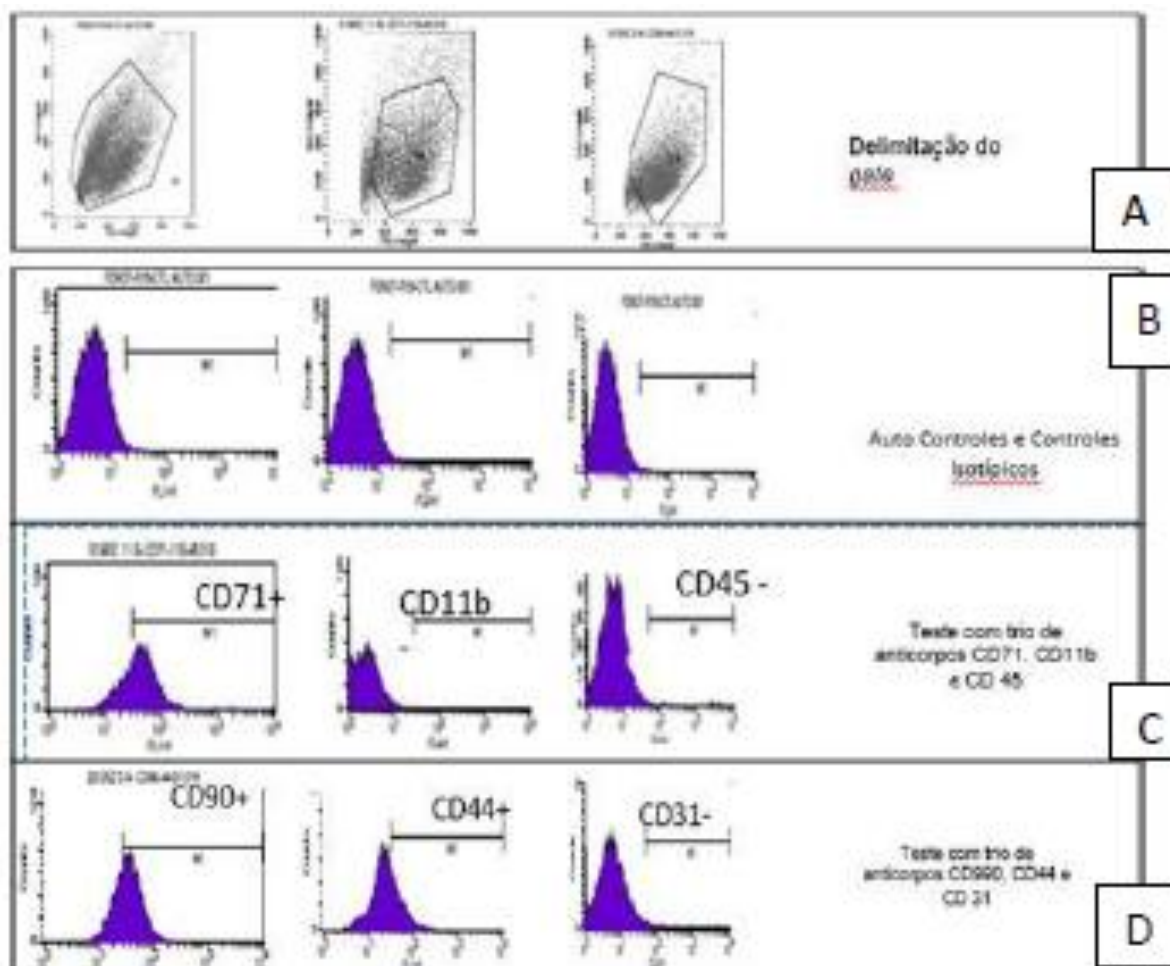


§ P<0.05 Renal vs Pancreatic, IV and Diabetic Group

Figure 4

Supplemental data

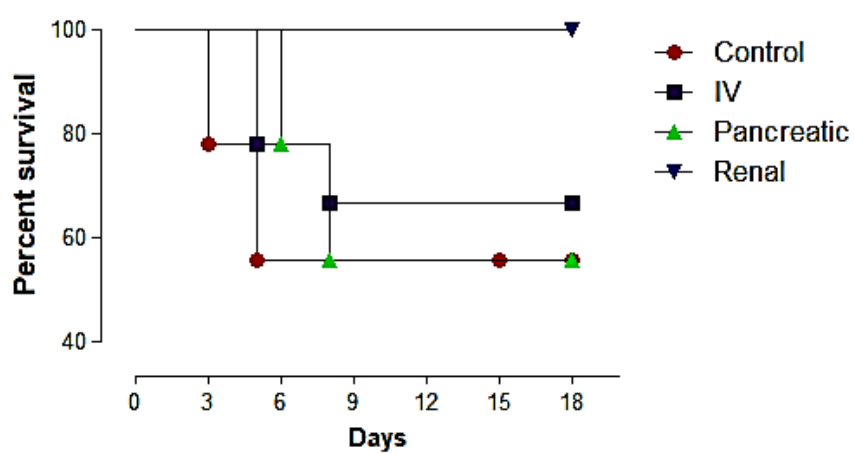
Figura S1 - Representação de resultado da imunofenotipagem com 6 anticorpos



Legenda: Imagens do teste de imunofenotipagem geradas pelo software do citômetro de fluxo.

