

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

CURSO DE NUTRIÇÃO

Aline Moreira

Implante subcutâneo de células estromais mesenquimais diferenciadas em células produtoras de insulina e seu efeito no déficit cognitivo em ratos diabéticos

Porto Alegre

Novembro de 2020

Aline Moreira

Implante subcutâneo de células estromais mesenquimais diferenciadas em células produtoras de insulina e seu efeito no déficit cognitivo em ratos diabéticos

Trabalho de conclusão de curso graduação
apresentado como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Co-orientadora: Dra. Krista Minéia Wartchow

Porto Alegre

Novembro de 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Moreira, Aline

Implante subcutâneo de células estromais mesenquimais diferenciadas em células produtoras de insulina e seu efeito no déficit cognitivo em ratos diabéticos / Aline Moreira. -- 2020.

45 f.

Orientador: Carlos Alberto Gonçalves.

Coorientador: Krista Minéia Wartchow.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Diabetes. 2. Células tronco. 3. Déficit cognitivo. 4. Implante. I. Gonçalves, Carlos Alberto, orient. II. Wartchow, Krista Minéia, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, minha mãe, meu pai, minha irmã e meu irmão por todo apoio e carinho, cada um a sua maneira. Ao laboratório 33 por ter me dado a oportunidade de iniciação científica, pelo aprendizado e carinho trocado nesses anos, principalmente a minha co-orientadora, por ter me dado suporte em meio a pandemia e ter construído comigo esse caminho. Agradeço também as políticas de Ações Afirmativas, que garantiram minha permanência na universidade.

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune que atinge mais de 46 milhões de pessoas no mundo. Ainda não existe cura para essa doença e o tratamento vigente se dá pela insulino terapia, porém a falta de uma resposta fisiológica leva a episódios de hiperglicemia que são a causa de muitas complicações. Sabe-se que o DM1 ao longo do tempo pode levar ao déficit cognitivo relacionado a históricos de hiper e/ou hipoglicemia que podem causar danos ao sistema nervoso central. O uso de células estromais mesenquimais (MSCs) diferenciadas em células produtoras de insulina (CPIs) têm apontado benefícios para o controle glicêmico assim como melhora na cognição, demonstrado em um estudo anterior e complementar a esse no período de três semanas após indução de DM1. Portanto, esse estudo buscou investigar se esses benefícios através da implantação de CPIs na região subcutânea (SC) seriam permanentes, avaliados em um período mais longo, no caso, oito semanas após indução do DM1. A primeira fase deste estudo (in vitro) foi caracterizar as células estromais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) e avaliar o protocolo para sua diferenciação em IPCs. A segunda fase foi avaliar a funcionalidade dos IPCs in vivo após oito semanas de experimento. As células foram implantadas no local SC após um modelo DM1 de uma semana. Como resultado, obtivemos um menor nível sanguíneo de glicose uma semana após implante em comparação ao grupo DM1 não tratado. Com relação ao peso corporal, tanto os animais diabéticos quanto o grupo com o implante mantiveram o peso ao longo do tempo, enquanto que o grupo Sham teve o aumento natural relacionado ao crescimento do animal. Após oito semanas da indução do modelo, avaliou-se parâmetros periféricos como peptídeo C e AGEs séricos. O peptídeo C não foi detectável no grupo que recebeu implante e os níveis de AGEs tiveram um aumento significativo nos dois grupos diabéticos (STZ e SC). Para avaliar alterações hipocâmpais, foi medido o conteúdo de GFAP e S100B, marcadores de atividade e lesão astrocitária. Não se observou diferença no conteúdo de GFAP entre os três grupos, e o conteúdo de S100B não retornou aos níveis do animal Sham. No teste de reconhecimento de objetos, o implante não foi capaz de prevenir ou reverter o efeito deletério tanto na memória de curto e longo prazo observado nos animais diabéticos. Por fim, mais estudos são necessários para compreender o efeito do implante das CPIs no DM1, principalmente entender o fato de o efeito positivo observado em três semanas ter desaparecido ao longo do tempo. Acredita-se que novas abordagens devem ser avaliadas para garantir a eficácia da terapia no futuro, como implantação de um número maior de células ou múltiplos implantes, uma vez que o acesso subcutâneo é pouco invasivo e de fácil execução.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is an autoimmune disease that affects more than 46 million people worldwide. There is still no cure for this disease and the current treatment is by insulin therapy, but the lack of a physiological response leads to episodes of hyperglycemia, which are the cause of many complications. It is known that, over time, DM1 can lead to cognitive deficit related to stories of hyper and/or hypoglycemia that cause damage to the central nervous system. The use of differentiated mesenchymal stromal cells (MSCs) in insulin-producing cells (CPIs) has pointed out benefits for glycemic control as well as improved cognition, demonstrated in a previous and complementary study, in a period of three weeks after induction of DM1. The first phase of this study (*in vitro*) was to characterize adipose-derived stromal cells (ADSCs) and to evaluate the protocol for their differentiation in IPCs. The second phase was to assess the functionality of the IPCs *in vivo* after three and eight weeks experiment. The cells were implanted on SC site after one-week DM1 model. Therefore, this study sought to investigate whether these benefits through the implantation of CPIs in the subcutaneous region (SC) would be permanently evaluated over a longer period - in this case, eight weeks after induction of DM1. As a result, we obtained a lower glucose level one week after implant compared to the DM1 group. Regarding body weight, both diabetic animals and the group with the implant maintained their weight over time, while the Sham group had the natural increase related to the growth of the animal. Eight weeks after the model was induced, peripheral parameters such as C-peptide and serum AGEs were evaluated. C-peptide was not detectable in the group that received an implant and in AGE levels we found a significant increase in the two diabetic groups (STZ and SC). To assess hippocampal changes, the content of GFAP and S100B - markers of activity and astrocytic damage - were measured. There was no difference in the GFAP content between the three groups, nor in the S100B protein, as well as in the novel recognition test, so the implant was not able to prevent or reverse this deleterious effect in both short and long term memory. Further studies are necessary to understand the effect of MSCs on DM1, especially to understand the fact that the positive effect observed in three weeks has disappeared over time. It is believed that new approaches should be evaluated to ensure an effective therapy in the future, such as implantation of a larger number of cells or multiple implants, since the subcutaneous access is not very invasive and easy to perform.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs - Produtos finais de glicação avançada

CPIs - Células produtoras de insulina

CT - Células tronco

CTPIs - Células-tronco pluripotentes induzidas

DA - Doença de Alzheimer

DM - Diabetes Mellitus

DM1 - Diabetes mellitus tipo 1

DM2 - Diabetes mellitus tipo 2

DG - Diabetes gestacional

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

HbA1c - hemoglobina glicada

HLA - Antígeno leucocitário humano

MSCs - Células estromais mesenquimais

RAGE - Receptor de produtos finais de glicação avançada

RO - Reconhecimento de objetos

SC - Subcutâneo

STZ - Estreptozotocina

ÍNDICE DE FIGURAS

Imagem 1. Patogênese do DM1	9
Imagem 2. Estadiamento do DM	11
Imagem 3. Mecanismos de dano celular induzido por hiperglicemia.	13
Imagem 4. Representação esquemática da provável via de macromoléculas reagindo com açúcares redutores para formar AGEs / ALEs e DNA-AGEs	14
Imagem 5. Hierarquia das células-tronco	19
Imagem 6. Efeitos imunomoduladores das MSCs nas células do sistema imunológico.	22
Imagem 7. Células CPIs GFP+ no hipocampo de ratos implantados no SC.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 DM	8
1.2 DM1	8
1.3 Déficit cognitivo no diabetes	14
1.4 Terapias para DM1	17
1.4 Células Estromais Mesenquimais (MSCs).....	21
1.3 Migração de MSCs	22
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVO	24
4. METODOLOGIA	24
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Glicose sanguínea e peso corporal.....	27
4.4 Teste de reconhecimento de objetos (RO)	31
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO:	39
7. BIBLIOGRAFIA	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 DM

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não é mais capaz de produzir insulina ou quando o corpo não consegue fazer bom uso da insulina que produz. Não ser capaz de produzir insulina ou de usá-la de forma eficaz leva a níveis elevados de glicose no sangue (conhecido como hiperglicemia) (International Diabetes Federation, 2020). A longo prazo, níveis elevados de glicose estão associados a danos ao corpo e à falência de vários órgãos e tecidos. Existem basicamente três tipos de DM, diabetes tipo 1 (DM1) que é autoimune, diabetes tipo 2 (DM2) que é adquirida e está fortemente associada ao estilo de vida, e diabetes gestacional (DG) que consiste em níveis elevados de glicose no sangue durante a gravidez, portanto, está relacionado a complicações para a mãe e o bebê (International Diabetes Federation, 2020). Geralmente, desaparece após a gravidez, mas as mulheres afetadas e seus filhos têm alto risco de desenvolver DM2 posteriormente (International Diabetes Federation, 2020). Ainda segundo a *International Diabetes Federation*, dados de 2019 indicam que aproximadamente 463 milhões de adultos (entre 20 e 79 anos) vivem com diabetes, sendo o DM1 responsável por 10% do total da população diabética. Estima-se que em 2045, o número chegará a 700 milhões de pessoas com a doença. Dos adultos com DM, 79% vivem em países de baixa e média renda e o maior número de pessoas possuem entre 40 e 59 anos, porém, mais de 1,1 milhão de crianças vivem com diabetes tipo 1, e 1 em cada 6 nascidos são afetados por DM durante a gravidez. Outro dado relevante é que 1 em cada 2 pessoas com diabetes (232 milhões) não são diagnosticadas. As causas de morte por DM nos últimos anos foram de 4,2 milhões de pessoas, levando a um custo de US\$760 bilhões em gastos com saúde.

1.2 DM1

O DM1 é uma doença autoimune crônica caracterizada por hiperglicemia, isto é, níveis elevados de glicose no sangue causada pela deficiência na produção de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas (KATSAROU et al., 2017). As células β pancreáticas produzem o hormônio insulina que facilita a absorção de glicose nas células, a fim de fornecer energia e também envolvidas em uma variedade de outras funções (TAN et al., 2019).

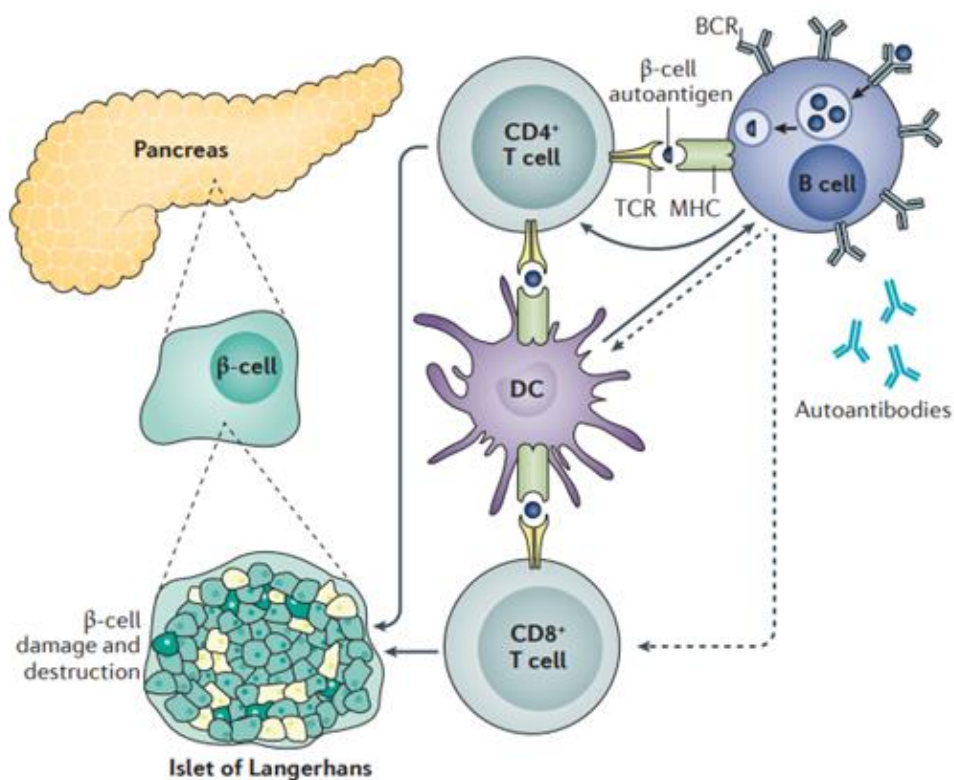


Imagem 1. Patogênese do DM1 (KATSAROU et al., 2017)

No DM1 as células B do sistema imune ativadas interagem com células T CD4+ e CD8+, bem como células dendríticas (DCs). A apresentação de antígenos por células B e DCs ativam células T específicas de células β . Além disso, a exposição das células B aos auto-antígenos das células β leva à produção de autoanticorpos alvejantes, que servem como biomarcadores de doenças assintomáticas (WONG, 2014), assim como na expressão da proteína HLA de classe I parece estar aumentada nas células β no DM1 (RICHARDSON et al., 2016). Porém, ainda falta determinar se há atividade crônica de baixo grau de inflamação mediada por células T nas ilhotas ou se há uma perda aguda de células β devido à infiltração de células inflamatórias logo antes da presença de autoanticorpos e disglucemia, isto é, se a perda da tolerância à glicose devido à secreção diminuída de insulina ao longo do tempo é devida somente à diminuição de células β ou também envolve células β disfuncionais (KATSAROU et al., 2017). Veja imagem 1.

