

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
CAMUNDONGOS NOD**

Priscila Machado da Rosa

Dissertação para postular título de Mestre

Orientadora: Dra. Patrícia Sesterheim

Co-orientadora: Dra. Fátima Teresinha Costa Rodrigues Guma

Porto Alegre, março de 2013.

A todos os animais que no mundo inteiro têm suas vidas sacrificadas em prol da pesquisa. Que num futuro não tão distante, o desenvolvimento de novas tecnologias possa evitar que seres vivos sejam sacrificados em nome da ciência.

“A imaginação é mais importante do que o conhecimento.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora e amiga, Dra. Patrícia Sesterheim, pelo carinho e apoio de sempre. Obrigada por ter aceitado todos os desafios que eu criei sem nunca duvidar da nossa capacidade para resolvê-los. Tu és minha referência de ser humano e de profissional. Te amo muito!

À minha co-orientadora, Dra. Fátima Guma, por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada pela orientação e pelo carinho ao longo desta caminhada!

Ao professor Dr. José Cláudio, que me fascinou durante a disciplina sobre radicais livres, despertando em mim uma imensa curiosidade por esta área. Agradeço também por ter aberto as portas do seu laboratório e me orientado quando eu precisei. Muito obrigada!

À Dra. Elvira, por toda a ajuda que me deu no isolamento e manutenção das células, mas, principalmente, por tolerar com bom humor as minhas piadas diárias sobre estrangeiros. Eu te adoro, minha peruana preferida!

Ao meu querido colega, Leo Meira, por todas as discussões que iam desde futebol, música e política a aumento de atividade mitocondrial e produção de espécies reativas. Tua colaboração prática e teórica foi fundamental para este trabalho.

À minha colega, Moema Queiroz, por todo o carinho e dedicação para a obtenção das imagens de microscopia eletrônica. Obrigada por não explodir toda a vez que eu te cobrava as imagens mesmo com microscópio estragado.

À minha colega, Mariana Parisi, por ter aceitado me ajudar com a citometria de fluxo “aos 45 do segundo tempo”. Muito obrigada Mari!

Ao André Simões, aluno de mestrado do laboratório 32, por toda a dedicação e paciência nos experimentos relacionados ao estresse oxidativo. Este trabalho não seria possível sem a tua colaboração. Muito obrigada!

Às minhas alunas de iniciação científica preferidas, Cássia e Dandara, por todo o companheirismo e dedicação. Tive muita sorte em poder contar com pessoas tão comprometidas e responsáveis. Vocês com certeza terão um futuro de muito sucesso!

A todos os meus colegas queridos do laboratório 21, que não atuaram diretamente nos resultados desta dissertação, mas merecem todo o meu carinho por terem tornado esta caminhada tão agradável. Obrigada de coração pela acolhida!

Aos alunos do laboratório 32, por me receberem tão bem tanto durante os experimentos, sempre tirando alguma dúvida, me emprestando algum reagente ou dando alguma sugestão. O grupo de vocês é ótimo e fico muito feliz de poder contar com vocês. Obrigada!

Ao prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva, querido CA, por todas as sugestões quanto à elaboração desta dissertação.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Bioquímica, pelo carinho e amizade. Obrigada por tudo!

Aos meus pais, Paulo e Heloisa, por valorizarem sempre a minha educação e terem me dado todas as condições necessárias para que eu pudesse chegar até aqui. Espero conseguir retribuir toda a confiança que vocês sempre depositaram em mim. Amo vocês!

À minha irmã, Cátia, por sempre acreditar nos meus sonhos e se orgulhar das minhas conquistas.

Ao Zelmo, por todo o amor, paciência e compreensão principalmente no período de escrita desta dissertação. Muito obrigada por entender a minha ausência e por formatar as minhas imagens.

À UFRGS, universidade da qual me orgulho de fazer parte, por todas as oportunidades de construção do conhecimento que me proporcionou.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A hiperglicemia é uma característica do diabetes mellitus responsável por complicações micro e macrovasculares, que são a principal causa de morbidade/mortalidade em pacientes diabéticos, representando um problema clínico e econômico. Diante de um quadro de hiperglicemia, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio aumenta a atividade de rotas metabólicas que causam dano vascular.

Células-tronco mesenquimais (MSCs) são células multipotentes que têm sido vistas como uma atraente ferramenta para o estudo de terapia celular em diversas doenças como diabetes mellitus tipo 1. Devido à origem perivascular das MSCs, elas podem ser alvos da hiperglicemia, levando a um aumento do estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar alterações ultra-estruturais e parâmetros de estresse oxidativo de MSCs derivadas de pâncreas e rim de camundongos NOD diabéticos, NOD não diabéticos, e BALB/c.

Nossos resultados mostram um aumento do estresse oxidativo causado pela hiperglicemia em MSCs de camundongos NOD diabéticos. Estas células mostraram uma mudança expressiva na morfologia ultraestrutural das mitocôndrias, aumento na produção de espécies reativas, desequilíbrio da atividade de enzimas antioxidantes e dano oxidativo em proteínas em comparação com os controles não diabéticos, NOD e BALB/c.

ABSTRACT

Hyperglycemia is a characteristic of diabetes mellitus responsible for micro- and macro- vascular complications which are the main cause of morbidity/mortality in diabetic patients representing a clinical and economic issue. Under hyperglycemic conditions the increase in reactive oxygen species production activates four main pathways that cause vascular damage.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells which have been seen as attractive tools in cell therapy for many diseases such as diabetes mellitus type 1. Due to the perivascular origin of MSCs they can be affected by hyperglycemia which increases oxidative stress. Our aim in this study was evaluate and compare ultrastructural changes and oxidative stress parameters on MSCs derived from pancreas and kidney of diabetic NOD mice, nondiabetic NOD mice and BALB/c mice.