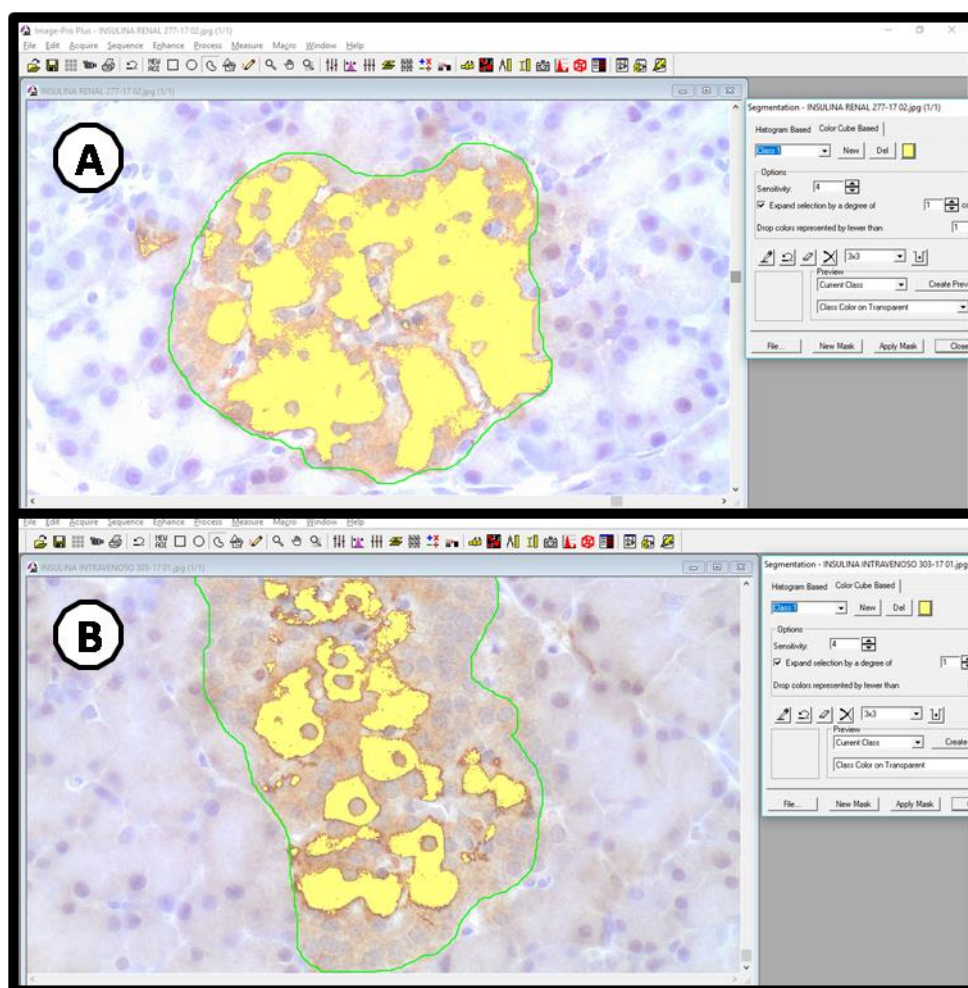
A- população de CTM selecionada para análise. B- histogramas em roxo mostrando marcação negativa dos controles isotípicos e autocontroles (deslocado à esquerda). C- histogramas em roxo mostrando positividade de marcação para o CD71 (deslocado à direita) e negatividade de marcação para os CD11b e CD45. D- histogramas em roxo deslocados à direita no CD90 e CD44, e à esquerda para o CD31. * Análise realizada por Garcia *et al*, 2015. Imagens cedidas com autorização da autora

Figura S2 – Percentual de sobrevivência dos animais durante o experimento.



Legenda: Dia 0 = dia em que os animais foram induzidos ao diabetes; Dia 3 = dia da confirmação do diabetes e do transplante de ATMSCs; Dia 18 = dia da eutanásia, sendo 15 dias após o transplante. Cada símbolo representa a morte de um animal do respectivo grupo. Control = 55% de sobrevivência; IV = 66% de sobrevivência; Pancreatic = 55% de sobrevivência; Renal = 100% de sobrevivência

Figura S3 – Análise imunohistoquímica pelo software Image J.



Legenda: A - mensuração da área marcada pela insulina; B- mensuração da área total - % de área acometida.

Tabela S1. Manejo intensivo dos animais após a indução ao diabetes.