Os autoanticorpos que foram relacionados ao DM1 e que podem ser utilizados como biomarcadores são GAD65 – glutamato descarboxilase; IA2 – proteína 2 associada ao insulinoma, encontrada na membrana das vesículas secretoras, e ZNT8 – transportador de

zinco, transporta íons de zinco do citoplasma para o interior das vesículas secretoras, tendo os três a insulina como alvo (KATSAROU et al., 2017). Portanto, indivíduos que tem genótipos específicos de HLA (antígeno leucocitário humano), HLADR E HLADQ possuem um risco maior de desenvolver dois ou mais dos autoanticorpos associados ao desenvolvimento de DM1(KATSAROU et al., 2017). Apesar de saber quais anticorpos estão relacionados à doença, ainda é incerto as causas que levam à autoimunidade direcionada às células β pancreáticas, que pode ser uma combinação de fatores ambientais e genéticos.

Existe um estadiamento do DM1, classificado como pré sintomático quando há um declínio da população de células β , porém sem sintomas, ou sintomático, quando ocorre perda de peso, sede, fome, poliúria, causados pelo quadro de hiperglicemia (KATSAROU et al., 2017). Pode também ser subdividido em três estágios: o estágio 1 que se caracteriza pela presença de autoanticorpos e ausência de disglucemia, enquanto no estágio 2 a disglucemia aparece, e por último o estágio 3, onde haverá além de autoanticorpos e disglucemia a presença de sintomas (KATSAROU et al., 2017), conforme apresentado na imagem 2. No estudo TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young) a taxa de incidência do DM1 no estágio 3, cinco anos após a soroconversão, isto é a idade mais precoce em que um autoanticorpo específico for detectado, foi de 11%, 36% e 47% naqueles com um, dois e três autoanticorpos respectivamente (REWERS et al., 2018). Já em outro estudo que analisa a taxa de progressão para o estágio 1 de DM1, em crianças de alto risco com autoanticorpos, encontrou 44%, 70% e 84% aos 5, 10 e 15 anos de seguimento (ZIEGLER et al., 2013). A progressão de um para mais autoanticorpos ocorre mais comumente em 2 a 4 anos após a detecção do primeiro autoanticorpo, no entanto, não se sabe se essa progressão semelhante é verdadeira para pacientes mais velhos (KATSAROU et al., 2017). Como o aparecimento de autoanticorpos insulínicos é raro antes dos 6 meses de idade, é provável que exposições ambientais antes de 1 ano sejam relevantes para a etiologia da imunidade à insulina (ZIEGLER et al., 2013).

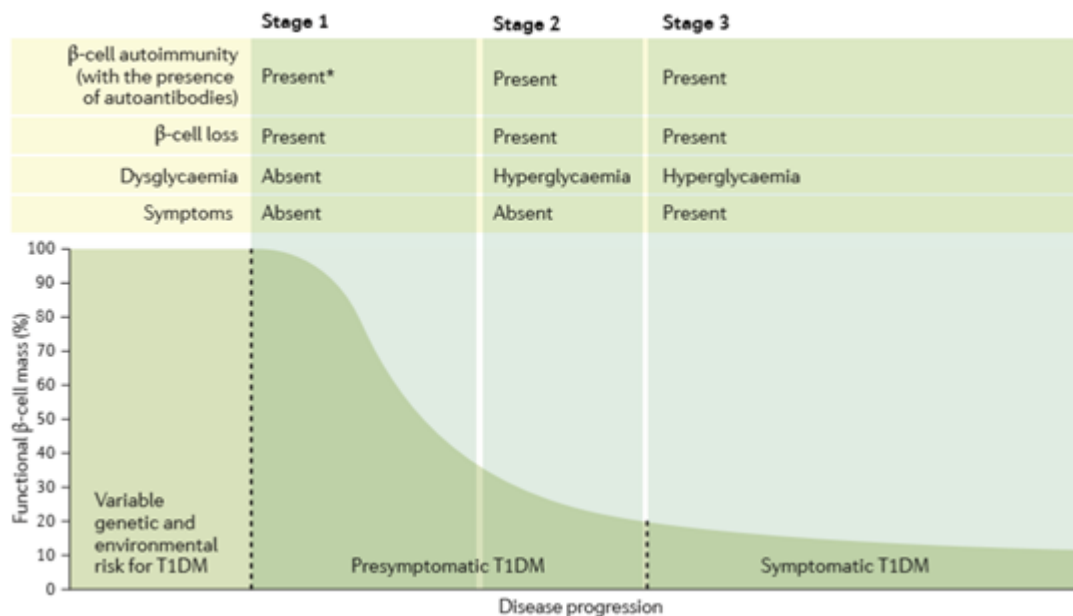


Imagem 2. Estadiamento do DM1 (KATSAROU et al., 2017)

É mais comum o aparecimento da doença no período da infância e adolescência, ocorre na vida adulta, porém em menor número, contudo, esse dado pode ser resultante de um diagnóstico tardio, dependendo do país e suas condições socioeconômicas (KATSAROU et al., 2017). As diferenças na incidência de DM1 difere entre países não só por condições socioeconômicas, mas também associado às condições genéticas e ambientais (International Diabetes Federation, 2020). Os fatores ambientais possuem inúmeras influências, incluindo infecções virais, o momento da introdução alimentar, eventos gestacionais como infecções, entre outros. Como exemplo pode-se citar um estudo sobre a incidência de doenças autoimunes e alérgicas e a relação destas com a higiene, comparado às populações da Rússia e Finlândia, onde os riscos genéticos são os mesmos. Mostrou que a autoimunidade direcionada às células β variam conforme o ambiente, dado que infecções e imunidade da população diferem, pois na Rússia, as crianças que tinham histórico de várias infecções apresentaram um risco menor para desenvolver autoimunidade direcionada às células β (KONDRASHOVA et al., 2013).

Quanto aos fatores genéticos, sabe-se que os principais fatores de risco genético são os haplótipos HLA de classe II, HLA - DR3 - DQ2 e HLA - DR4 - DQ8 no cromossomo 6. O risco de desenvolver autoimunidade direcionada a células β no haplótipo HLADRDQ estendido é complicado por um grande número de alelos HLA-DRB1 em humanos. No entanto, esses fatores de risco genéticos apesar de comuns nas populações ocidentais, têm

baixa incidência, o que pode explicar por que muitas pessoas não desenvolvem autoimunidade ou DM1 apesar de possuírem esses fatores de risco (KATSAROU et al., 2017).

Pessoas com DM1 têm um risco de duas a quatro vezes maior de morte, principalmente devido a causas cardiovasculares (LIND et al., 2014). A longo prazo se não tratado com eficácia a partir de dieta e insulinoaterapia, pode levar a complicações micro e macrovasculares, como nefropatia, neuropatia e retinopatia; doença cardíaca coronária, cerebrovascular e arterial periférica, respectivamente (KATSAROU et al., 2017), assim como a função cognitiva também pode ser afetada pela hiperglicemia (BECKMAN et al., 2013) (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL/EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS STUDY RESEARCH GROUP et al., 2007).

Um dos efeitos patogénéticos da hiperglicemia resultam da superprodução de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, que resulta em estresse oxidativo (BECKMAN et al., 2013), conforme imagem 3, o estresse oxidativo resulta em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que têm efeitos na quebra de cadeias de DNA, onde polímeros de ADP-ribose modificam a atividade da gliceraldeído-3-desidrogenase (GAPDH), bloqueando-a e, conseqüentemente, desviando intermediários glicolíticos para a sinalização patogénética. Assim como a formação de AGEs - produtos finais de glicação avançada (KATSAROU et al., 2017). Os AGEs têm um papel patogénético no desenvolvimento e progressão de diferentes doenças de base oxidativa, incluindo diabetes, aterosclerose e distúrbios neurológicos (VISTOLI et al., 2013). Podem ser formados a partir do DNA, proteína ou de lipoproteínas (AHMAD et al., 2018) através de reações não enzimáticas (VISTOLI et al., 2013, AHMAD et al., 2018, 2018). Alguns dos efeitos biológicos são devidos à perda de função das proteínas alvo que sofrem modificação covalente, como no caso do colágeno que quando sofre glicação leva ao espessamento vascular e, portanto, uma elasticidade diminuída, hipertensão e disfunções endoteliais (VISTOLI et al., 2013). A glicação também pode afetar peptídeos de vida curta, como no caso da insulina nas células β pancreáticas em modelos de animais diabéticos (VISTOLI et al., 2013). Além disso, exercem efeitos pró-inflamatórios ativando cascatas de sinalização por meio de receptores específicos denominados RAGE (receptor para AGEs) (AHMAD et al., 2018).

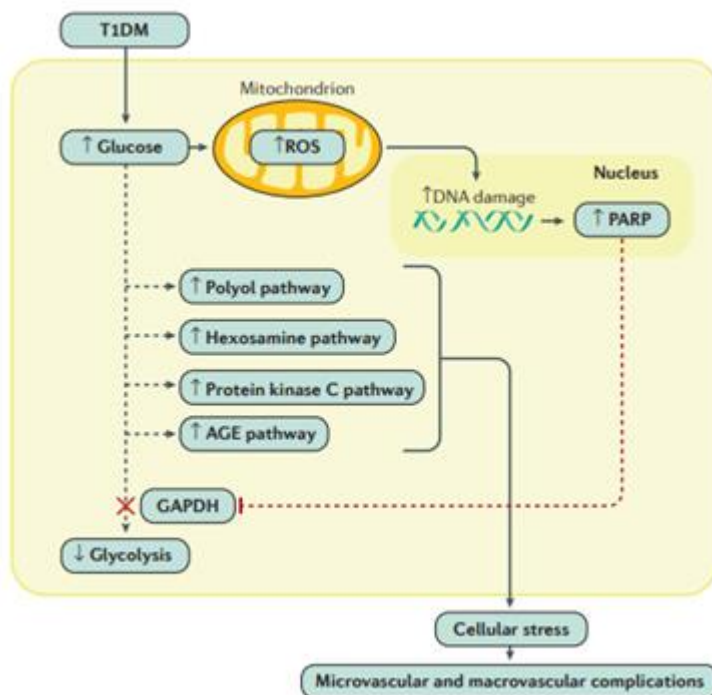


Imagem 3. Mecanismos de dano celular induzido por hiperglicemia (KATSAROU et al., 2017).

O mecanismo de formação de AGEs ainda é debatido, porém há duas vias que estão bem estabelecidas, veja imagem 4. A primeira via envolve rearranjos irreversíveis dos produtos Amadori seguindo ambas as vias oxidativas e não oxidativas. A segunda rota envolve a condensação entre a cadeia lateral de resíduos de lisina, cisteína e arginina e dicarbonilas, que podem ser gerados pela enolização de produtos Amadori, bem como pela degradação direta de aldoses e cetoses. A formação de AGEs é comum no processo de envelhecimento, inclusive é um dos principais e mais predominantes fatores responsáveis. A glicação em bases de DNA e RNA pode ser influenciada pelos mesmos fatores que influenciam a glicação de proteínas (DUTTA; COHENFORD; DAIN, 2005). Foi demonstrado que o DNA ligado está relacionado à muitas anormalidades fisiológicas, como a nefropatia diabética aterosclerose, e distúrbios neurológicos, como a doença de Alzheimer (AHMAD et al., 2018). Embora o enfoque seja em AGEs formados endogenamente, a ingestão alimentar de AGEs derivados de alimentos (reação de Maillard) também pode contribuir significativamente para a carga corporal total (VISTOLI et al., 2013).

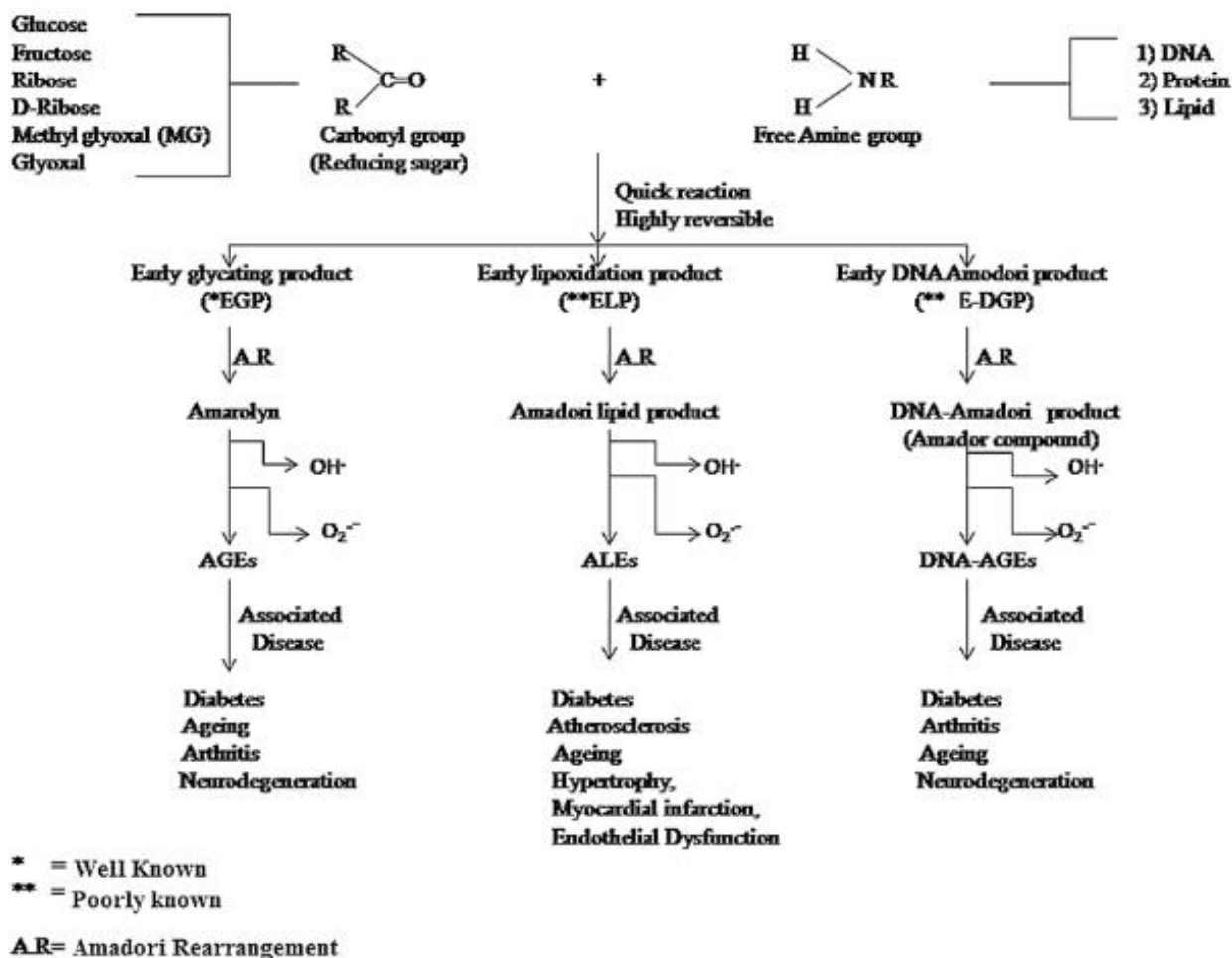


Imagem 4. Representação esquemática da provável via de macromoléculas reagindo com açúcares redutores para formar AGEs/ALEs e DNA-AGEs (AHMAD et al., 2018)