Our results show an increase of oxidative stress caused by hyperglycemia in MSCs from diabetic NOD mice (NOD+). These NOD+MSCs showed an expressive change in ultrastructural morphology of mitochondria, an increase in reactive species content, imbalance of antioxidant enzymes activity and an oxidative damage in proteins compared to no diabetic controls NOD- and BALB/c.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE – Produto final de glicação avançada
CAT – Catalase
CE – Célula endotelial
DAG – Diacilglicerol
DCF – 2'-7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA – 2'7'diacetato de diclorofluoresceína
DM – Diabetes Mellitus
DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1
DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina
GAD-65 – anti-ácido glutâmico descarboxilase
GPx – Glutathiona peroxidase
HLA – Sistema antígeno leucocitário humano
IAA – Anti-insulina
ICA – Anti células das ilhotas
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
MSCs – Células-tronco mesenquimais
NK – Células Matadoras Naturais
NOD – Diabético Não Obeso
NOD+ – NOD diabético/ hiperglicêmico
NOD- – NOD não diabético/normoglicêmico
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
RS – Espécies Reativas
SOD – Superóxido Dismutase
TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1	10
1.2. CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS	16
1.3. A INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA SOBRE O TECIDO VASCULAR... ..	20
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. OBJETIVO GERAL.....	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY.....	26
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÃO.....	48
6.PERSPECTIVAS.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	50
8. ANEXO I - MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY - INSTRUCTIONS FOR AUTHORS.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma síndrome auto-imune órgão específica caracterizada pela destruição seletiva de células β produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas (Liu e Eisenbarth, 2002). Dos casos de DM, apenas de 5 a 10% são do tipo 1, previamente designada de DM insulino dependente, DM tipo 1 ou DM juvenil (REDCDM, 2003). Considerada uma das doenças crônicas mais comuns entre crianças e adultos jovens, o DM1 pode se desenvolver em qualquer faixa etária, sendo mais freqüente antes dos 20 anos de idade. Acomete cerca de 0,3% da população caucasiana, com pico de início da doença entre os 11 e 12 anos de idade. A instalação clínica é geralmente abrupta e com quadro clínico de cetoacidose devido à falta absoluta de insulina (Liu e Eisenbarth, 2002; Milech e Oliveira, 2004).

O DM1 se caracteriza por ser uma doença multifatorial dependente da complexa interação entre fatores genéticos predisponentes, resposta imunológica, e influência do meio-ambiente na ativação de mecanismos predominantemente celulares anti-células β produtoras de insulina (Milech e Oliveira, 2004; Devendra *et al.*, 2004). Dessa forma, víruses e exposição a substâncias químicas poderiam desencadear um processo autoimune em indivíduos com susceptibilidade genética à doença (REDCDM, 2003). O entendimento dos aspectos envolvidos no desenvolvimento desta patologia constitui a base para a detecção e prevenção do DM1. Ao contrário do que se admitia previamente, a evolução da doença não é aguda e sim um processo de auto-agressão lenta que provavelmente ocorre durante anos numa fase pré-clínica. Estima-se que no período de manifestação clínica da doença, na presença de hiperglicemia e cetose, apenas 10-20% das células secretoras de insulina ainda estejam funcionando (Knip e Siljander, 2008).

A presença de infiltrado inflamatório do tipo linfomononuclear, configurando insulite, e a ausência de células β viáveis caracterizam o quadro histológico do DM1. As células secretoras de outros hormônios, como

glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, também presentes nas ilhotas pancreáticas, são poupadas. Entretanto, o predomínio numérico das células que secretam insulina termina por gerar atrofia das ilhotas (Balda e Pacheco, 1999).

A história natural do DM1 inclui quatro estágios distintos: (I) pré-clínico: auto-imunidade dirigida contra as células β , com uma diminuição lenta e progressiva da resposta insulínica à glicose intravenosa ou oral; (II) início do diabetes clínico; (III) remissão transitória; (IV) diabetes estabelecido associado a complicações agudas e crônicas (Reverse Klingensmith, 1997). O estágio pré-clínico é caracterizado pela presença de auto-anticorpos contra constituintes da célula β pancreática, que participam da sua autodestruição.

Uma ampla variedade de marcadores como os anticorpos anti células das ilhotas (ICAs), anti-insulina (IAAs), anti-ácido glutâmico descarboxilase (GAD-65) e anti-tirosinas fosfatases IA-2 e 2B, estão relacionados com o desenvolvimento do DM1 (Kocawara *et al*, 2003). Geralmente, pelo menos um entre estes marcadores está presente em 85-90% dos indivíduos com hiperglicemia de jejum, observada no início da doença (RECDADM, 2003). Tem-se discutido se existe algum autoantígeno responsável por iniciar o processo de autoimunidade do DM1. Algumas hipóteses têm sido propostas, como a de que a pro-insulina ou a insulina seriam autoantígenos primários para o surgimento do DM1. Esta hipótese, por exemplo, se baseia em observações como a presença primária dos autoanticorpos IAAs em crianças durante a fase pré-clínica (Kimpimäkiet *al*, 2001). Contudo, ainda não existe um consenso se algum dos autoantígenos presentes no DM1 seria o responsável por desencadear o processo de autoimunidade (Knip e Siljander, 2008).