Parameters (mg/dl; °C)	Management
Blood glucose > 500	Insulin Glargine 4,5U.kg.twice daily*
Blood glucose < 100	Glucose Solution 10% orally + 1ml saline SC
Blood glucose < 50	Glucose solution IV + fluid therapy IV
Temperature < 34	Warming for 30 min + fluid therapy SC
Dehydration	1-5ml warm saline SC

Legenda: * dose adaptada de Federiuk et al, 2004.

Tabela S2 – Acompanhamento intensivo dos animais no pós-operatório imediato.

GRUPO CÁPSULA RENAL (GCR)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peso	205,9	212,7	199,8	184,5	200,8	194,5	182,2	198	190,2
Glic.	HIGH	480	350	400	380	506	HIGH	480	HIGH
Dor	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Severa	Severa	Leve	Mod.
Comp.	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Tremor	Tremor	Normal	Tremor
Des.	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Grave	Grave	Leve	Mod.
Manejo	1	1	1	3	3	1	1	3	1

GRUPO INTRAPANCREÁTICO (GIP)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peso	201,2	220,4	150,4	190,4	198,3	200,5	174,5	193,3	170,4
Glic.	112	HIGH	HIGH	400	350	HIGH	509	315	HIGH
Dor	Severa	Severa	Severa	Severa	Severa	Severa	Severa	Severa	Severa
Comp.	Estupor	Ofeg.	Ofeg.	Isol.	Ofeg.	Ofeg.	Ofeg.	Ofeg.	Eriçado
Des.	Grave	Grave	Grave	Grave	Grave	Grave	Grave	Grave	Grave
Manejo	4	1	1	1	1	1	1	1	1

GRUPO INTRAVENOSO (GIV)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peso	198,5	210,2	165,2	190,5	180,4	200,1	160,2	177,7	210,1
Glic.	506	480	HIGH	420	390	HIGH	49	HIGH	HIGH
Dor	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Comp.	Isol.	Ofeg.	Normal	Normal	Normal	Normal	Estupor	Ofeg.	Normal
Des.	Grave	Grave	Normal	Norma	Norma	Norma	Grave	Moderada	Moderada
Manejo	5	5	5	5	5	5	6	5	5

Legenda: Dados representados em valores individuais de Peso corporal (gramas), Glicemia (mg/dl) e Avaliação de Dor, Comportamento, Desidratação e Manejo de cada animal dos grupos do estudo. * HIGH: Glicemia (mg/dl) maior que 600.

Tabela S3 –Representação dos valores de glicemia (mg/dl) do grupo controle diabético (GCD) e grupo controle sadio (GCS) nos respectivos tempos de indução

	<i>Antes</i>	<i>24hrs</i>	<i>48hrs</i>	<i>72hrs</i>
<i>GCD</i>	63±13	325±189	538±82	600±0***
<i>GCS</i>	105±16	108±28	114±23	110±17

Legenda: Dados expressos em médias ± desvio padrão (Teste t Student).

*** Diferença considerada extremamente significativa, onde $p < 0,0001$.

Capítulo III

5. DISCUSSÃO GERAL

Apresentamos neste estudo, um experimento que teve como objetivo comparar três diferentes vias de aplicação de CTMs em animais induzidos ao diabetes, mimetizando um diagnóstico recente, com o objetivo de avaliar a eficácia em relação a regeneração morfofuncional do tecido pancreático lesionado. Um aspecto considerado crítico por outros autores em relação ao transplante de células-tronco e a subsequente eficiência terapêutica está na seleção da melhor via de aplicação visto que a melhor técnica é aquela que oferece o maior nível de regeneração com menores efeitos colaterais (KURTZ, 2008)

A literatura demonstra inúmeras vias de aplicação de células-tronco mesenquimais na tentativa de promover regeneração pancreática, entre elas, a via intravenosa é uma das vias mais empregadas (AMMAR et al., 2015; BAI, 2012), juntamente com a via intraperitoneal (BAI, 2012; KERN et al., 2006; KLINKER et al., 2015), ambas pelo fácil acesso. Outras vias já relatadas incluem: intra-esplênica (YAOCHITE et al., 2015), intra-hepática (BORG et al., 2014), intrapancreática (BELL et al., 2013; LI et al., 2015; PHAN et al., 2014) e pela cápsula renal. (MA et al., 2016; WU et al., 2017), sendo que todas as vias citadas aparentam uma certa eficiência quando avaliadas isoladamente, contudo, nosso estudo considerou comparar as três vias mais estudadas atualmente (intravenosa, intra capsular renal e intravenosa) (CHEN et al., 2017; YAOCHITE et al., 2015) associados ao uso de células-mesenquimais não diferenciadas.