1.3 Déficit cognitivo no diabetes

A cognição inclui um conjunto de funções mentais, como atenção, aprendizado, concentração, memória, raciocínio, feedback verbal, resolução de problemas e tomada de decisão (MCCRIMMON; RYAN; FRIER, 2012). A função cognitiva, principalmente a memória, diminui com a idade, no entanto, pacientes com DM1 acabam reduzindo a capacidade nas áreas cognitivas já nos primeiros anos da doença (BRANDS et al., 2005). A maioria dos testes cognitivos examinam a capacidade do participante de responder rapidamente e a lentidão mental é considerada o déficit cognitivo fundamental associada ao DM1 (MCCRIMMON; RYAN; FRIER, 2012), portanto, a desaceleração mental tem sido considerada o déficit cognitivo primário associado ao DM1 em pacientes jovens e idosos. A gravidade é afetada pela idade de início e pela duração da doença (SHALIMOVA et al.,

2019), sendo também fortemente associada à presença de retinopatia proliferativa e neuropatia autonômica (MOHEET; MANGIA; SEAQUIST, 2015). Dados transversais indicam que pacientes com DM1 entre 30 e 40 anos de idade, já podem apresentar comprometimentos cognitivos em áreas como habilidade geral, eficiência psicomotora e flexibilidade cognitiva (SMOLINA; WOTTON; GOLDACRE, 2015). Alguns estudos mostram que em crianças e adolescentes já pode ser observado algum grau de déficit cognitivo (DAHLQUIST; KÄLLÉN, 2007), tendo inclusive efeitos mais pronunciados conforme início mais precoce do DM1 (BIESELS et al., 2005). Sabendo que o envelhecimento leva ao declínio cognitivo, e que pacientes com DM1 acabam sendo mais propensos a desenvolver demência ou mesmo Doença de Alzheimer (SHALIMOVA et al., 2019)

Há vários fatores que contribuem para o desenvolvimento da disfunção cognitiva em pacientes com diabetes, tanto DM1 quanto DM2, entre eles estão fatores metabólicos: hiperglicemia crônica, hipoglicemia aguda, hipoglicemia recorrente, glicação proteica, alterações no metabolismo e transporte de glicose; fatores vasculares: doença microvascular, doença macrovascular, disfunção endotelial, inflamação, dislipidemia; fatores endócrinos: sensibilidade à insulina reduzida; hiperinsulinemia; desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; aumento do hormônio antidiurético, hiperleptinemia, alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Fatores do sistema nervoso central (SNC): predisposição genética, disposição amiloide, estresse oxidativo, alterações na homeostase neuronal do cálcio e depressão (MCCRIMMON; RYAN; FRIER, 2012)

Históricos de hiper e/ou hipoglicemia levam a lesões micro e macrovasculares que por sua vez podem desencadear disfunção cognitiva. A hiperglicemia crônica pode desencadear mecanismos que promovem dano neuronal e disfunção endotelial, que, juntos, poderiam resultar no desenvolvimento de disfunção cognitiva ao longo do tempo (SHALIMOVA et al., 2019). Outra correlação positiva ocorre entre hiperglicemia crônica e disfunções microvasculares como nefropatia, retinopatia e neuropatia (MUKHERJEE et al., 2008). Evidências mostram que a hipoglicemia aumenta o risco cardiovascular, sendo que entre as doenças cérebro vasculares o acidente vascular cerebral é a causa mais comum de demência, e esse risco aumenta em 115% para cada aumento de 1% na HbA1c (MCCRIMMON; RYAN; FRIER, 2012). Doenças cérebro vasculares podem ser potencializadas por hipertensão e um alto índice de massa corporal, fatores que são preditores

de problemas cognitivos em adultos com DM1. Pelo aumento da expressão de citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-6 e TNF- α) e subsequente inflamação crônica, que exacerba disfunção cognitiva (SATO; MORISHITA, 2013); por fatores genéticos como alelo 4 da apolipoproteína E (APOE) que é fator de risco já documentado para doença de Alzheimer tardia (DA), e quando positivo em pacientes com DM1 a probabilidade de desenvolver DA aumenta (BRUCE et al., 2008). Uma meta-análise de 14 estudos confirmou que o diabetes aumenta o risco de DA (FERGUSON et al., 2003), sendo que na maioria dos casos, a DA e a demência vascular coexistem.

Apesar de não haver um entendimento unificado das ligações patogenéticas celulares e moleculares entre o diabetes e a DA, vários mecanismos podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da demência vascular e da DA, estes incluem: alta concentração de glicose, que tem efeitos tóxicos nos neurônios cerebrais através de insultos osmóticos e estresse oxidativo; melhoria na formação de AGEs, tendo efeitos potencialmente tóxicos em neurônios; e aumento na liberação de citocinas inflamatórias que podem ser neurotóxicas (SHALIMOVA et al., 2019). Episódios recorrentes de hipoglicemia grave foram associados a piores resultados em testes cognitivos, no entanto, o relacionamento entre hipoglicemia e declínio cognitivo é mais controverso. Uma das hipóteses é que a hipoglicemia possa induzir uma resposta antioxidante dependente do fator 2 (Nrf2) do fator nuclear E2 no hipocampo, que neutraliza os danos oxidativos que levam à disfunção cognitiva através de uma resposta patológica ao estresse oxidativo (MCNEILLY et al., 2016).

Além da hipo e hiperglicemia há fatores que também podem contribuir para disfunção cognitiva, como depressão, mas também pela própria percepção e relação com a doença e autocuidado que pode ficar prejudicado. O autocuidado é outro preditor para agravos nas disfunções cognitivas, pois afeta a capacidade do paciente no processo de monitorização dos níveis de glicose e ajuste de insulina (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020).

Existem algumas técnicas de neuroimagem que são frequentemente utilizadas para avaliar déficit cognitivo, entre elas estão a encefalografia, a ressonância magnética estrutural e funcional (RM) e a imagem tensorial de difusão (DTI), estas técnicas avaliam alterações na função e estrutura cerebral (SHALIMOVA et al., 2019). Um estudo baseado em tomografia por emissão de fóton único (SPECT), realizado com pacientes com DM1, documentou variações regionais na perfusão cerebral no cerebelo, lobo frontal e na região frontotemporal (SALEM et al., 2002). Essas alterações foram associadas ao mau controle glicêmico e

complicações microvasculares como retinopatia. Em um estudo usando técnicas morfométricas baseadas em voxel foi documentado uma redução na densidade de massa cinzenta em várias regiões do cérebro em pacientes com DM1, incluindo no hemisfério esquerdo o cíngulo posterior, o hipocampo e o giro temporal superior e o giro parahipocampal direito, sendo que essas regiões são responsáveis pelo processamento da linguagem, memória e atenção (MUSEN et al., 2006). Alterações na substância branca também foram observadas em um estudo com adultos de meia idade com DM1, usando a técnica DTI, demonstraram lesões parciais de substância branca (em particular, raios coronários posteriores e radiação óptica), que se correlacionaram com aumentos tanto no tempo da doença quanto nos níveis de HbA1c, com diminuição em tarefas cognitivas (MCCRIMMON; RYAN; FRIER, 2012). Embora tais técnicas sejam efetivas na avaliação de déficits cognitivos, falta um método preciso para a detecção e avaliação precoce dos fatores de risco para progressiva perda de volume cerebral na idade adulta e para proteção contra declínio cognitivo a longo prazo (SHALIMOVA et al., 2019).

Ainda não existe um padrão para melhora no desfecho de déficits cognitivos, mas se sabe que um bom controle glicêmico, redução de doenças vasculares, exercícios físicos regulares, dieta, acompanhamento ambulatorial, amparo familiar, são positivos para minimizar os efeitos cognitivos causados pelo DM1 (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020).

1.4 Terapias para DM1

A terapia vigente e eficaz atualmente ainda é a insulino terapia. Sua administração exógena aumenta significativamente a expectativa de vida e ajuda a normalizar a glicose no sangue, no entanto, a falta de uma resposta fisiológica leva a episódios de hiperglicemia, que são a causa das complicações. As injeções de insulina podem causar lipodistrofia, bem como episódios de hipoglicemia, um dos piores efeitos colaterais desse tratamento (AGHAZADEH; NOSTRO, 2017). Além disso, demanda alto monitoramento e adesão do paciente, apesar de já existirem sistemas tecnológicos favoráveis para maior independência e ajustes automáticos nos níveis de glicose sanguínea como é o caso das bombas computadorizadas. Nesse sentido surgem como alternativa outras terapias na tentativa de induzir a regeneração de células β para produção de insulina, forma mais orgânica quando comparada à insulino terapia (ROMER; SUSSEL, 2015). Dentre as terapias alternativas

podemos citar o transplante total do pâncreas, das ilhotas pancreáticas, terapia genética, e a terapia celular com uso de células tronco (CT) (AGHAZADEH; NOSTRO, 2017).

Na terapia com transplante total de pâncreas ou das ilhotas, apesar de ser promissor por diminuir ou não ser necessário uso de insulina, este efeito benéfico é limitado, pois o paciente continua desenvolvendo autoanticorpos e pode desenvolver rejeição ao enxerto. Devido ao uso obrigatório de imunossuppressores, corticosteroides e agentes antiinflamatórios ocorrem efeitos colaterais diabetogênicos e nefrotóxicos, assim como um risco aumentado para infecções e tumores, além da oferta limitada de doadores e custos elevados (CHHABRA; BRAYMAN, 2013). Foi mostrado que após a depleção das células β no DM1, o aumento da proliferação das células β remanescente contribui para a regeneração das mesmas (BONNER-WEIR et al., 2010). Essa afirmação foi estendida para células produtoras de insulina (CPIs), portanto, a transdiferenciação (processo de conversão de uma célula diferenciada para outra, baseada na reprogramação de células para regenerar novas células) de células progenitoras pancreáticas em células β betas tem sido alvo de vários estudos (KIM; LEE, 2016).

As CT são células indiferenciadas que estão presentes nas fases embrionária, fetal e adulta da vida, são os blocos de construção de tecidos e órgãos. Nas fases pós-natal e adulta, as CT específicas de tecido são encontradas em órgãos diferenciados e são necessárias no reparo após lesão do órgão. As principais características das CT são: (a) auto-renovação (a capacidade de proliferar extensivamente), (b) clonalidade (geralmente decorrente de uma única célula), e (c) potência (a capacidade de se diferenciar em células diferentes tipos) (KOLIOS; MOODLEY, 2013). Algumas das células progenitoras que contribuíram para a formação de órgãos não se diferenciam terminalmente, mas são retidas como CT do tecido e podem ser encontradas na medula óssea, osso, sangue, músculo, fígado, cérebro, tecido adiposo, pele e trato gastrointestinal (DENHAM et al., 2005). A dinâmica das CT do tecido ou das células progenitoras variam de tecido para tecido, por exemplo, na medula óssea, fígado, pulmão e intestino, as CT se proliferam regularmente para atender a rotatividade normal ou uma lesão (LANE; RIPON; BISHOP, 2007), enquanto no pâncreas, no coração ou no sistema nervoso, elas se proliferam para substituir as células danificadas (LODI; IANNITTI; PALMIERI, 2011).

Todas as CT podem ser categorizadas de acordo com seu potencial de diferenciação em 5 grupos: totipotentes ou onipotentes, pluripotente, multipotente, oligopotente e

unipotente, veja imagem 6 (KOLIOS; MOODLEY, 2013). As células totipotentes ou onipotentes são as células mais indiferenciadas e são encontradas no início do desenvolvimento. As CT pluripotentes são capazes de se diferenciar em células que surgem das três camadas germinativas - ectoderma, endoderma e mesoderma - a partir do qual todos os tecidos e órgãos se desenvolvem. Células somáticas que sofrem reprogramação são chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (CTPIs) e compartilham características semelhantes com as células endoteliais. As CT multipotentes são encontradas na maioria dos tecidos e se diferenciam em células de uma única camada germinativa (KOLIOS; MOODLEY, 2013). As células-tronco mesenquimais (MSCs) são as mais reconhecidas células multipotentes. Podem ser derivadas de uma variedade de tecido, incluindo medula óssea, tecido adiposo, osso, sangue, cordão umbilical, entre outros (AUGELLO; KURTH; DE BARI, 2010).