Embora o efeito patogênico destes auto-anticorpos ainda não esteja bem caracterizado, a sua detecção possibilita rastrear indivíduos com risco elevado para o desenvolvimento da doença (Cesarini *et al*, 2003). Além da descrição dos autoanticorpos contra as ilhotas pancreáticas, outros fatores também reforçam o papel da auto-imunidade na fisiopatologia do DM1, como: a presença de células T na insulite, o retardo da progressão da doença através do uso de drogas imunossupressoras contra células T e a presença de células T ativadas em pacientes com DM1 (Roep, 2003).

Doenças auto-imunes como o DM1 envolvem a interação de diferentes subpopulações de linfócitos e células apresentadoras de antígenos. Entre estas populações celulares, estão incluídos os linfócitos CD4 e CD8, células B, células NK (natural killer), macrófagos e células dendríticas, que globalmente desempenham importante papel na geração e propagação da resposta autoimune (Sesterheim *et al*, 2007).

Em modelos animais, os camundongos NOD (do inglês, No Obese Diabetic) são os mais utilizados para o estudo da doença espontânea em todo o mundo. Nestes animais, a destruição das células produtoras de insulina mimetiza a observada em humanos (Delovitch e Singh, 1997; Rosmalen *et al*, 2002). Assim, análises imuno-histoquímicas de tecido pancreático revelam que os primeiros tipos celulares a infiltrarem as ilhotas de Langerhans, promovendo a insulite, são as células dendríticas e os macrófagos (Kodama *et al*, 2003; Fernandes *et al*, 2005). A apresentação de auto-antígenos específicos das células β pancreáticas pelos macrófagos e/ou células dendríticas para os linfócitos T CD4+, em associação com as moléculas de histocompatibilidade de classe II, constitui-se como o primeiro evento no processo de autoimunidade visto no DM1 (Fernandes *et al*, 2005).

Ativados, os macrófagos secretam citocinas que induzem a migração celular e estimulam vários tipos celulares a secretarem espécies reativas, extremamente tóxicas às células β pancreáticas. Durante o processo de insulite, que parece ocorrer com maior intensidade em ilhotas onde existam células β metabolicamente ativas, os linfócitos citotóxicos TCD8+ são as células predominantes. Tais linfócitos, após reconhecimento do auto-antígenos pancreáticos ligados à molécula HLA de classe I, efetuam a destruição das células β por citólise através da liberação de perforinas e granzimas, e também por indução de apoptose. Dessa maneira, macrófagos, linfócitos T CD4+ e linfócitos TCD8+ atuam sinergicamente na destruição das células β pancreáticas (Fernandes *et al*, 2005; Kulmala *et al*, 2000). O linfócito T CD4+ ativado secreta várias citocinas, cuja principal ação é promover a proliferação e a diferenciação de linfócitos T e de outras células, incluindo linfócitos B e macrófagos. A liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-1 β (IL-1 β) por células

apresentadoras de antígeno e células T favorece a iniciação e a perpetuação da resposta inflamatória e auto-imune no DM1 (Matarese *et al*, 2002).

A simples observação de que a prevalência da doença é mais alta entre os familiares de indivíduos afetados do que na população geral sugere que fatores genéticos são importantes no seu estabelecimento. Risco aumentado é observado em parentes de primeiro grau de uma pessoa afetada pela doença. Porém, 85% de casos novos não contemplam tal linhagem familiar (Kulmala, 2003). Os genes considerados como sendo os mais importantes para a susceptibilidade ao DM1 estão localizados no cromossomo 6 no *locus* do HLA de classe II (Todd *et al*, 2007). Entretanto, apenas uma proporção relativamente pequena, cerca de 10% dos indivíduos com susceptibilidade ao diabetes por mutações nos genes HLA, manifestam clinicamente a doença (Knip e Siljander, 2008). Além disso, a taxa de concordância para o desenvolvimento do DM1 em gêmeos monozigóticos não é de 100%, o que nos leva a crer que o ambiente proporciona fatores de risco (Hyttinen *et al*, 2003). Evidências a partir de estudos com modelos animais de DM1, como os camundongos NOD sugerem que agentes infecciosos podem ser importantes moduladores da doença (Tracy *et al*, 2010; Zaccane *et al*, 2004).

Quanto aos determinantes ambientais, os mais estudados no DM1 podem ser classificados em 3 grupos: infecções virais (citomegalovírose, rubéola, caxumba, sarampo), dieta precoce na infância (amamentação versus introdução precoce de ingredientes do leite de vaca, cereais e glúten) e toxinas (por exemplo, derivados de N-nitroso). Outros fatores não-genéticos modificadores da doença incluem estresse emocional, influências climáticas, sazonalidade, agentes sanitários e acesso aos cuidados de saúde (Rewers e Klingensmith, 1997; Devendra *et al*, 2004; Atkinson e Eisenbarth, 2001). De acordo com Atkinson e Eisenbarth, os agentes ambientais agem como modificadores da patogênese da doença, podendo servir como “gatilhos” (Atkinson e Eisenbarth, 2001). A liberação local de citocinas pró-inflamatórias decorrentes de infecção viral constitui fator central na perda da tolerância aos auto-antígenos e na ativação de linfócitos autorreativos. A associação entre os processos de inflamação e auto-imunidade tem sido extensamente ligada à ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas no local da lesão. Em adição, tais citocinas são capazes de recrutar e ativar células apresentadoras de antígenos

e linfócitos T autorreativos, o que perpetua o processo de autoimunidade nas ilhotas (Obayashi *et al*, 2000).