Alguns estudos têm relatado que a melhor forma de otimizar o uso das células-tronco mesenquimais seria realizar a aplicação diretamente no órgão alvo, pois isso poderia maximizar o efeito reparador e imunomodulador e a quantidade de células viáveis se diferenciando no sítio de lesão. Sendo assim, o uso da via intrapancreática seria indicada por ativar células pancreáticas endógenas/precursoras, auxiliando a restaurar o dano pancreático de forma muito mais eficaz (LI et al., 2015). Nosso estudo utilizou a via intrapancreática para aplicação das células-tronco em animais diabéticos, em um modelo que visava mimetizar o diabetes tipo 1 com diagnóstico recente, ou seja, teoricamente representando um processo inflamatório ativo e, sendo assim, em nosso modelo, o uso da via intrapancreática não demonstrou-se eficiente na reparação do órgão lesado, quando comparamos com o efeito benéfico e duradouro relatado por outros autores e também ao comparar com outra via que utilizamos, a via intra-capsular renal. (LI et al., 2015; YAOCHITE et al., 2015)

Em nosso estudo, notamos uma rápida queda nos índices glicêmicos após 7 dias do transplante pela via intrapancreática, tendendo até à reversão ao estado não diabético. Essa redução foi considerada significativa em relação aos níveis glicêmicos no período anterior ao protocolo de transplante, indo de acordo com outros trabalhos que demonstraram o mesmo quadro em relação a rápida redução nos índices glicêmicos após 7 dias de transplante (YAOCHITE et al., 2015). Entretanto, mesmo normalizando os níveis de alguns animais após 7 dias, os mesmos animais que apresentaram reversão do estado hiperglicêmico, foram os que vieram a óbito apresentando sintomas clínicos instáveis, como: dor intensa, inapetência, tremores e diarreia. Todavia, devido à ausência de hiperglicemia, associamos a morte desses animais às complicações secundárias

ao transplante pela via intrapancreática, comprovada pela análise histológica do pâncreas deste grupo que demonstrou permanência de áreas de hemorragia e inflamação, compatíveis com pancreatite. A ocorrência de pancreatite após transplante de células-tronco em ratos diabéticos já foi previamente citada na literatura (CHANG et al., 2009).

Outro fator que deve ser levado em questão, além da via a ser escolhida e o tempo de diagnóstico, é a padronização de uma quantidade de células administradas de acordo com a via a ser escolhida. A maioria dos trabalhos utiliza volumes entre 5×10^5 (WANG et al., 2014)¹, 1×10^6 (YAOCHITE et al., 2015) e 2×10^6 células (AMMAR et al., 2015) e o nosso estudo utilizou o volume de 2×10^6 células/0,5ml por aplicação, em todas as vias estudadas.

Um outro estudo recente relatou que a administração de pequenas quantidade de células ($1,5 \times 10^3$ células máximas) pelo parênquima pancreático pode ser extremamente útil para proliferação e até transdiferenciação em diversos outros tipos celulares, visto que o excesso de células infundidas pode predispor a ativação de injúria local (SATO et al., 2017). Podemos então inferir que a baixa eficácia do uso desta via neste trabalho possa estar relacionada também, ao alto volume de células injetadas (2×10^6 células), sendo necessárias novas pesquisas na tentativa de padronização de volume injetado/ via utilizada/ fase de doença. Em uma fase de diagnóstico recente do diabetes ou até preventivo, a terapia celular com uso de células tronco mesenquimais parece exercer melhor efeito quando sua característica imunomoduladora é melhor aproveitada, visto que atualmente, pesquisadores tem proposto a necessidade de mudança na denominação de *stem cells* conferidas às células mesenquimais

para *signaling cells* , comprovando seu real efeito imunomodulador.(CAPLAN, 2017)

Em relação a via intravenosa, sabe-se que as células-tronco transplantadas são primeiramente captadas no pulmão, sendo que somente cerca de 40-50% do volume aplicado é redistribuído para a circulação sistêmica (FISCHER et al., 2009; WU et al., 2017). Em nosso estudo, a via intravenosa não foi eficiente em reduzir os níveis glicêmicos ou melhorar a condição morfológica das ilhotas, além de não ter promovido melhora clínica aos animais, que permaneceram ofegantes até o final do estudo, concordando com inúmeros relatos que demonstraram que onde uso da via intravenosa pode gerar redução da circulação sistêmica (FISCHER et al., 2009), além de graves sintomas de taquipneia, apneia e morte por embolia pulmonar em 25-40% dos animais transplantados (FURLANI et al., 2009). Neste presente estudo, o transplante pela via intravenosa gerou uma taxa de mortalidade de 33%, a mesma taxa gerada pela via intrapancreática.

Em relação a via intra-capsular renal, a literatura demonstra que a cápsula renal ainda é um dos principais locais para o transplante de ilhotas pancreáticas e de células-tronco, tanto pelo seu fácil acesso quanto à rápida velocidade de recuperação e possibilidade de reimplantação (GABR et al., 2015; MA et al., 2016; PARK et al., 2011). Além destes fatores, a cápsula renal já foi descrita como portadora de células-tronco locais sendo que estas auxiliam a reparação do parênquima renal secundário a injúrias e distúrbios metabólicos. (MOSHREFI et al., 2015; PARK et al., 2011). Pesquisadores também detectaram aumento na vascularização renal após transplante de células tronco pela cápsula renal de ratos diabéticos (BORG et al., 2014), assim como já demonstraram que o

transplante de células mesenquimais de tecido adiposo foi capaz de reduzir a injúria renal pela diminuição do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias em ratos (BAI, 2012).