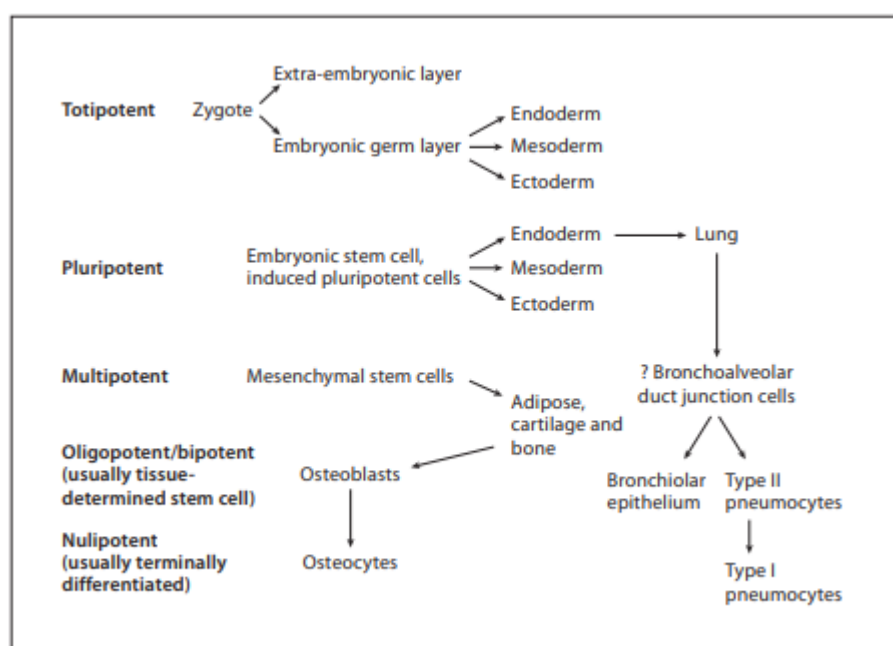


Imagem 5. Hierarquia das células-tronco (KOLIOS; MOODLEY, 2013)

A terapia com CT oferece uma solução para os desafios do transplante de ilhotas, pois apresentam um potencial regenerativo intrínseco e imunológico, além de habilidades imunomodulatórias onde conseguem interromper a destruição parcial de células β , apresentando uma abordagem inovadora para a cura de doenças auto-imunes (WU et al., 2020) Além do potencial regenerativo que pode ser aproveitado para disponibilizar um suprimento de auto reposição de CPIs responsivas à glicose, suas propriedades imunomoduladoras também podem ser usadas para prevenir, interromper ou reverter a

autoimunidade, melhorar a rejeição de enxerto e prevenir a recorrência da autoimunidade. (CHHABRA; BRAYMAN, 2013). Portanto, essa capacidade de se diferenciarem em tipos de células especializadas pode ser aproveitada para reposição de CPIs responsivas à glicose em transplantes, assim como preservar a massa celular residual e facilitar a regeneração celular endógena. Recentemente MSCs foram diferenciadas em tecido neuronal que é derivado do ectoderma, exemplo de transdiferenciação, quando uma célula de uma camada germinativa (mesoderme) se diferencia em tecido neuronal (ectoderme) (BARZILAY; MELAMED; OFFEN, 2009). As CT oligopotententes são capazes de se auto-renovar e formar duas ou mais linhagens dentro de um tecido específico. As CT hematopoéticas são um exemplo típico de CT oligopotententes, pois podem se diferenciar em linhagens mielóides e linfóides. As CT unipotententes podem se auto-renovar e se diferenciar em apenas um tipo específico de célula e formar uma única linhagem como as CT musculares, dando origem ao músculo maduro (CHHABRA; BRAYMAN, 2013)

Nesse sentido, as MSCs parecem mais atraentes para o transplante em DM1, pois sua disponibilidade de tecido de doador humano é abundante. Oferece mínimo desconforto, têm-se alto rendimento de CT e capacidade de proliferação, assim como de secretar fatores angiogênicos, antiapoptóticos, antiinflamatórios e antifibróticos e promover a cicatrização de feridas e o reparo de tecidos, além de sua comprovada capacidade pré-clínica de se diferenciar em CPIs responsivas a glicose (CHHABRA; BRAYMAN, 2013).

Recentemente, tem sido evidenciada a terapia genética como um campo promissor no tratamento de DM1, técnicas virais como lentivírus, adenovírus e AAV (vírus adeno associados) e técnicas não virais, como lipossomas e DNA tem sido usado para a entrega do gene da insulina em diferentes tecidos, como pâncreas, fígado, adipócitos e músculos (WONG; HAWTHORNE; MANOLIOS, 2010). Os vetores AAV utilizados através da co-expressão de insulina e genes de glucoquinase em músculos esqueléticos causam resposta imunológica moderada e infectam células em divisão e inativas sem integração com o genoma da célula hospedeira (TAN et al., 2019). O aumento da enzima glucoquinase atua como sensor de glicose detectando os níveis de glicose no sangue, refletindo na quantidade de insulina produzida para atingir a normoglicemia (ROMER; SUSSEL, 2015). Em modelos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) e injeção de plasmídeo no fígado e músculo mostrou normoglicemia por uma semana e trinta semanas, respectivamente (TAN et al., 2019). Novas classes terapêuticas têm sido estudadas, incluindo análogos do peptídeo

inibidor gástrico (GIP), análogos de amilina, miméticos da incretina, receptor ativado de proliferador de peroxissoma (PPAR), inibidores de dipeptidil peptidase-4 (DPP4). Células intestinais, como células K enteroendócrinas, mostraram muitas semelhanças com as células beta pancreáticas, produzindo polipeptídeo insulínico (GIP) contribuindo para conversão de pró-hormônios que são cruciais para o processamento da pró-insulina (AHMAD et al., 2012).

1.4 Células Estromais Mesenquimais (MSCs)

As MSCs têm demonstrado um grande potencial terapêutico por suas propriedades imunomodulatórias, onde têm emergido como reguladoras da resposta imune (FORBES et al., 2014). Estas células apresentam grande plasticidade e multipotencialidade, podendo ser isoladas de diferentes órgãos e tecidos, incluindo medula óssea, músculo, tecido adiposo, e ainda órgãos de origem materno-fetal (HASS et al., 2011). Quando nas condições ideais, as MSCs possuem a capacidade de diferenciação em tecidos como cartilagem, osso, tendões/ligamentos e músculo (BIELBY; JONES; MCGONAGLE, 2007). Para que estas células possam ser identificadas como MSCs, elas devem expressar marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR. Além disso, as MSCs devem ser aderentes e ter capacidade de diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

As MSCs são conhecidas por apresentar baixa imunogenicidade, sendo capazes de “escapar” do reconhecimento por células T devido à baixa expressão de HLA de classe I e ausência de HLA de classe II e de moléculas co-estimulatórias (FORBES et al., 2014). Secretam uma variedade de fatores tróficos que atuam no reparo tecidual, inibindo a fibrose, a apoptose e a transmigração de leucócitos. Também atuam estimulando a angiogênese, a proliferação e/ou diferenciação de células progenitoras intrínsecas do tecido lesado, e a proliferação de células T regulatórias (CAPLAN; DENNIS, 2006).

Estas moléculas bioativas secretadas pelas MSCs podem atuar de forma direta ou indireta, promovendo a sinalização intracelular da célula alvo ou agindo sobre as células vizinhas para que as mesmas secretem agentes funcionalmente ativos (CAPLAN; DENNIS, 2006). Entre os fatores solúveis liberados está aIDO, que atua inibindo a proliferação de linfócitos T pela diminuição do aminoácido essencial triptofano e pela indução de metabólitos reguladores do sistema imune (REN et al., 2009). Também a IL-6, a qual auxilia

na inibição da diferenciação de monócitos em células dendríticas (DJOUAD et al., 2007) e a IL-10, que atua inibindo a resposta de células T por alterações provocadas na função de células apresentadoras de antígenos (BEYTH et al., 2005). Além de inibir a diferenciação de células Th17 (QU et al., 2012); e ainda a PGE2, que estimula a proliferação de células Treg (ENGLISH et al., 2009) enquanto inibe a proliferação de células NK (SPAGGIARI et al., 2008) representado na imagem 7.

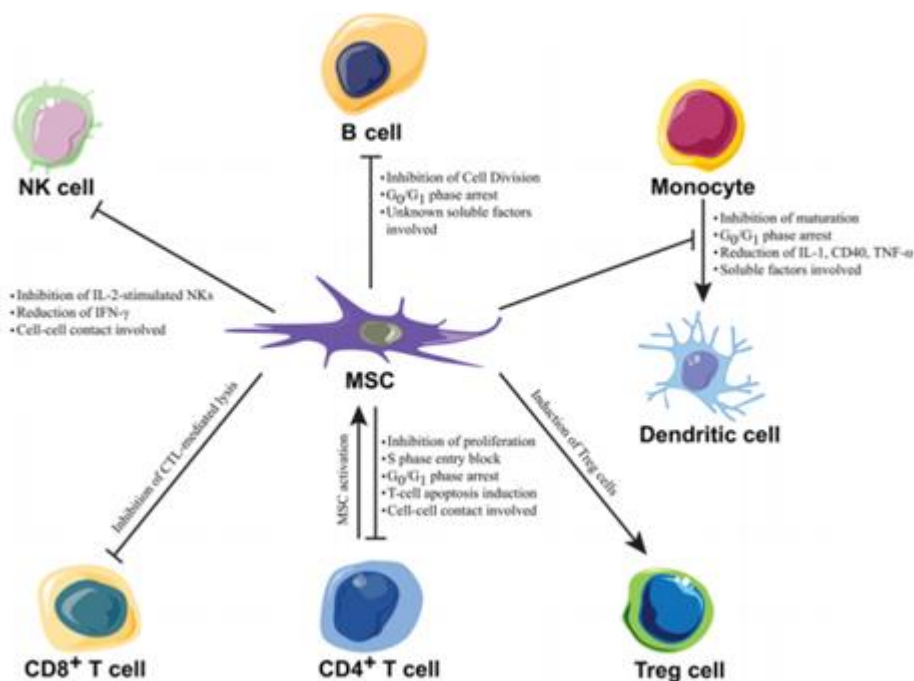


Imagem 6. Efeitos imunomoduladores das MSCs nas células do sistema imunológico. Os efeitos imunomoduladores de MSCs incluem supressão da proliferação de células T, indução de células T reguladoras, influenciando a maturação e função das células dendríticas. Supressão da proliferação de células B e diferenciação terminal e inibição da função das células NK(YI; SONG, 2012).

1.3 Migração de MSCs

O processo migratório das MSCs é dependente da relação entre as quimiocinas liberadas por células do local de injúria e os receptores presentes na membrana das MSCs. O recrutamento das MSCs ocorre por quimiotaxia, ou seja, a migração direcionada em resposta ao gradiente de quimioatratores (fatores de crescimento e quimiocinas). Um dos receptores mais estudados é o CXCR4, responsável pela quimioatração ao SDF-1 (stromal derived factor-1) (SOHNI; VERFAILLIE, 2013).

A terapia com MSCs necessita da migração das células até o local de injúria (processo também conhecido como homing) (SOHNI; VERFAILLIE, 2013). A migração celular é um processo complexo que envolve o movimento do citoesqueleto de actina e a indução da polarização celular. Este movimento é caracterizado pela polimerização de actina e formação de adesões nascentes na parte anterior da célula, maturação das adesões celulares, contratilidade do corpo celular e a soltura na parte posterior da célula (LI; GUNDERSEN, 2008). A migração celular depende da ativação de uma série de vias de sinalização que resultam na quebra da assimetria celular, onde uma célula mais alongada é correlacionada a uma migração mais efetiva e a presença de lamelipódios indica uma célula em movimento (FRIEDL; ALEXANDER, 2011).

A cascata de adesão do homing de leucócitos é bem caracterizada, mas o mesmo não ocorre com as MSCs. Falta esclarecimento de um mecanismo envolvendo a migração de MSCs, pois é incerto o posicionamento das MSCs após sua infusão, o que torna mais difícil determinar se as células são capturadas entre os vasos ou se realizam a migração transendotelial, assim como os leucócitos (KARP; LENG TEO, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Este estudo faz parte de um estudo anterior onde se avaliou a estratégia de proteção putativa contra o hipocampo em um modelo de rato DM1, induzido por STZ. Nele, MSCs derivadas do tecido adiposo foram obtidas, diferenciadas em células produtoras de insulina (CPIs) e, posteriormente, implantadas em dois locais, subcapsular renal (SR) e subcutâneo (SC). Ambos os implantes melhoraram a hiperglicemia, no entanto o grupo SC apresentou melhora no comprometimento cognitivo em 3 semanas após indução do DM1, (avaliado pelo teste de reconhecimento de objetos) e modulação da reatividade astrogliar do hipocampo (avaliado por S100B e GFAP). Posteriormente, foram utilizadas células GFP + para analisar a sobrevivência das células nos locais dos implantes, dado que foi confirmado, bem como foi observada sua migração para o pâncreas e hipocampo. Trabalho em que também participei e foi publicado em artigo, intitulado: *Insulin-producing cells from mesenchymal stromal cells: Protection against cognitive impairment in diabetic rats depends upon implant site* (WARTCHOW et al., 2020). O presente estudo tem como justificativa avaliar o efeito positivo da proteção putativa contra danos na cognição de forma crônica, após sete semanas do implante na região do SC em animais induzidos por STZ, e avaliar se os efeitos benéficos observados na fase aguda são permanentes.