O evento imunológico inicial no desenvolvimento da doença, decorrente da infecção viral, parece ser a produção de interferon-gama (IFN-g) pelas células β produtoras de insulina. A secreção dessa citocina está associada à hiper-expressão das moléculas HLA de classe I e de classe II na superfície de células β . A partir desses eventos, a apresentação de auto antígenos pelas células β pancreáticas aos linfócitos T auto-reativos pode ocorrer, dando início à cascata de processos inflamatórios, que culminam na insulite (Obayashi *et al*, 2000).

Para tanto, modelos biológicos espontâneos de DM1 são ferramentas importantíssimas na obtenção do esclarecimento sobre a doença, suas complicações e tratamentos. Dois excelentes modelos animais se destacam: ratos BB (Bio-breeding) e camundongos NOD (Non Obese Diabetic). A suscetibilidade destes animais ao DM1 é poligênica e ambiental, enfatizando condições de habitação, sanitárias, dietéticas e de gênero (Rosmalen *et al*, 2002). A penetrância desta suscetibilidade é fortemente influenciada pelo ambiente físico, particularmente à exposição a patógenos microbianos. Assim, estes animais precisam ser alocados em condições livre de patógenos (SPF – specific pathogen- free) para expressar o fenótipo do diabetes. A disponibilidade destes modelos animais permite estudar novas estratégias de tratamento para o DM1.

Os atuais tratamentos para o DM1 visam repor a função endócrina que foi perdida. Estes tratamentos podem ser divididos em tratamentos convencionais e tratamentos experimentais. Dentre os tratamentos convencionais temos a insulino-terapia e o transplante de pâncreas e, como tratamento experimental, temos a terapia celular que pode ter como objetivo o transplante de ilhotas pancreáticas e/ou o transplante de células-tronco.

A insulino-terapia visa à administração de insulina exógena para controlar os níveis de glicose sanguínea. Nas últimas três décadas, a introdução de novas formulações de insulina que apresentam uma grande variação quanto à duração de ação, melhorou significativamente nossos recursos para o manejo clínico do diabetes. O desenvolvimento contínuo de bombas de insulina e sistemas de monitoramento de glicose mais eficientes tende a melhorar ainda

mais o controle glicêmico entre os diabéticos (Chen *et al*, 2013). Contudo, além desta reposição de insulina exógena não ser uma cura para o diabetes, ela também não impede o surgimento de complicações crônicas debilitantes que normalmente incluem degeneração vascular, cegueira e insuficiência renal e ainda proporciona episódios severos de hipoglicemia (Domínguez-Bendala e Ricordi, 2012).

O transplante de pâncreas também é uma forma de recuperar a função endócrina e, assim como a insulino terapia, também é um tratamento convencional bem estabelecido. Teoricamente, este seria o tratamento mais indicado, visando à completa restauração da função. Contudo, problemas como a baixa disponibilidade de órgãos, toxicidade das drogas imunossupressoras e riscos relacionados a uma cirurgia de grande porte, tornam este recurso não tão atrativo (Inverardi *et al*, 2003).

Sendo assim, a busca por abordagens alternativas no tratamento clínico do DM1 é de grande interesse de muitos grupos de pesquisa. A terapia celular visando o transplante de ilhotas pancreáticas vem sendo estudada nas últimas duas décadas. O primeiro ensaio clínico bem sucedido em seres humanos foi realizado na Universidade de Pittsburgh em 1990, onde 5 pacientes tornaram-se independentes da insulino terapia após o transplante de ilhotas (Tzakis *et al*, 1990). Entretanto, esta abordagem também tem desvantagens similares ao transplante de pâncreas, como a escassez de doadores e a dependência do uso de drogas imunossupressoras. Além disso, a disponibilidade de ilhotas pancreáticas isoladas de cada doador é muito baixa o que acaba gerando a necessidade de se ter de dois a três doadores para alcançar o número necessário de ilhotas para um único paciente. Além disso, a função limitada do enxerto, que leva a perda progressiva da produção de insulina, é outra desvantagem deste tratamento (Ryan *et al*, 2002).

Outra perspectiva para a terapia celular seria a utilização de células-tronco. Diversos trabalhos têm mostrado ensaios realizados com células-tronco hematopoiéticas (Couri *et al*, 2012; Voltarelli *et al*, 2007; Li *et al*, 2012), células-tronco embrionárias (Boyd *et al*, 2008; Blyszczuk *et al*, 2004), células-tronco mesenquimais (Fiorina *et al*, 2009; Madec *et al*, 2009; Moshtagh *et al*, 2012) e células pluripotentes induzidas (Jeon *et al*, 2012; Alipio *et al*, 2010). Dentre estes trabalhos, alguns apenas transplantam as células-tronco em modelos de

animais diabéticos, outros transplantam essas células em co-cultivo com ilhotas pancreáticas e alguns, diferenciam estas células em células produtoras de insulina (CPIs).

1.2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Nos últimos vinte anos observou-se um crescente interesse no estudo do transplante celular para o tratamento do DM1. O sucesso desta forma de terapia representaria a cura do DM1 com o fim de aplicações de insulina exógena, da monitorização da glicemia e do controle da dieta na tentativa de se manter a homeostase metabólica e de se reduzir a ocorrência das complicações tardias. As células-tronco, por definição, devem ter capacidade ilimitada ou prolongada de auto-renovação, originando células indiferenciadas com as mesmas características, e ser capazes de se diferenciar em pelo menos um tipo celular especializado (Watt e Hogan, 2000).