Destarte, em nosso estudo, podemos comprovar a eficácia previamente relatada, posto que, a técnica foi a que apresentou melhor benefício quando comparado às outras duas técnicas, sendo a única técnica que promoveu maior taxa de sobrevivência (100%), além de reversão do estado hiperglicêmico em alguns animais, restabelecimento de peso e redução do requerimento insulínico, corroborando com o achado em estudos anteriores recentes (WU et al., 2017).

Muitos pesquisadores atribuem o efeito positivo do transplante fora do órgão alvo como sendo um efeito imunomodulador, entretanto, um outro recente estudo comprovou a transdiferenciação de células não diferenciadas em hepatócitos após transplante pela cápsula renal. (CHEN et al., 2017)

Ainda há muitas controversas em relação ao real papel exercido pela célula-tronco em relação ao transplante de células-tronco quando realizados fora do sítio de lesão e também quando estas não estão previamente diferenciadas *in vitro*. De acordo com outros pesquisadores, a redução de citocina pró-inflamatórias pode representar o possível mecanismo pelo qual o transplante de células mesenquimais previne a morte das células beta pancreáticas e promove imunomodulação.(NAVARRO et al., 2016). Nosso estudo priorizou o uso de células-tronco mesenquimais não diferenciadas em células produtoras de insulina antes do transplante, com o intuito de avaliar o real efeito imunomodulador deste tipo celular, corroborando com estudos que afirmam a possibilidade de uso das células-tronco mesenquimais não diferenciadas em

indivíduos diabéticos devido ao seu excelente potencial imunomodulador.(FIORINA et al., 2011)

As CTM possuem importante efeito imunomodulador nos processos inflamatórios por secretarem inúmeros fatores bioativos capazes de regular a inflamação presente no tecido alvo e promover reparação tecidual (KAPLAN; YOUNG; LODIE, 2011; NAVARRO et al., 2016). Por conseguinte, é importante assegurar que as células escolhidas para a terapia gênica sejam realmente capazes de secretar tais substâncias, como as citocinas: IL-4, IL-10, TNF e IFN. A técnica utilizada para obtenção das células-tronco pode ser crucial na manutenção destes fatores anti-inflamatórios e devem ser levados em consideração de acordo com o tipo de doença a ser utilizado e o tempo de diagnóstico, uma vez que a escolha da melhor via de aplicação deve ter como principal função exercer um efeito autócrino e regenerador direto ou parácrino e imunomodulador/sinalizador.

As células-tronco utilizadas nesta pesquisa foram obtidas por técnica de digestão mecânica e bioestimulação por LED, ou seja, eram células altamente viáveis e positivas para presença de citocinas imunomoduladoras e em maior concentração quando comparadas às células obtidas por digestão mecânica (GARCIA, 2015). De acordo com Garcia *et al*; 2015, o uso de luz pulsátil na dose de 1 e 3J/cm² em culturas de CTM é extremamente importante para estimular a proliferação de interleucinas pró-inflamatórias como IL-4 e IL-10, importantes no processo de reparação tecidual e crucial para o diabetes (GARCIA, 2015). Efeito este que provavelmente justifica o excelente efeito parácrino visto neste estudo após transplante pela cápsula renal.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Concluímos que a via intra capsular renal foi eficaz em reverter o estado diabético de maneira significativa em 33% dos animais além de ser eficaz em melhorar a condição clínica dos animais e assegurar uma taxa de sobrevivência de 100% até o final do estudo, sem a necessidade de insulino terapia ou com doses menores em relação às doses inicialmente empregadas.
- O uso de MSc não diferenciadas foi eficaz em promover efeito imunomodulador quando utilizado pela cápsula renal, estando provavelmente associado ao estado da doença e ao método de obtenção das células que priorizou a manutenção de substâncias bioativas cruciais para o processo anti-inflamatório.
- Tanto a cápsula renal, quanto o uso de células não diferenciadas parecem eficazes para uso em terapia gênica de pacientes diabéticos, visando contenção de fatores auto-imunes e regeneração morfofuncional do tecido lesionado.