3. OBJETIVO

Avaliar a estratégia de implantação de CPIs na região subcutânea obtidas a partir de MSCs do tecido adiposo, para investigar sua possível proteção contra danos no hipocampo após oito semanas com um modelo de DM1 em ratos.

4. METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados ratos Wistar Kyoto (WKY) machos de oito semanas de idade, para isolamento da MSCs derivadas do tecido adiposo e para o modelo de DM1. Os animais foram mantidos em um ciclo de luz/escuridão constante de 12h, a uma temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 50-60% de umidade relativa. Colocados em grupos de quatro animais em gaiolas padrão com acesso *ad libitum* à água potável e *pellets* de alimentos padrão. Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as diretrizes do Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, e todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (processo número 30626).

Produtos químicos

Estreptozotocina (STZ), soro fetal bovino (SFB), meio de cultura celular sintético (DMEM) e outros materiais para cultura de células foram adquiridos da Gibco BRL (Carlsbad, CA, EUA). Proteína S100B, anticorpo anti-S100B (SH-B1), o-fenilenodiamina (OPD), anticorpo anti-S100B (clone SH-B) foram adquiridos de Santa Cruz Biotecnologia (Santa Cruz CA, EUA). Outros reagentes foram adquiridos de fornecedores comerciais locais (Sulquímica e Labsul, Porto Alegre, Brasil).

Isolamento e expansão das células estromais mesenquimais (MSCs) derivadas do tecido adiposo.

Foi coletado tecido adiposo do epidídimo de ratos WKY e fragmentada em pequenos pedaços. Os fragmentos foram digeridos com 1,5 mg/mL de colagenase tipo I (Sigma) e diluídos em DMEM sem soro por 20 min a 37°C . SFB a 10% com 0,1 mg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina em DMEM foi adicionado para interrupção da atividade enzimática. Após centrifugação a 1500 rpm por 5 min, o sedimento foi ressuspenso

em DMEM com 10% de SFB e semeada em garrafa de cultura mantida em uma câmara úmida a 37° C /5% de CO₂ até a confluência das células. As células foram dissociadas das paredes da garrafa utilizando solução de tripsina-EDTA a 0,05%. Na quarta passagem as células foram utilizadas para os experimentos.

Diferenciação de células estromais mesenquimais MSCs em células produtoras de insulina (CPIs)

As células utilizadas foram cultivadas em triplicata em uma placa de 6 poços (TPP) até atingirem uma confluência de > 80% (~ 4 × 10⁵ células/mL). As células para controle foram cultivadas com DMEM sem soro. Para obter CPIs as células foram mantidas por 3 dias em meio de diferenciação com DMEM-F12 sem soro com 1% de penicilina/estreptomicina, suplementado com 10 nM de nicotinamida (Sigma), 10 ng / mL de ativina-A (Sigma) e 10 nM exendina-4 (Sigma, St. Louis, MO), protocolo padronizado por (WARTCHOW et al., 2019).

Modelo de DM1

Através de injeção intraperitoneal (IP) de estreptozotocina (STZ) (60 mg/kg em tampão citrato, pH 4,5), foi induzido DM1. Foram considerados diabéticos os animais com glicemia > 250 mg/dL. A indução do DM1 ocorre em até 48h após injeção de STZ.

Procedimento cirúrgico para implantação das CPIs

Os animais, ratos WKY, foram divididos em três grupos (8 ratos WKY machos por grupo). No grupo I (grupo Sham), os animais foram injetados com veículo via injeção IP e submetidos a todas as etapas cirúrgicas, exceto implante. Grupos II e III foi injetado STZ (60 mg/kg peso corporal) por meio de injeção IP mimetizando DM1. No grupo II os animais foram submetidos a todas as etapas cirúrgicas exceto implante. No grupo III os animais foram submetidos a todas etapas cirúrgicas e receberam o implante subcutâneo de CPIs (4 × 10⁶ células/rato) uma semana após indução do DM1. Todos animais no dia da cirurgia foram anestesiados com cetamina/xilazina (75 e 10 mg / kg, respectivamente, i.p.). O procedimento cirúrgico para implantação subcutânea das células CPIs consistiu de uma incisão (0,5 cm) longitudinal, na região cervical dorsal do animal, onde a pele foi separada do músculo subjacente usando uma pinça.

Controle da glicemia

Medições semanais de glicose no sangue foram feitas usando monitor de glicose (Accu-Chek Advantage II-Roche) em 20 μ L de sangue, coletados por meio da punção da porção distal da cauda dos animais com agulha de insulina.

Liberação de peptídeo C

A medição do teor de peptídeo C foi realizada usando ELISA (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante.

Medição de AGEs

Os AGEs foram medidos no soro por ELISA, conforme técnica descrita em (IKEDA et al., 1996) com algumas modificações. Os poços de uma placa foram revestidos com 0,1 μ g de proteína em 0,1mL de Tampão carbonato-bicarbonato 50 mM (pH9,6) overnight. Posteriormente, os poços foram lavados com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e depois incubados por 3h com 2% de albumina. Foram então lavados novamente e incubados com 100 μ L de anti-AGE (6D12) por 1h. Após lavagem, os poços foram incubados com 100 μ L de peroxidase conjugada à anticorpo secundário por 1h. A reatividade da peroxidase foi determinada por incubação com OPD por 30min. A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico (3M). As medidas de absorbância foram verificadas com 492nm. Os resultados foram calculados e expressos como uma porcentagem referente ao sham.

ELISA para S100B e GFAP

O conteúdo de S100B do hipocampo foi medido por ELISA (LEITE et al., 2008), 50 μ L de amostra mais 50 μ L de tampão Tris foram incubados por 2h em uma placa revestida com anti-S100B monoclonal (SHB1). O anti-S100B policlonal foi incubado por 30min e, em seguida, o anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase foi adicionado por mais 30min. A reação colorimétrica com o-fenilenodiamina foi medida em 492 nm. A curva padrão S100B variou de 0,020 a 10 ng/mL. O ELISA para GFAP (TRAMONTINA et al., 2007) hipocampal foi realizado revestindo a placacom amostras de 100 μ L contendo 30 μ g de proteína em 24h a 4°C. A incubação com um anti-GFAP policlonal de coelho por 2h foi seguido de incubação

com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 1h, à temperatura ambiente; a curva GFAP padrão variou de 0,1 a 10 ng/mL.

Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos (RO) é composto por três fases; habituação, treinamento e teste. Na fase de habituação os animais foram colocados na lateral da caixa de campo aberto (lado 50 cm) e deixados para explorar livremente a caixa durante 10 minutos. Após vinte e quatro horas da fase de habituação é iniciada a segunda fase, de treinamento, onde os animais são colocados na caixa na presença de dois objetos idênticos (A +A) para explorar durante 5 minutos. Uma hora após essa fase de treinamento, inicia-se a fase de teste, onde os animais são realocados na caixa para testar a memória de curto prazo (STM), onde um objeto é igual ao da sessão anterior e o outro é novo (A + B). Vinte quatro horas após, é realizada a segunda parte do teste onde é avaliada a memória de longo prazo. Nessa sessão o objeto B é substituído por um terceiro objeto C, mas o objeto A permanece (A + C). O índice de reconhecimento de cada teste é calculado por: tempo explorando o novo objeto/tempo explorando ambos os objetos. Definimos exploração quando o animal cheirava ou tocava o objeto com o nariz e/ou patas dianteiras. A caixa e os objetos foram limpos com etanol 70% em cada troca de animal.

Análise estatística

Avaliados estatisticamente pelo teste t de Student, seguido por Anova de duas vias. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativo. Todas as análises foram realizadas usando o Graphpad Prism versão 8 do software (La Jolla, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Glicose sanguínea e peso corporal

Os níveis de glicose sanguínea foram medidos semanalmente após indução de DM1 com STZ. Uma semana após indução os animais receberam o implante SC, com o propósito de avaliar sua eficácia na diminuição da glicemia. Pode-se observar que os níveis de glicose no grupo que recebeu o implante (SC), tiveram uma diminuição significativa uma semana após implante, quando comparado ao grupo STZ. Os níveis de glicose aumentaram novamente na segunda semana após implante, porém, ainda permaneceram abaixo dos níveis

do grupo STZ, no entanto sem significância. O grupo sham manteve seus níveis de glicose constantes e dentro dos parâmetros da normalidade (Figura 1A, $F_{(2, 21)} = 491.0$, $p < 0.0001$). Os animais foram pesados semanalmente desde a indução do DM1 até a oitava semana. Podemos observar uma redução de peso significativa da 5ª até a 8ª semana quando comparamos os grupos diabéticos (STZ, SC) com o grupo sham, que continuou ganhando peso (Figura 1B, $F_{(2, 13)} = 6.382$, $p = 0.0117$).

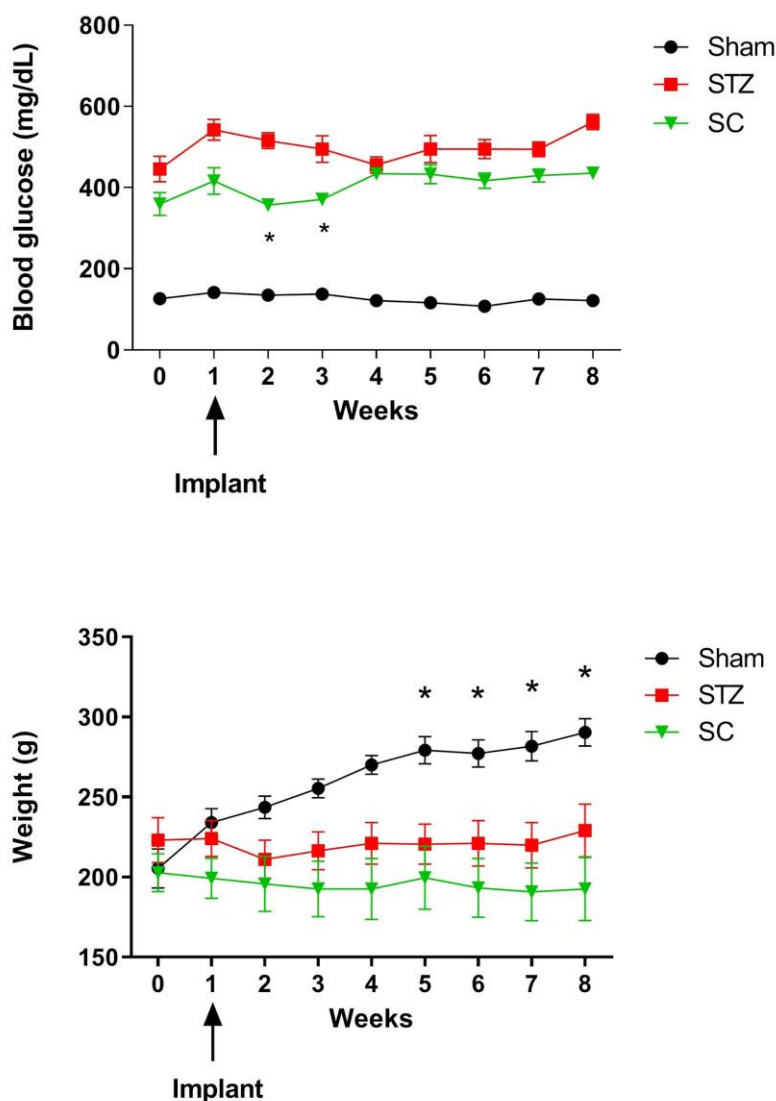


Figura 1. Avaliação temporal do modelo de DM1. A, medições de glicose no sangue antes e após o implante de CPIs. B, avaliação do peso corporal ao longo do tempo. Os dados são expressos como médias \pm SE ($n = 8$). Os * indicam diferentes grupos estatísticos por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey, assumindo $p < 0,05$.

4.2 AGEs e Peptídeo C

Para confirmar se houve secreção de insulina foi avaliado o peptídeo C sérico nos três grupos (Sham, STZ, SC) após 8 semanas do modelo. Podemos observar que os níveis de peptídeo C nos grupos STZ está bem reduzido e no grupo SC não foi detectável, quando comparados ao grupo Sham (Figura 2A. $F_{(2, 15)} = 6.326$, $p=0,0102$). Para avaliar a toxicidade da hiperglicemia foi avaliado o conteúdo de AGEs sérico. Encontramos um aumento nos níveis de AGEs nos dois grupos diabéticos (STZ e SC), quando comparados ao grupo Sham (Figura 1B, $F_{(2, 22)} = 34.73$, $p < 0,0001$).