As células-tronco podem ser divididas em dois grupos de acordo com sua respectiva origem: célula-tronco embrionária e célula-tronco adulta. Apesar de muitos trabalhos utilizarem células embrionárias, elas possuem sérias limitações como o alto potencial tumorigênico e o envolvimento de questões éticas que dificultam a sua obtenção (Stanekzai *et al*, 2012). Por outro lado, as células-tronco adultas geram muitas expectativas, principalmente as células pluripotentes induzidas e as células-tronco mesenquimais (MSCs) (Domínguez-Bendala e Ricordi, 2012).

Ainda não há um consenso entre os pesquisadores sobre a definição de MSCs. Desde os primeiros estudos até hoje, as MSCs já receberam várias denominações. Inicialmente, foram chamadas de unidades formadoras de colônia de fibroblasto (CFU-F, do inglês *colony-forming unit fibroblast*), passando a células progenitoras mesenquimais, células de estroma de medula óssea à nomenclatura atual de células-tronco mesenquimais (da Silva Meirelles & Nardi, 2003; Phinney, 2002). Diversos estudos mostram que, em ambientes adequados, as MSCs são capazes de se diferenciar em células de tecido mesodermal, endodermal e até mesmo células ectodérmicas (Lagasse *et al.*,

2000; Ferrari *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2001; da Silva Meirelles & Nardi, 2003). Muitas tentativas de estabelecimento de cultivo de MSCs têm sido feitas utilizando-se diferentes metodologias, a fim de estabelecer condições de cultivo que mantenham suas características. O principal método de isolamento explora a capacidade que essas células têm de aderirem a diferentes substratos, possibilitando a remoção de células não aderentes contaminantes (principalmente células de origem hematopoiética) (DiGirolamo *et al.*, 1999; Banfi *et al.*, 2000). Os trabalhos com MSCs procuram caracterizar essas células quanto à morfologia e padrão fenotípico, determinando o perfil de marcadores de superfície em suas membranas, na tentativa de encontrar um marcador específico que permita seu isolamento. Diferentemente das células-tronco hematopoiéticas, nenhum marcador se mostrou exclusivo para MSCs embora alguns deles sejam usados para obter uma fração enriquecida dessas células (Quirici *et al.*, 2002). As MSCs apresentam receptores como CD44, CD73, CD90 e CD105 e são negativas para receptores de células-tronco hematopoiéticas como CD14, CD31, CD33, CD34 e CD45. MSCs também são negativas para marcadores endoteliais como o fator de Von Willebrand e a P-selectina (da Silva Meirelles *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm demonstrado a origem perivascular das MSCs em diferentes tecidos (Yuan *et al.*, 2012, Crisan *et al.*, 2009, Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). MSCs residem numa rede tridimensional complexa, que compreende uma multiplicidade de outros tipos de células, tais como, no caso da medula óssea, as células-tronco hematopoiéticas, adipócitos e células endoteliais, completamente submersos na matriz extracelular e, dentro desta mistura, a diferenciação das MSCs guia as células hematopoéticas precursoras para a formação de uma progênie madura (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010). Além disso, as MSCs ainda parecem exercer outra função pertinente: manter a integridade do seu nicho, ou seja, dos vasos sanguíneos (da Silva Meirelles *et al.*, 2008, Crisan *et al.*, 2008). Sendo assim, seguindo estímulos que incluem ferimento, inflamação, infecção e câncer, as MSCs são capazes de migrar do seu nicho perivascular para o local da lesão, auxiliando no reparo tecidual (da Silva Meirelles *et al.*, 2008).

No entanto, o mecanismo exato e todos os eventos de sinalização necessários para direcionar as MSCs até o local do reparo, ainda são

desconhecidos. Esta propriedade das MSCs tem sido aplicada no seu uso como vetor para tratamento de reparos de lesões teciduais (Chamberlain *et al*, 2007). De acordo com trabalhos publicados recentemente, as MSCs podem servir como uma promissora ferramenta no tratamento do DM1, atuando na regeneração e/ou na proliferação de células produtoras de insulina. MSCs oriundas de medula óssea, por exemplo, podem contribuir para o reparo de vasos de ilhotas danificadas e podem auxiliar também na recuperação de danos gerados pelo diabetes como neuropatias (Fang *et al*, 2004), cardiomiopatias (Zhang *et al*, 2008), nefropatias (Lee *et al*, 2006) e pé diabético (Vojtassak *et al*, 2006). Este grande número de trabalhos que demonstra o potencial clínico das MSCs no reparo e regeneração de diferentes tecidos se baseiam no mesmo princípio de que as MSCs secretam fatores que diminuem o dano e inibem a apoptose, induzindo a angiogênese e a proliferação do próprio tecido ou de células progenitoras. Esta complexa atuação causada pela atividade secretora das MSCs é conhecida como “efeito parácrino”, que difere do efeito de diferenciação das MSCs (Caplan, 2007).