REFERÊNCIAS

- A.L. MÁRQUEZ-AGUIRRE, A.A. CANALES-AGUIRRE, E. PADILLA-CAMBEROS, H. E.-S. AND N. E. D.-M. Development of the endocrine pancreas and novel strategies for β -cell mass restoration and diabetes therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 765–776, 2015.
- ABDI, R. et al. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: A potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 7, p. 1759–1767, 2008.
- AMMAR, H. I. et al. Comparison of adipose tissue- and bone marrow- derived mesenchymal stem cells for alleviating doxorubicin-induced cardiac dysfunction in diabetic rats. **Stem Cell Res Ther**, v. 6, n. 1, p. 148, 2015.
- ASSOCIATION, A. D. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. Suppl.1, 2014.
- ASSOCIATION, A. D. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 40, n. Suppl. 1, p. 11–24, 2017.
- BAI, S. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats by inhibiting oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and the p38 MAPK signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, p. 85–92, 2012.
- BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 175–180, 1999.
- BELL, G. I. et al. **Transplantation models to characterize the mechanisms of stem cell-induced islet regeneration**. [s.l.: s.n.]. v. 1
- BENNET, W. et al. Incompatibility between human blood and isolated islets of langerhans: A finding with implications for clinical intraportal islet transplantation?

Diabetes, v. 48, n. 10, p. 1907–1914, 1999.

BENTHUYSEN, J. R.; CARRANO, A. C.; SANDER, M. Advances in ?? cell replacement and regeneration strategies for treating diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 10, p. 3651–3660, 2016.

BHONDE, R. R. et al. Making surrogate B-cells from mesenchymal stromal cells: Perspectives and future endeavors. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 46, n. 1, p. 90–102, 2014.

BLOOM, C. A.; RAND, J. S. Diabetes and the Kidney in Human and Veterinary Medicine. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 43, n. 2, p. 351–365, 2013.

BORG, D. J. et al. Mesenchymal stromal cells improve transplanted islet survival and islet function in a syngeneic mouse model. **Diabetologia**, v. 57, n. 3, p. 522–531, 2014.

BOSE, B.; SHENOY P, S. In Vitro Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Functional B Islets Under 2D and 3D Culture Conditions and In Vivo Preclinical Validation of 3D Islets. **Methods in Molecular Biology**, n. 1341, p. 257–284, 2016.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1445–1451, jun. 2017.

CARLSSON, P.-O.; KORSGREN, O.; LE BLANC, K. Mesenchymal stromal cells to halt the progression of type 1 diabetes? **Current diabetes reports**, v. 15, n. 7, p. 46, 2015.

CHANG, C. et al. Mesenchymal Stem Cells Adopt β -Cell Fate Upon Diabetic Pancreatic Microenvironment. **Pancreas**, v. 38, n. 3, p. 275–281, abr. 2009.

CHEN, Z. et al. Transdifferentiation of human male germline stem cells to

hepatocytes &in vivo& via the transplantation under renal capsules.

Oncotarget, v. 8, n. 9, p. 14576–14592, 27 fev. 2017.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204–13, 2006.

DAVE, S. D. et al. Novel therapy for insulin-dependent diabetes mellitus : infusion of in vitro-generated insulin-secreting cells. p. 41–45, 2015.

DE CASTRO, L. C. G. Tendência temporal da idade de início do Diabetes mellitus tipo 1 no período de 1981 a 2010 no distrito federal. **tese (doutorado em ciencias da saúde), Universidade de Brasília, Brasília - DF.**, p. 96, 2015.

DHOLAKIA, S. et al. Advances in pancreas transplantation. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 109, n. 4, p. 141–146, 2016.

DIABETES, D. O. F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, n. SUPPL. 1, 2010.

DIAZ-VALENCIA, P. A.; BOUGNÈRES, P.; VALLERON, A.-J. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. **BMC public health**, v. 15, p. 255, 2015.

FENG, J.; XING, W.; XIE, L. Regulatory Roles of MicroRNAs in Diabetes. [s.d.].

FIORINA, P. et al. Immunological Applications of Stem Cells in Type 1 Diabetes. v. 32, n. December, p. 725–754, 2011.

FISCHER, U. M. et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem cells and development**, v. 18, n. 5, p. 683–692, 2009.

FLOYEL, T.; KAUR, S.; POCIOT, F. Genes Affecting β -Cell Function in Type 1 Diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 15, n. 11, 2015.

FURLANI, D. et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? **Microvascular Research**, v. 77, n. 3, p. 370–376, maio 2009.

GABR, M. M. et al. Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Insulin-Producing Cells : Evidence for Further Maturation In Vivo. v. 2015, 2015.

GARCIA, H. V. **Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato sob ação da luz contínua e pulsátil de 630 nm utilizando LED**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.

GEORGIA, S.; BHUSHAN, A. B Cell Replication Is the Primary Mechanism for Maintaining Postnatal BCell Mass. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 7, p. 963–968, 2004.

GEPTS, W.; LECOMPTE, P. M. The pancreatic islets in diabetes. **The American Journal of Medicine**, v. 70, n. 1, p. 105–115, 1981.

GRIFFIN, T. P. et al. The Promise of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Diabetic Kidney Disease. **Current Diabetes Reports**, v. 16, n. 5, p. 42, 2016.