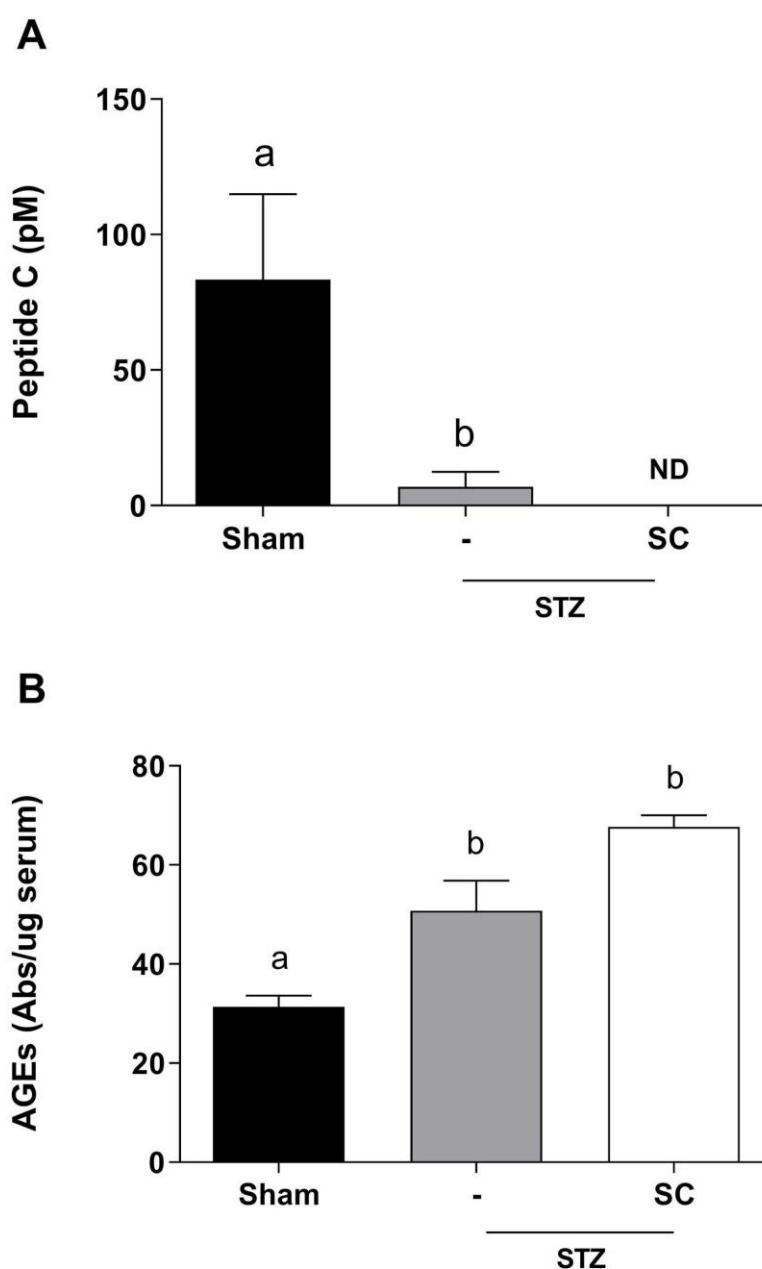


Figura 2. Parâmetros periféricos após oito semanas de modelo DM1. A, conteúdo no soro de peptídeo C e B, conteúdo de AGEs ambos medidos por ELISA após oito semanas da indução do modelo. Os dados são expressos como médias \pm SE (n = 8). As letras indicam diferentes grupos estatísticos por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, assumindo $p < 0,05$.

4.3 S100B e GFAP hipocampal

Tanto a proteína S100B quanto GFAP são marcadores astrocíticos de atividade e lesão cerebral. Na figura 3A ($F_{(2, 18)} = 1.816$, $p=0.1913$), temos as medidas para GFAP em 8 semanas após indução do DM1. Podemos perceber que em oito semanas não se observa diferença entre os três grupos. Avaliamos também o conteúdo de S100B em oito semanas, porém o implante não mostrou ter um efeito positivo (Figura 3B, $F_{(2, 23)} = 4.568$, $p=0.0214$).

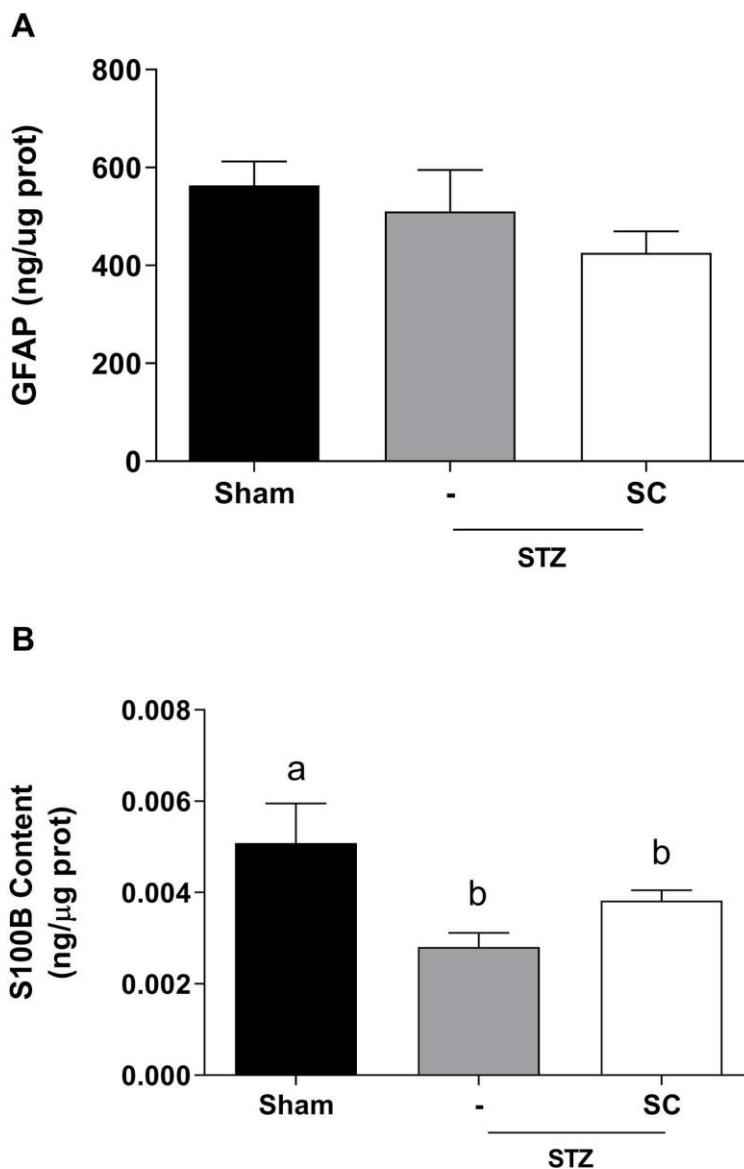


Figura 3. Alterações hipocâmpais no modelo DM1 com implantação de CPIs. Sete semanas após a implantação de CPIs, os hipocâmpos foram dissecados e os níveis de GFAP (A) e S100B (B) foram medidos por ELISA. As letras indicam diferentes grupos estatísticos por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey, assumindo $p < 0,05$.

4.4 Teste de reconhecimento de objetos (RO)

Os animais foram submetidos à avaliação cognitiva, usando o teste de reconhecimento de objeto novo (RO) na oitava semana após indução de DM1. O teste foi realizado em 1h para avaliar o desempenho cognitivo relacionado à memória de curto, e 24h para memória de longo prazo. Os resultados mostraram um déficit cognitivo nos animais diabéticos, no entanto

o implante com as CPIs não foi capaz de prevenir ou reverter esse efeito deletério tanto na memória de curto e longo prazo (Figura 4 A, Sham, $p=0.0188$; STZ, $p=0.7437$ e SC, $p=0.2028$ - e B, Sham, $p=0.0154$; STZ, $p=0.9589$ e SC, $p=0.3446$).

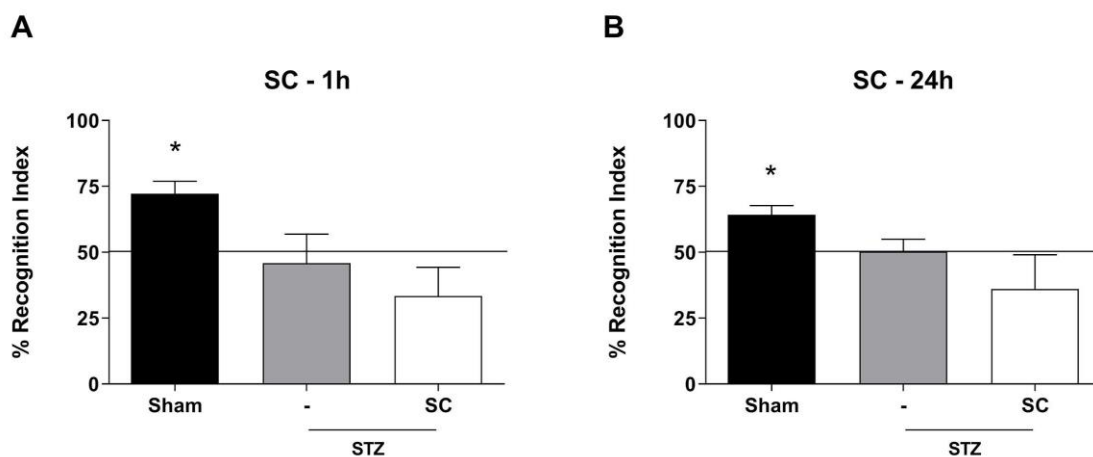


Figura 4. Avaliação do efeito do implante de CPIs por via SC sobre a cognição.

Os animais foram avaliados pelo teste de reconhecimento de objetos, sete semanas após sete semanas do implante celular. O índice de reconhecimento de objeto 1 hora (A) e 24 horas (B) após a fase de treinamento. * indicam grupos estatísticos diferentes em relação a 50% pelo teste t-student, assumindo $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Sabendo que o DM1 atinge mais de 46 milhões de pessoas no mundo, que ainda não existe cura para essa doença e que a longo prazo pode levar à déficits cognitivos, faz-se necessário mais estudos nessa área a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, o fato de o diabetes estar associado a maiores taxas de hospitalizações, maior utilização dos serviços de saúde, bem como maior incidência de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, cegueira, insuficiência renal e amputações não traumáticas de membros inferiores, acarreta em uma carga para os sistemas de saúde de todos os países. O controle metabólico é apontado como a pedra angular do manejo do diabetes, pois alcança um bom controle, reduz o risco de complicações microvasculares e pode, também, minimizar as chances de doenças cardiovasculares (NATHAN; DCCT/EDIC RESEARCH GROUP, 2014). A ingestão de carboidrato influencia diretamente nos níveis de glicose pós-prandial, sendo ele o macronutriente de maior preocupação no manejo glicêmico (FRANZ et al., 2010). Assim, as

escolhas alimentares promovem efeito direto sobre o equilíbrio energético e, por conseguinte, sobre o peso corporal e sobre os níveis pressóricos e de lipídios plasmáticos. Evidências científicas demonstram que a intervenção nutricional tem impacto significativo na redução da hemoglobina glicada (HbA1c) no DM1 após 3 a 6 meses de seguimento com profissional especialista, independentemente do tempo de diagnóstico da doença (KULKARNI et al., 1998). Além disso, quando associado a outros componentes do cuidado em DM1, o acompanhamento nutricional pode favorecer ainda mais os parâmetros clínicos e metabólicos decorrentes de uma melhor aderência ao plano alimentar prescrito.

A administração de insulina não previne as complicações a longo prazo, por isso há a necessidade de buscar terapias que promovam a cura. Nesse sentido, o uso de MSCs como terapia alternativa para o DM1 apresenta benefícios pela capacidade de se diferenciar em células de diferentes tipos, assim como, apresentam potencial regenerativo intrínseco e imunológico. Portanto, esse estudo utilizou MSCs isoladas do tecido adiposo diferenciadas em CPIs responsivas à glicose, avaliação realizado *in vitro* antes da implantação. Dados em (WARTCHOW et al., 2019).

A escolha da utilização de células derivadas do tecido adiposo se deu em função de estudos anteriores demonstrarem estas serem uma população ideal de CT para terapia celular, uma vez que são encontradas em abundância e representam um implante autólogo (CHANDRA et al., 2011), tendo como vantagem efeito imunomodulador na supressão da resposta imune, bem como capacidade trófica. Sabe-se que a diferenciação de MSCs em CPIs pode ser realizada utilizando diferentes protocolos disponíveis na literatura. Porém, os protocolos atuais normalmente são de longa duração e na presença de inúmeros indutores, por isso o nosso grupo de pesquisa desenvolveu um protocolo para geração de CPIs alternativo, sendo este rápido e fácil (WARTCHOW et al., 2019). O protocolo de diferenciação destas células está publicado em artigo sob o título: *Short-Term Protocols to Obtain Insulin-Producing Cells from Rat Adipose Tissue: Signaling Pathways and In Vivo Effect* (WARTCHOW et al., 2019). Nele está descrito todo protocolo de diferenciação, indutores utilizados e testes realizados para avaliar morfologia e fenótipo da cultura celular, produção e secreção de insulina, transporte de glicose e vias de sinalização. Foram analisados três protocolos, considerando a simplicidade (número de indutores) e duração para fornecer uma análise comparativa mais direta. Como mencionado anteriormente, esse trabalho de conclusão de curso faz parte de um estudo anterior e complementar a esse, onde tivemos

efeitos positivos na implantação de CPIs no período de três semanas. Portanto, buscamos avaliar a estratégia de implantação dessas CPIs na região do SC, para investigar sua possível proteção contra danos no hipocampo após um período mais longo, de oito semanas.

A região subcutânea foi escolhida para a implantação, pois oferece várias vantagens, quando comparada a outros locais, como espaço suficiente; baixa taxa de morbidade, pois outros locais de implante que precisam passar pelo sistema porta causam reação inflamatória instantânea mediada por sangue, conhecida por matar mais de 50% das ilhotas infundidas imediatamente após o transplante; procedimento cirúrgico fácil, mínima invasão e fácil acessibilidade (YANG; YANG; SUMI, 2019).