Seguindo a linha do efeito parácrino das MSCs, outra importante característica presente nestas células é a capacidade de modulação da resposta imune. O papel imunossupressor das células-tronco mesenquimais pode ser evidenciado tanto em células autólogas quanto alogenéticas (Aggarwal e Pittenger, 2005) e xenogênicas (Liu *et al*, 2004). MSCs humanas inibem a proliferação de linfócitos T CD4+ e CD8+, por um mecanismo dose-dependente e não apoptótico, mediado por fatores solúveis como TGFβ1 e HGF (Di Nicola *et al*, 2002). Essa inibição só ocorre antes da fase efetora, inibindo a formação de linfócitos ativos e NKs. Outro dado importante é que MSCs escapam da lise de linfócitos T citotóxicos e células NK alogênicos (Rasmusson *et al*, 2003). Isto não seria esperado, pois MSCs apresentam antígenos via MHC classe I, alvos para lise de linfócitos T citotóxicos (Le Blanc *et al*, 2003) e NKs lisam células que expressam HLA I alogênico (Ruggeri *et al*, 2001). Em um trabalho recente, Aggarwal e Pittenger mostraram a função imunoregulatória *in vitro* das MSCs isoladas da medula óssea de humanos sobre diferentes populações de células do sistema imune (Aggarwal e Pittenger, 2005). De uma maneira geral, as MSCs desempenham seu papel alterando o padrão de secreção de diversas citocinas em células envolvidas no processo inflamatório. Essa

modificação favorece a liberação de substâncias antiinflamatórias como IL-4 e IL-10, inibindo citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ . Adicionalmente, as MSCs parecem alterar o padrão de resposta de Th1 para Th2. Assim, o transplante de MSCs pode ser bastante interessante no tratamento de doenças autoimunes, transplantes de órgãos e doença do enxerto contra hospedeiro, bem como em processos inflamatórios. Um ponto que é alvo de muitas pesquisas, mas ainda não está bem definido, refere-se à possibilidade de que a capacidade imunomoduladora das MSCs possibilite que se evite a rejeição de órgãos em procedimentos clínicos, substituindo assim os imunossupressores convencionais. Vários estudos têm indicado que MSCs podem ser obtidas de vários outros tecidos, além da medula óssea, e foi recentemente demonstrado que estas células estão distribuídas por todo o organismo (da Silva Meirelles *et al*, 2006). MSCs coletadas de diferentes tecidos apresentam um padrão geral semelhante, quanto a características como imunofenótipo, plasticidade, etc, mas algumas diferenças sugerem que outras características biológicas sejam específicas. Esta ampla distribuição sugere ainda que as MSCs têm outras funções no organismo, sendo sugerido um papel regulador da homeostasia (da Silva Meirelles *et al*, 2008).

Tendo em vista os diferentes atrativos destas células, acreditamos que as MSCs oriundas de diferentes tecidos oferecem ótimas perspectivas para o desenvolvimento de novos tratamentos para o DM1. Estas perspectivas se baseiam: (i) na exploração do potencial imunomodulador das MSCs, que pode tanto auxiliar nos transplantes de pâncreas e ilhotas pancreáticas, minimizando a rejeição do enxerto, quanto atuar diretamente nas ilhotas durante o processo inflamatório, impedindo a destruição das células β ; e (ii) na característica de diferenciação destas células multipotentes, que também podem ser induzidas a diferenciar-se em células produtoras de insulina (CPIs) (Domínguez-Bendala e Ricordi, 2012).

Sabendo da importância destas células como perspectivas de tratamento para o DM1, é de extrema importância que possamos observar e avaliar o comportamento das MSCs diante desta patologia, através de modelos animais que mimetizem esta condição autoimune. Uma terapia celular envolvendo o transplante de MSCs autólogas é muito tentadora, mas necessita

de uma investigação que avalie possíveis efeitos da patologia sobre a manutenção da integridade das próprias MSCs.

1.3. A INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA SOBRE O TECIDO VASCULAR

Espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, são gerados por todas as células aeróbicas como produtos resultantes de várias reações metabólicas e em resposta a diferentes estímulos. Enquanto a mitocôndria é tida como sendo a responsável pela maior parte da produção de ROS, a Ubiquinona, é descrita como sendo o principal local de produção de ROS dentro da mitocôndria. O complexo III catalisa a conversão do oxigênio molecular através da transferência de um elétron para a formação do radical superóxido (O_2^-) (Fleury *et al*, 2002). O superóxido por si só não é destrutivo, mas na presença de óxido nítrico (NO), por exemplo, reage rapidamente formando peroxinitrito (uma espécie reativa de nitrogênio). Em pH fisiológico, o peroxinitrito é rapidamente protonado à ácido peroxinitroso que é um poderoso agente oxidante que causa dano direto em proteínas, lipídeos e DNA (Halliwell, 2006). A enzima superóxido dismutase (SOD) remove o peróxido gerando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Este, por sua vez, pode ser removido pela enzima catalase (CAT) ou pela glutathione peroxidase (GPx). Um dos principais problemas do peróxido de hidrogênio é que ele reage rapidamente com metais como o ferro e o cobre, gerando o radical hidroxila através da reação de Fenton (Halliwell, 2006). Por não existir uma defesa oxidante capaz de neutralizar o radical hidroxila (HO^{\cdot}), este acaba sendo considerado como a ROS mais danosa ao organismo (Vasconcelos *et al*, 2007).

Embora as ROS possam causar muitos danos em diversos tecidos, defesas antioxidantes, como as enzimas citadas acima (CAT, SOD e GPx), foram desenvolvidas ao longo da nossa evolução com o propósito de limitar a quantidade destes radicais dentro das células (Halliwell, 2006). Este equilíbrio é importante porque as ROS não são apenas danosas como parecem. Diversos

trabalhos defendem o efeito benéfico das ROS, que em baixas quantidades, são fundamentais como agentes sinalizadores de diversos processos biológicos, incluindo diferenciação celular, apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos (Roberts e Sindhu, 2009; Stone e Yang, 2006, Fleury *et al*, 2002).