HAMDY, W.; NEMR, E. E.; AL, A. Therapeutic effects of stem cell on hyperglycemia , hyperlipidemia , and oxidative stress in alloxan-treated rats. p. 193–200, 2014.

HASHEMIAN, S. J.; KOUHNAVARD, M.; NASLI-ESFAHANI, E. Mesenchymal Stem Cells : Rising Concerns over Their Application in Treatment of Type One Diabetes Mellitus. v. 2015, 2015.

HINMAN, R. M.; SMITH, M. J.; CAMBIER, J. C. B cells and type 1 diabetes... in mice and men. **Immunology Letters**, v. 160, n. 2, p. 128–132, 2014.

HOSSAIN, M. K. et al. Recent Advances in Disease Modeling and Drug Discovery for Diabetes Mellitus Using Induced Pluripotent Stem Cells. n. Iddm,

p. 1–17, 2016.

IN'T VELD, P. Insulitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion.

Islets, v. 3, n. 4, p. 131–138, 2011.

JAYASIMHAN, A.; MANSOUR, K. P.; SLATTERY, R. M. Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 126, n. 1, p. 1–18, 2014.

JHA, J. C. et al. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 0, n. 0, p. ars.2016.6664, 2016.

JUN, H.; YOON, J.; CELLS, I. Approaches for the Cure of Type 1 Diabetes by Cellular and Gene Therapy. p. 249–262, 2005.

KAPLAN, J. M.; YOUNG, M. E.; LODIE, T. A. Immunomodulatory Activity of Mesenchymal Stem Cells. p. 297–316, 2011.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 5, p. 1294–301, 2006.

KHORSANDI, L. et al. Three-dimensional differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. **Cell and Tissue Research**, v. 361, n. 3, p. 745–753, 2015.

KLINKER, M. W. et al. Mesenchymal stem cells in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases in experimental animal models. v. 7, n. 3, p. 556–567, 2015.

KRISHNA, C. S. M.; SRIKANTA, S. Type 1 diabetes pathogenesis - Prevention??? **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 19, n. Suppl 1, p. S58-63, 2015.

KURTZ, A. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. **International**

journal of stem cells, v. 1, n. 1, p. 1–7, nov. 2008.

LEE, R. H. et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 103, n. 46, p. 17438–17443, 2006.

LI, L. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves type 1 diabetes mellitus. 2015.

MA, S.-N. et al. Subcapsular Implantation of Pancreatic Islets in Syngeneic, Allogeneic, and Xenogeneic Mice. **Transplantation Proceedings**, v. 48, n. 8, p. 2821–2825, out. 2016.

MA, X.; ZHU, S. Chemical strategies for pancreatic β cell differentiation, reprogramming, and regeneration. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. 4, p. 298–301, 2017.

MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; CARLO, R. J. DEL. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, p. 1–8, 2009.

MOSHREFI, M. et al. Transplantation of differentiated umbilical cord mesenchymal cells under kidney capsule for control of type I diabetes in rat. **Tissue and Cell**, v. 47, n. 4, p. 395–405, 2015.

NAVARRO, J. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from patients with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus exhibit preserved in vitro and in vivo immunomodulatory properties. **Stem Cell Research & Therapy**, p. 1–16, 2016.

NGUYEN, A. et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 69, n. 2, p. 170–179, 2016.

NI, W. et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation

Alleviates Renal Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 63, n. 11, p. 842–53, 2015.

OH, J. Y. et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. **Stem cells**, v. 26, p. 1047–1055, 2008.

ORGANIZATION, W. H. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016.

PAISEY, R. B. et al. Diabetes-related major lower limb amputation incidence is strongly related to diabetic foot service provision and improves with enhancement of services: peer review of the South-West of England. **Diabetic Medicine**, 11 out. 2017.

PARK, H. et al. Renal capsule as a stem cell niche Renal capsule as a stem cell niche. n. March 2010, p. 1254–1263, 2011.

PHAN, N. K. et al. Preliminary evaluation of intravenous infusion and intra-pancreatic injection of human umbilical cord blood-derived mes-enchymal stem cells for the treatment of diabetic mice. v. 1, n. 3, p. 98–105, 2014.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5411, p. 143–7, 1999.

RYAN, E. A. et al. Five-Year Follow-Up After Clinical Islet Transplantation. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2060–2069, 2005.

SATO, M. et al. Intrapancreatic parenchymal injection of cells as a useful tool for allowing a small number of proliferative cells to grow in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1678, 2 ago. 2017.

SAYURI, M. et al. Caracterização dos portadores de diabetes submetidos à amputação de membros inferiores em Londrina, Estado do Paraná. **Acta**

Scientiarum. Health Sciences Maringá, v. 32, n. 2, p. 205–213, 2010.

SBD. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes**. [s.l: s.n.].

SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D.; STAUB, H. Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogenia auto-imune. **Scientia medica**, v. 17, n. 4, p. 212–217, 2007.