O modelo de DM1 foi induzido com a utilização de STZ que é um produto químico amplamente utilizado para a indução de diabetes experimental em roedores, desde o relato inicial de suas propriedades diabetogênicas em 1963 (WU; YAN, 2015). É um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces achromogens* que contém uma molécula de glicose que está ligada a uma porção de metilnitrosourea altamente reativa que parece exercer a ação citotóxica. A porção de glicose direciona a substância química para as células β pancreáticas e o STZ reconhece o receptor GLUT2, abundante nas membranas plasmáticas das células β . Portanto, a célula β pancreática é um alvo específico para STZ (WU; YAN, 2015).

A queda nos níveis de glicose no grupo que recebeu as CPIs, uma semana após implante, demonstra que o implante foi efetivo no controle glicêmico, mesmo não atingindo valores de referência para considerá-los não diabéticos. A partir da segunda semana após implante os níveis de glicose voltaram a aumentar, resultado que corrobora com peptídeo C sérico que não foi detectável em oito semanas. O peptídeo é obtido quando a pró-insulina é clivada em insulina e peptídeo C, por isso é usado para dosar a produção de insulina ref. O que nos indica que as células implantadas podem ter perdido a capacidade de produzir e secretar insulina, ter se diferenciado em outros tipos celulares, ou mesmo ocorrido morte celular no enxerto. Quando analisamos os resultados em relação ao peso dos animais, observamos que não houve ganho de peso esperado ao longo do tempo no grupo SC como ocorreu com o grupo sham. Esse resultado está de acordo com a literatura, os animais continuaram crescendo e não ganharam peso, mesmo que a glicemia tenha diminuído uma semana após implante, eles ainda estavam hiperglicêmicos. Esse sintoma de perda de peso também ocorre em pacientes com DM1, além de sede, fome, poliúria, causados pelo quadro de hiperglicemia (KATSAROU et al., 2017). O aumento de AGEs séricos na oitava semana

no grupo SC, dialoga com o resultado encontrado para peptídeo C sérico, em que não foi detectável, e também com os níveis de glicose sanguínea. Mesmo após o implante os animais ainda se encontravam hiperglicêmicos e se sabe que a hiperglicemia leva à glicotoxicidade, uma das causas de quase todas as complicações do DM1 não tratado (WU; YAN, 2015). Associado a vários efeitos adversos no cérebro, incluindo mudanças no metabolismo energético cerebral, aumento dos níveis de cálcio livre, bem como aumentos mediados pela glicose no estresse oxidativo e inflamação, possivelmente mediados por AGEs (AMIN et al., 2013). A formação de AGEs tem um papel patogênico no desenvolvimento e progressão do DM1, pois cria um ambiente pró-oxidante (VLASSARA; URIBARRI, 2014).

Os astrócitos, células mais abundantes do sistema nervoso central (SNC), fornecem nutrientes, mantêm a homeostase cerebral e regulam a função metabólica neuronal entre diversas outras funções (PARPURA et al., 2012). Os astrócitos se tornam reativos em resposta a inúmeras injúrias no SNC, modificando a morfologia celular e a expressão de marcadores específicos (PEKNEY; PEKNA, 2014), como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), proteína de filamentos intermediários do citoesqueleto que desempenha importante função na arquitetura celular, no processo de astrogliose reativa e na formação de cicatriz glial (WANG; BORDEY, 2008), e a S100B, uma proteína ligante de cálcio que pertence à família de proteínas S100 e está envolvida na regulação do citoesqueleto e ciclo celular (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Em oito semanas após indução do DM1 não houve diferença na quantidade de GFAP entre os três grupos. Sabe-se que atividades atribuíveis à GFAP incluem a supressão da proliferação neuronal e extensão de neurite no cérebro maduro, formando uma barreira física para isolar o tecido danificado, regulando o fluxo sanguíneo, contribuindo para o funcionamento da barreira hematoencefálica, apoiando a mielinização e fornecendo resistência mecânica (BRENNER, 2014). A ativação de GFAP pode ser secundária ao dano em nervos periféricos, que é conhecido por ocorrer em humanos e animais com DM, portanto, é possível que a hiperglicemia e outras patologias no DM tenham um efeito direto na expressão de GFAP (HANANI et al., 2014). No entanto, embora a GFAP seja marcador de astrogliose, sua modulação não indica disfunção celular (ANDERSON; AO; SOFRONIEW, 2014), a contribuição de GFAP para a resposta à lesão e formação de cicatriz glial pode ser dependente do contexto. Alguns estudos avaliaram a superexpressão de GFAP em astrócitos usando um gene GFAP humano para determinar a resposta reativa dos astrócitos. Níveis cronicamente altos de GFAP provaram ser letais acompanhados por deposição abundante de agregados de proteína contendo GFAP em astrócitos (BRENNER,

2014). Na doença de Alzheimer, os astrócitos que circundam as placas senis de β -amiloides são reativos e formam uma cicatriz glial que isola as placas. Para determinar se este processo foi afetado pela ausência de GFAP, um peptídeo β -amilóide foi injetado na região CA3 em fatias do hipocampo. Em ratos do tipo selvagem, os astrócitos estenderam processos paralelos às bordas do depósito β amilóide que se entrelaçam para formar uma barreira distinta, enquanto os processos nos astrócitos em animais sem expressão de GFAP não estavam bem organizados e não conseguiram formar uma barreira. Já em animais com maior suscetibilidade a doenças inflamatórias na ausência de GFAP, camundongos nulos para GFAP foram mais resistentes do que o tipo selvagem à neurotoxicidade induzida no estriado (BRENNER, 2014). Em parte, essas discrepâncias podem ser devidas a diferenças metodológicas nos modelos animais usados, a heterogeneidade das células gliais, a análise de tempo e os ensaios empregados para a medição de GFAP. Portanto, essas diferenças podem estar sinalizando que há uma riqueza e complexidade na funcionalidade da GFAP que ainda não foi descoberta.

Com relação ao conteúdo da proteína S100B, após oito semanas de indução do DM1, não houve diferença entre os grupos diabéticos (STZ e SC), mas houve diminuição significativa em relação ao grupo Sham. Em muitos casos, a superexpressão da proteína induz o agravamento da doença, enquanto sua deleção produz melhora (MICHETTI et al., 2019). A proteína S100B intracelular interage com várias proteínas-alvo, incluindo GFAP, modulando a atividade astrogliar e S100B extracelular, agindo nos receptores de AGE (RAGE) (GONÇALVES; CONCLI LEITE; NARDIN, 2008; NATHAN et al., 2008). S100B extracelular afeta atividades celulares, agindo de forma parácrina, autócrina e endócrina, além de exercer efeitos neurotróficos nos neurônios, estimulando o crescimento e regeneração de neuritos *in vitro* e *in vivo*, aumentando a sobrevivência dos neurônios durante o desenvolvimento e após lesão, protegendo os neurônios contra estímulos tóxicos (DONATO et al., 2009). Evidências crescentes apontam que a S100B quando liberada em alta concentração (micromolar) está associada a danos causados pela sua ligação à RAGEs, que acionam o tecido lesionado, levando a uma série de distúrbios neurais diferentes, além de alguns dados apontarem que S100B é capturada por vesículas e recaptada por astrócitos via RAGE de forma dependente (MICHETTI et al., 2019). Concentrações nanomolares indicam um efeito neurotrófico para S100B, onde participa da regulação da proliferação, diferenciação e forma celular, homeostase do Ca^{2+} , fosforilação de proteínas, transcrição, atividade enzimática e metabolismo, além de efeitos como promoção de extensão de neurite,

proteção da sobrevivência do neurônio, contra-ataque a insultos neurotóxicos, aumento da atividade eliminadora de EROs, sinalização de radicais de oxigênio que levam à ativação do fator anti-apoptótico (DONATO et al., 2009; MICHETTI et al., 2019). A secreção de S100B pode ser reduzida em astrócitos primários e células de Schwann tratadas com glicose elevada ou após tratamento com altas doses de glutamato (DONATO et al., 2009). Nesse sentido, como o conteúdo de S100B que nos ratos SC está significativamente menor em comparação aos do grupo Sham, podemos inferir que os astrócitos estão hipofuncionantes, em decorrência da hiperglicemia. Esse dado corrobora com o resultado encontrado no teste de RO, onde foi observado um declínio cognitivo.

No teste RO não houve diferença entre os animais diabéticos (STZ e SC) quando comparados ao Sham. Isso nos mostra que o implante não foi capaz de prevenir ou reverter o efeito deletério causado pela hiperglicemia, tanto na memória de curto como de longo prazo. Essa tarefa é bastante adequada para indicação de declínio cognitivo na ocorrência de comprometimento do hipocampo. O hipocampo participa da codificação e consolidação da memória. É o local de associação das informações oriundas dos córtices perirrenal, parahippocampal e entorrinal, sendo o primeiro responsável pelas memórias relacionadas a "o quê" e a eventos "onde" (COHEN et al., 2013; COHEN; STACKMAN, 2015). Esse teste é utilizado para avaliar a memória de objetos não espaciais em roedores e a capacidade do animal em reconhecer um estímulo apresentado anteriormente, pois os roedores possuem uma tendência natural de explorar novos objetos não ameaçadores e, portanto, durante a sessão de teste, os roedores exibem uma preferência por explorar o objeto novo significativamente maior do que o familiar (COHEN; STACKMAN, 2015). A preferência pelo objeto novo demonstrada por um aumento no tempo de exploração para esse item, indica que um traço de memória para o objeto familiar foi devidamente codificada, consolidada e, em seguida, recuperada para guiar o comportamento do roedor durante a sessão de teste (ENNACEUR, 2010).

A razão de preferência do objeto novo, determinada pela divisão do tempo de exploração do objeto novo pelo tempo total de exploração, fornece valores acima de 0,5 sugerindo preferência pelo objeto novo, enquanto valores abaixo de 0,5 é indicativo de preferência do objeto familiar (COHEN; STACKMAN, 2015), conforme mostrado na figura 4. Essa tarefa oferece vantagem sobre outros testes de memória, pois não requer nenhuma motivação externa, recompensa ou punição (NEMANIC; ALVARADO; BACHEVALIER,

2004). Podemos concluir que não houve consolidação da memória, e que este prejuízo foi causado pela hiperglicemia. No estudo anterior, avaliando a memória em três semanas, o implante foi capaz de evitar o comprometimento cognitivo, porém a melhora não foi devido à melhora da hiperglicemia, bem como não foi devido ao aumento da secreção de insulina. Considerou-se que o benefício no SNC se deu por um efeito putativo das MSCs presentes nos enxertos celulares.

Para monitorar o local do implante e avaliar se houve migração das células implantadas no local subcutâneo para o hipocampo (local potencialmente danificado), células estromais mesenquimais foram diferenciadas em CPIs a partir de células do tecido adiposo de ratos Lewis GFP-tg, que apresentam células GFP+ (proteína verde fluorescente), conforme imagem 7. A presença de células GFP + foi avaliada por microscopia confocal nas regiões CA1 (Corno de Amon) e DG (Giro denteado), ampliada 10X. E e F são imagens da região CA1, após o implante, e G e H são imagens da região DG em dois e quatorze dias, respectivamente. Como mostra na imagem 9, foram encontradas células GFP+ nas duas regiões do hipocampo, tanto em dois como em quatorze dias após implante. A presença dessas células pode estar relacionada com a recuperação cognitiva que foi observada nesses animais, pois se sabe que as MSCs secretam moléculas bioativas que agem sobre células vizinhas para que as mesmas secretem agentes funcionalmente ativos (CAPLAN; DENNIS, 2006), fornecendo efeitos imunomoduladores, protegendo os tecidos, nesse caso, o cérebro, contra vários tipos de lesões (YI; SONG, 2012). Diferentemente do que aconteceu com os animais em oito semanas, em que não houve melhora na cognição, não podemos inferir se houve morte celular no implante ou o porquê do desaparecimento do efeito positivo observado em três semanas. Com a realização da avaliação da migração celular com o implante de células GFP+ poderemos entender melhor o que ocorreu e por que o efeito positivo não foi permanente.