Quando a quantidade de ROS excede a capacidade antioxidante ocorrem danos a lipídeos, proteínas e DNA, levando a mudanças fisiológicas nas células classificado como estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode resultar de um aumento na geração de ROS e/ou na perda das defesas antioxidantes (Roberts e Sindhu, 2009). Estudos recentes têm sugerido que o estresse oxidativo gerado durante o período de hiperglicemia pode ser o fator chave na progressão destas complicações vasculares mesmo após o reestabelecimento dos níveis de glicose (Cooper, 2009).

A hiperglicemia, resultante da falta de regulação dos níveis de glicose devido à ausência ou mesmo a deficiência na produção e/ou absorção de insulina, é descrita na literatura como sendo um importante mediador entre a patologia do diabetes e suas complicações vasculares (Brownlee, 2001). Mesmo pacientes sob tratamento, com aplicações regulares de insulina exógena, sofrem com episódios de hiperglicemia ao longo de suas vidas. Estes picos de glicose causam dano tecidual envolvendo mudanças bruscas no metabolismo celular. Algumas destas mudanças acabam afetando de forma permanente macromoléculas de vida longa de forma que, mesmo restaurando-se o padrão normoglicêmico, não conseguimos deter o progresso das complicações microvasculares e/ou o surgimento de complicações macrovasculares (Rolo e Palmeira, 2006).

Estudos *in vitro* com células endoteliais demonstraram que mesmo restaurando a normoglicemia depois de um período de hiperglicemia, as células continuam aumentando o nível da expressão gênica de proteínas da matriz extracelular, como fibronectina e colágeno IV, que estão relacionadas com diversas complicações vasculares oriundas do diabetes (Roy *et al*, 1990). Este fenômeno ainda pouco compreendido é conhecido como “memória hiperglicêmica”.

Diversos estudos têm apontado a hiperglicemia como o principal agente causador de danos ao tecido vascular em DM1 (Schalkwijk e Stehouwer, 2005;

Bakker *et al*, 2009; Schaan, 2003). Altas concentrações de glicose geram uma produção excessiva de ROS pelas mitocôndrias que, por sua vez, atuam em pelo menos quatro rotas bioquímicas: (i) redução das taxas de NADPH/NADP⁺ pelo aumento da rota do sorbitol, (ii) aumento na formação de produtos finais de glicação avançada (AGE), (iii) ativação da proteína quinase C (PKC), (iv) aumento na rota de hexosamina. (Schalkwijk e Stehouwer, 2005) (Figura 1).

A hiperglicemia resulta em um aumento da conversão de glicose em sorbitol com a concomitante diminuição da concentração de NADPH e glutatona (Rolo e Palmeira, 2006). A redução destes antioxidantes pode levar ao estresse oxidativo pelo aumento do nível intracelular de ROS. Além disso, a formação de frutose a partir do sorbitol, gera um aumento dos níveis de NADH/NAD⁺ o que resulta em um aumento na síntese *de novo* de diacilglicerol (DAG). Este aumento de DAG ativa a proteína quinase C (PKC), responsável por diversas complicações em pacientes com diabetes (Schaan, 2003).

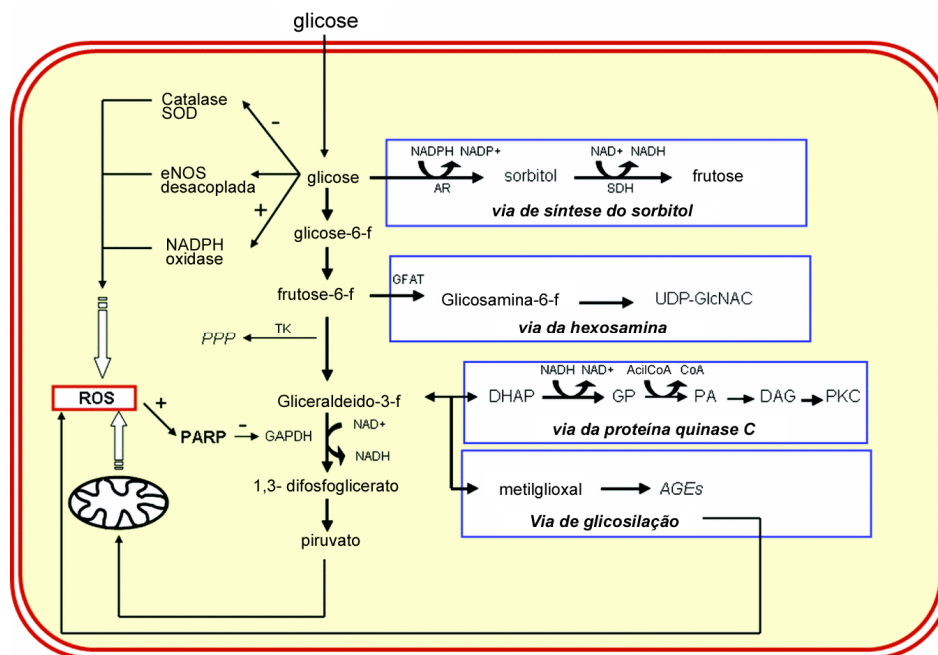


Figura 1. Prováveis mecanismos pelos quais a hiperglicemia e suas conseqüências imediatas induzem danos vasculares (adaptado de Schalkwijk e Stehouwer, 2005).