SKYLER, J. S. et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. **Diabetes**, p. 1–15, 2016.

TAKESHITA, H. et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. **Cell biochemistry and function**, v. 26, n. 7, p. 813–816, 2008.

VANIKAR, A. V.; TRIVEDI, H. L.; THAKKAR, U. G. Stem cell therapy emerging as the key player in treating type 1 diabetes mellitus. **Cytotherapy**, v. 18, n. 9, p. 1077–1086, 2016.

WANG, H. et al. Immunological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells and the therapeutic effects of their transplantation on hyperglycemia in diabetic rats. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, n. 2, p. 263–270, 2014.

WEIR, G. C.; BONNER-WEIR, S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1281, n. 1, p. 92–105, 2013.

WHO. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia. **Who2**, p. 50, 2006.

WU, D. et al. Transplantation routes affect the efficacy of human umbilical cord mesenchymal stem cells in a rat GDM model. **Clinica Chimica Acta**, 16 out. 2017.

YAOCHITE, J. et al. Therapeutic efficacy and biodistribution of allogeneic

mesenchymal stem cells delivered by intrasplenic and intrapancreatic routes in streptozotocin-induced diabetic mice. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 31, 2015.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: Desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647–656, 2010.

ZHOU, Q. et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 627–632, 2008.

ZIEGLER, A. G. et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. **Jama**, v. 309, n. 23, p. 2473–9, 2013.

ANEXOS

ANEXO 1 – Submission Acknowledgment – DB18-0230

22/02/2018

Gmail - Submission Acknowledgement for DB18-0230



Bianca Gonçalves <biamgoncalves@gmail.com>

Submission Acknowledgement for DB18-0230

1 mensagem

Diabetes <onbehalf@manuscriptcentral.com>
 Responder a: Diabetes.Journal@diabetes.org
 Para: biamgoncalves@gmail.com

22 de fevereiro de 2018 14:31

Manuscript ID: DB18-0230 - "Adipose-derived mesenchymal stem cells transplantation under renal capsule restores β -cell function in a experimental autoimmune diabetes model."

22-Feb-2018

Dear Miss Gonçalves:

Thank you for submitting your work to Diabetes. Your manuscript has been successfully submitted and is presently being given full consideration for publication. Please refer to the above manuscript number in all future correspondence.

If you have not already done so, please upload, e-mail, fax, or mail the completed manuscript submission form for all authors to the Diabetes Editorial Office ((317) 547-4858; diabetesjournal@diabetes.org) at your earliest convenience. The manuscript submission form can be found at <http://mc.manuscriptcentral.com/diabetes> or on the instructions for authors at <http://diabetes.diabetesjournals.org>.

Please note that if your paper is missing any key information pertinent to the peer-review process, such as defined contributions for each author or conflict-of-interest statements, our Editorial Office may contact you to request such information. Before Diabetes fully considers your article for publication, we may ask that you upload a new version of your manuscript that includes any required information.

Also, there is a \$95 page charge for accepted papers and an additional \$460 charge for each color figure published in print. ADA is actively looking for ways to lower these fees, but for now the current rates are necessary to support the review, production, dissemination, and archiving/indexing of the journal.

(Note: Online Letters to the Editor, invited Commentaries, and formally invited Perspectives and Methodological Reviews do not incur charges. This does not include article proposals that are approved for submission.)

For the best possible reproduction of your figures, we highly encourage you to submit digital figures in TIFF, EPS, or PDF file formats. Please refer to the instructions for authors for more information.

If you have any questions or need assistance, please do not hesitate to contact us at diabetesjournal@diabetes.org.

Thank you once again,

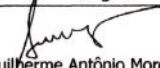
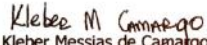
Diabetes Editorial Office
 Jane Castner, Diabetes Peer Review Manager
 Joan Garrett, Assistant Peer Review Manager



* ManuscriptSubmissionForm040114.pdf

39K

ANEXO 2

  	
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 811 de 13/12/2012	
CERTIFICADO Nº 1182/2016-CEUA	
Certificamos que a proposta intitulada "Regeneração morfofuncional do diabetes tipo I em ratos experimentalmente diabéticos através do transplante de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo - comparação entre vias intrapancreática, intravenosa e intra-capsular renal", registrada com o n. 1182/2016, sob a responsabilidade de Bianca Mariani Gonçalves, orientada pelo Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado, Co-orientada pela Profª Drª Célia Regina Nogueira, com a colaboração do Dr. Alexandre Todorovic Fabro e Elenice Deffune – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 30/06/2016.	
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/12/2017
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	50
Peso/Idade	160-250 gramas/30-60 dias
Sexo	Macho e Fêmea
Origem	Laboratório Anilab Paulínia
 Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros Presidente da CEUA	 Kleber Messias de Camargo Secretário da CEUA
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-687 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail: secretaria_ceua@fmb.unesp.br	