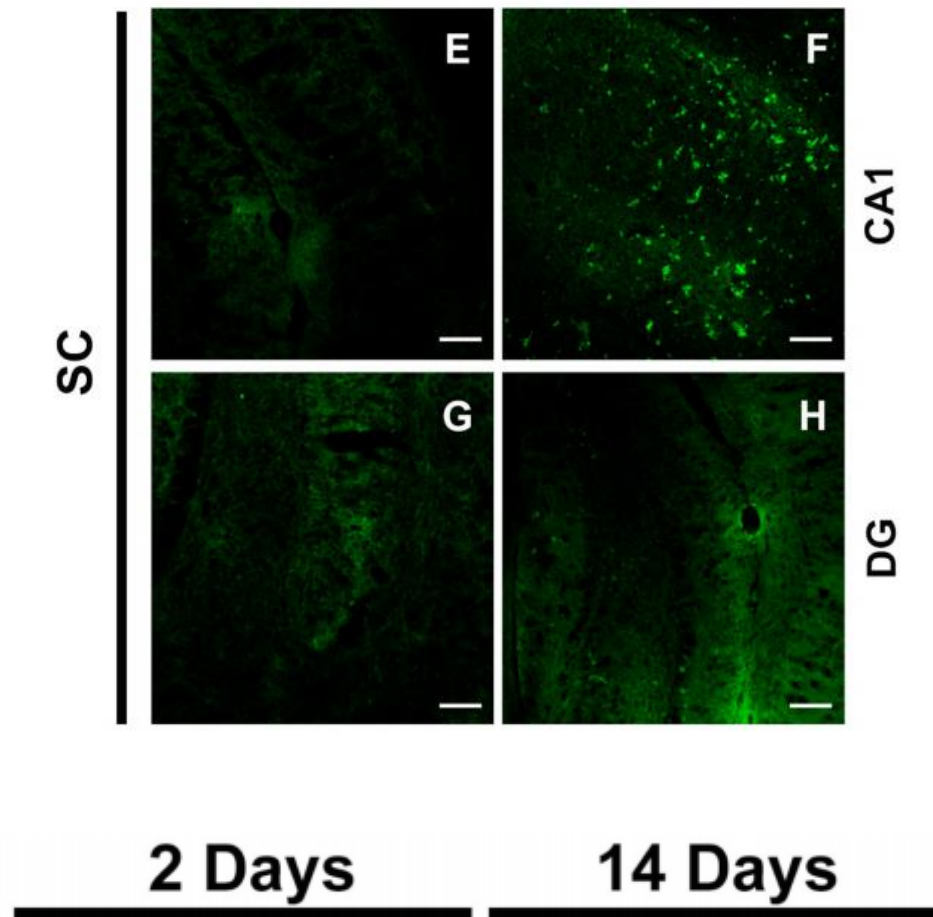


Imagem 7: Células CPIs GFP+ no hipocampo de ratos implantados no SC (WARTCHOW et al., 2020).

6. CONCLUSÃO:

Apesar de os níveis glicêmicos terem diminuído uma semana após implante, o implante subcutâneo não foi capaz de manter ou reverter o quadro de hiperglicemia. Em função disso, os astrócitos, através dos resultados para S100B e RO, estavam hipofuncionantes e não foram capazes de evitar déficit cognitivo a longo prazo. Para saber o que houve com as células implantadas e porque elas não tiveram mais efeito, ensaios histoquímicos precisam ser desenvolvidos, bem como mudança nas formas de implante, aumentando a quantidade de células a serem implantadas, fazendo implantes múltiplos e mais frequentes e/ou com células encapsuladas.

7. BIBLIOGRAFIA

- AGHAZADEH, Y.; NOSTRO, M. C. Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Current and Future Strategies. **Current Diabetes Reports**, v. 17, n. 6, p. 37, jun. 2017.
- AHMAD, S. et al. AGEs, RAGEs and s-RAGE; friend or foe for cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 49, p. 44–55, 2018.
- AHMAD, Z. et al. Evaluation of insulin expression and secretion in genetically engineered gut K and. **BMC biotechnology**, v. 12, p. 64, 19 set. 2012.
- ANDERSON, M. A.; AO, Y.; SOFRONIEW, M. V. Heterogeneity of reactive astrocytes. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 23–29, 17 abr. 2014. AMIN, S. N. et al. A histological and functional study on hippocampal formation of normal and diabetic rats. **F1000Research**, v. 2, p. 151, 2013.
- ASHRAF, J. M. et al. DNA Glycation from 3-Deoxyglucosone Leads to the Formation of AGEs: Potential Role in Cancer Auto-antibodies. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 74, n. 1, p. 67–77, 1 mar. 2016.
- AUGELLO, A.; KURTH, T. B.; DE BARI, C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. **European cells & materials**, v. 20, p. 121–133, 1 set. 2010.
- BARZILAY, R.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making transdifferentiation possible. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 10, p. 2509–2515, out. 2009.
- BECKMAN, J. A. et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. **European heart journal**, v. 34, n. 31, p. 2444–2452, ago. 2013.
- BEYTH, S. et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 2214–2219, 1 mar. 2005.
- BIELBY, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury**, v. 38 Suppl 1, p. S26-32, mar. 2007.
- BIESSELS, G. J. et al. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. **Diabetes care**, v. 28, n. 3, p. 726–735, mar. 2005.
- BONNER-WEIR, S. et al. Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2340–2348, out. 2010.
- BRANDS, A. M. A. et al. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. **Diabetes care**, v. 28, n. 3, p. 726–735, mar. 2005.
- BRENNER, M. Role of GFAP in CNS injuries. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 7–13, 17 abr. 2014.
- BRUCE, D. G. et al. Predictors of cognitive impairment and dementia in older people with diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 241–248, fev. 2008.
- CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076–1084, 1 ago. 2006.
- CHANDRA, V. et al. Islet-like cell aggregates generated from human adipose tissue derived stem cells ameliorate experimental diabetes in mice. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. e20615, 2011.

- CHHABRA, P.; BRAYMAN, K. L. Stem Cell Therapy to Cure Type 1 Diabetes: From Hype to Hope. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 2, n. 5, p. 328–336, maio 2013.
- DAHLQUIST, G.; KÄLLÉN, B. School performance in children with type 1 diabetes--a population-based register study. **Diabetologia**, v. 50, n. 5, p. 957–964, maio 2007.
- DENHAM, M. et al. Stem cells: an overview. **Current protocols in cell biology**, v. Chapter 23, p. Unit 23.1, out. 2005.
- DJOUAD, F. et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 8, p. 2025–2032, ago. 2007.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.
- DONATO, R. et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 6, p. 1008–1022, jun. 2009.
- DUTTA, U.; COHENFORD, M. A.; DAIN, J. A. Nonenzymatic glycation of DNA nucleosides with reducing sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 345, n. 2, p. 171–180, 15 out. 2005.
- ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p. 244–254, 31 dez. 2010.
- FERGUSON, S. C. et al. Cognitive ability and brain structure in type 1 diabetes: relation to microangiopathy and preceding severe hypoglycemia. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 149–156, jan. 2003.
- FORBES, G. M. et al. A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy. **Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association**, v. 12, n. 1, p. 64–71, jan. 2014.
- FRANZ, M. J. et al. The evidence for medical nutrition therapy for type 1 and type 2 diabetes in adults. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 12, p. 1852–1889, dez. 2010.
- FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 992–1009, 23 nov. 2011.
- GONÇALVES, C.-A.; CONCLI LEITE, M.; NARDIN, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. **Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 10–11, p. 755–763, jul. 2008.
- HANANI, M. et al. Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in streptozotocin-treated rodents. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 12, p. 2367–2371, dez. 2014.
- HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell communication and signaling: CCS**, v. 9, p. 12, 14 maio 2011.
- KARP, J. M.; LENG TEO, G. S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 3, p. 206–216, 6 mar. 2009.
- KATSAROU, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17016, dez. 2017.

- KIM, H.-S.; LEE, M.-K. β -Cell regeneration through the transdifferentiation of pancreatic cells: Pancreatic progenitor cells in the pancreas. **Journal of diabetes investigation**, v. 7, n. 3, p. 286–296, maio 2016.
- KOLIOS, G.; MOODLEY, Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. **Respiration**, v. 85, n. 1, p. 3–10, 2013.
- KONDRASHOVA, A. et al. The “Hygiene hypothesis” and the sharp gradient in the incidence of autoimmune and allergic diseases between Russian Karelia and Finland. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 121, n. 6, p. 478–493, jun. 2013.
- KULKARNI, K. et al. Nutrition Practice Guidelines for Type 1 Diabetes Mellitus positively affect dietitian practices and patient outcomes. The Diabetes Care and Education Dietetic Practice Group. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 98, n. 1, p. 62–70; quiz 71–72, jan. 1998.
- LANE, S.; RIPPON, H. J.; BISHOP, A. E. Stem cells in lung repair and regeneration. **Regenerative medicine**, v. 2, n. 4, p. 407–415, jul. 2007.
- LEITE, M. C. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 169, n. 1, p. 93–99, 30 mar. 2008.
- LI, R.; GUNDERSEN, G. G. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 11, p. 860–873, nov. 2008.
- LIND, M. et al. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. **The New England journal of medicine**, v. 371, n. 21, p. 1972–1982, 20 nov. 2014.
- LODI, D.; IANNITTI, T.; PALMIERI, B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 30, n. 1, p. 9, 17 jan. 2011.
- MCCRIMMON, R. J.; RYAN, C. M.; FRIER, B. M. Diabetes and cognitive dysfunction. **Lancet (London, England)**, v. 379, n. 9833, p. 2291–2299, 16 jun. 2012.
- MCNEILLY, A. D. et al. Nrf2-Mediated Neuroprotection Against Recurrent Hypoglycemia Is Insufficient to Prevent Cognitive Impairment in a Rodent Model of Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 10, p. 3151–3160, out. 2016.
- MICHETTI, F. et al. The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 148, n. 2, p. 168–187, 2019.
- MOHEET, A.; MANGIA, S.; SEAQUIST, E. R. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1353, p. 60–71, set. 2015.
- MUKHERJEE, P. et al. Diffusion tensor MR imaging and fiber tractography: technical considerations. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 29, n. 5, p. 843–852, maio 2008.
- MUSEN, G. et al. Effects of type 1 diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 326–333, fev. 2006.
- NATHAN, D. M. et al. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. **Diabetes Care**, v. 31, n. 8, p. 1473–1478, ago. 2008.

- NATHAN, D. M.; DCCT/EDIC RESEARCH GROUP. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 9–16, 2014.
- NEMANIC, S.; ALVARADO, M. C.; BACHEVALIER, J. The hippocampal/parahippocampal regions and recognition memory: insights from visual paired comparison versus object-delayed nonmatching in monkeys. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 8, p. 2013–2026, 25 fev. 2004.
- PARPURA, V. et al. Glial cells in (patho)physiology. **Journal of Neurochemistry**, v. 121, n. 1, p. 4–27, abr. 2012.
- PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1077–1098, out. 2014.
- QU, X. et al. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. **Experimental Hematology**, v. 40, n. 9, p. 761–770, set. 2012.
- REWERS, M. et al. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study: 2018 Update. **Current diabetes reports**, v. 18, n. 12, p. 136, 23 out. 2018.
- RICHARDSON, S. J. et al. Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 59, n. 11, p. 2448–2458, nov. 2016.
- ROMER, A. I.; SUSSEL, L. Pancreatic islet cell development and regeneration. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 22, n. 4, p. 255–264, ago. 2015.
- SALEM, M. A. K. et al. Single photon emission tomography (SPECT) study of regional cerebral blood flow in normoalbuminuric children and adolescents with type 1 diabetes. **Pediatric diabetes**, v. 3, n. 3, p. 155–162, set. 2002.
- SATO, N.; MORISHITA, R. Roles of vascular and metabolic components in cognitive dysfunction of Alzheimer disease: short- and long-term modification by non-genetic risk factors. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 5, p. 64, 5 nov. 2013.
- SHALIMOVA, A. et al. Cognitive Dysfunction in Type 1 Diabetes Mellitus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 6, p. 2239–2249, 1 jun. 2019.
- SMOLINA, K.; WOTTON, C. J.; GOLDACRE, M. J. Risk of dementia in patients hospitalised with type 1 and type 2 diabetes in England, 1998–2011: a retrospective national record linkage cohort study. **Diabetologia**, v. 58, n. 5, p. 942–950, 1 maio 2015.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, jan. 2010.
- SOHNI, A.; VERFAILLIE, C. M. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. **Stem Cells International**, v. 2013, p. 130763, 2013.
- SPAGGIARI, G. M. et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1327–1333, 1 fev. 2008.
- TAN, S. Y. et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes & metabolic syndrome**, v. 13, n. 1, p. 364–372, fev. 2019.
- TRAMONTINA, F. et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 162, n. 1–2, p. 282–286, 15 maio 2007.

- VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47 Suppl 1, p. 3–27, ago. 2013.
- VLASSARA, H.; URIBARRI, J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? **Current Diabetes Reports**, v. 14, n. 1, p. 453, jan. 2014.
- WANG, D. D.; BORDEY, A. The astrocyte odyssey. **Progress in Neurobiology**, v. 86, n. 4, p. 342–367, 11 dez. 2008.
- WARTCHOW, K. M. et al. Short-Term Protocols to Obtain Insulin-Producing Cells from Rat Adipose Tissue: Signaling Pathways and In Vivo Effect. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, 18 maio 2019.
- WARTCHOW, K. M. et al. Insulin-producing cells from mesenchymal stromal cells: Protection against cognitive impairment in diabetic rats depends upon implant site. **Life Sciences**, v. 251, p. 117587, 15 jun. 2020.
- WONG, F. S. How Does B-Cell Tolerance Contribute to the Protective Effects of Diabetes Following Induced Mixed Chimerism in Autoimmune Diabetes? **Diabetes**, v. 63, n. 6, p. 1855–1857, jun. 2014.
- WONG, M. S.; HAWTHORNE, W. J.; MANOLIOS, N. Gene therapy in diabetes. **Self/nonself**, v. 1, n. 3, p. 165–175, jul. 2010.
- WU, J.; YAN, L.-J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 8, p. 181–188, 2 abr. 2015.
- WU, Q. et al. Efficacy and safety of stem cells transplantation in patients with type 1 diabetes mellitus—a systematic review and meta-analysis. **Endocrine Journal**, v. 67, n. 8, p. 827–840, 2020.
- YANG, S.-Y.; YANG, K.-C.; SUMI, S. Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on Xenogeneic Islets in Subcutaneous Transplantation—A Murine Model. **Transplantation Proceedings**, v. 51, n. 5, p. 1458–1462, 1 jun. 2019.
- YI, T.; SONG, S. U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 2, p. 213–221, fev. 2012.
- ZIEGLER, A. G. et al. Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children. **JAMA**, v. 309, n. 23, p. 2473–2479, 19 jun. 2013.