AGEs têm sido relacionadas ao surgimento de diversas complicações microvasculares ligadas ao diabetes mellitus, como: neuropatias (Jack e Wright, 2012) nefropatias (Lassila *et al*, 2004) e retinopatias (Miller *et al*, 2012).

Trabalhos demonstram que as AGEs podem induzir um quadro pró-inflamatório em células endoteliais através da ativação do receptor RAGE que, por sua vez, é capaz de ativar o NF- κ B (fator nuclear kappa B) (Bakker *et al*, 2009).

A biossíntese da hexosamina é mais uma das rotas que podem estar superativadas devido ao aumento no metabolismo da glicose. Os efeitos vasculares causados por esta via ainda são pouco compreendidos. Sabe-se que durante a hiperglicemia, devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes, uma parte desta glicose em excesso é direcionada para a rota da hexosamina. O produto final desta rota, UDP-N-acetilglicosamina atua como substrato para a glicosilação de importantes fatores intracelular, incluindo fatores de transcrição. Esta inibição acaba afetando a expressão de diversos genes como o do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) que leva ao desenvolvimento de complicações microvasculares relacionadas ao diabetes (Schalkwijk e Stehouwer, 2005).

Através da superestimulação destas quatro rotas mencionadas acima, a hiperglicemia acaba afetando o tecido vascular e contribuindo para o surgimento de micro e macroangiopatias. Diversos trabalhos descrevem alterações no endotélio vascular, como ativação de fatores inflamatórios, redução na dilatação dos vasos, alteração na homeostase, comprometimento da angiogênese e mudanças estruturais como aumento de AGEs e perda de glicocalice (Bakker *et al*, 2009; Schalkwijk e Stehouwer, 2005; Tabit *et al*, 2010), mas poucos descrevem alterações diretas no pericito. Embora alterações no pericito já tenham sido descritas a partir de diversos tecidos como o tecido muscular (Tilton *et al*, 1987) e o tecido nervoso (Giannini e Dyck, 1995) as alterações relacionadas à retinopatia, onde a perda das células do pericito dos capilares da retina está associada à neovascularização são, com certeza, as mais conhecidas (Devi *et al*, 2013; Fuet *et al*, 2012; Hammes *et al*, 2002). Na retinopatia, a disfunção endotelial e a resposta inflamatória aumentam a permeabilidade vascular, permitindo que uma grande quantidade de glicose invada o pericito. Este elevado nível de glicose afeta diretamente a fisiologia do pericito, causando apoptose (Gerald *et al*, 2009). A perda do pericito nos capilares da retina facilita a neovascularização uma vez que a redução de 50% do pericito já provou ser capaz de reativar a proliferação das células endoteliais (Enge *et al*, 2002). Contudo, o que se sabe sobre a perda do

pericito nos capilares da retina não pode ser extrapolado para outros tecidos já que diferenças na distribuição e na estrutura destas células sugerem que elas sigam regras vaso ou tecido específicas (Hirschi e D'Amore, 1996).

Por outro lado, sabe-se que o pericito e o endotélio vascular trabalham juntos para a formação e o desenvolvimento de vasos e que esta interação entre eles é extremamente importante para a deposição e estabilização da matriz extracelular 3D (Stratman e Davis, 2012). O pericito e as células endoteliais (CE) se comunicam e influenciam no comportamento um do outro através de trocas bi-direcionais de mediadores solúveis. As CE são uma fonte de fatores difusíveis que regulam diversas funções do pericito como, a proliferação e a migração. Sendo assim, distúrbios nesta interação entre pericito e CE podem desempenhar um papel importante tanto na morfologia dos vasos sanguíneos quanto no surgimento de várias doenças vasculares (Hirschi e D'Amore, 1996; Dulmovits e Herman, 2012).

Além disso, sabe-se que o diabetes causa mudanças no nicho das células da medula óssea, o que também inclui alteração na função das MSCs, resultando em distúrbios como a perda de mobilidade das células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras (Ferraro *et al*, 2011; Albiero *et al*, 2013). Por isso, a importância de se investigar possíveis danos às MSCs gerados pela alteração do nicho perivascular diante da patologia do diabetes torna-se evidente, principalmente, quando existe uma mobilização na busca por novas estratégias terapêuticas que incluem transplantes autólogos de MSCs em pacientes com diabetes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar alterações ultraestruturais e parâmetros de estresse oxidativo em células-tronco mesenquimais (MSCs) oriundas de pâncreas e rim de camundongos NOD diabéticos e não diabéticos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar MSCs de pâncreas e rim de camundongos NOD normoglicêmicos (controle positivo), NOD hiperglicêmicos (diabéticos) e BALB/c (controle negativo);
- Caracterizar fenotipicamente as MSCs oriundas de camundongos NOD normo e hiperglicêmicos e BALB/c por citometria de fluxo;
- Avaliar o estresse oxidativo das MSCs isoladas de camundongos NOD normoglicêmico, hiperglicêmico e BALB/c, identificando a produção de espécies reativas em um ambiente pró-oxidante bem como, a atividade das principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e os danos lipídico e protéico;
- Observar, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), possíveis alterações na ultramorfolgia de membranas e organelas como mitocôndrias e retículos em MSCs isoladas.

3. ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY

Priscila Machado da Rosa, André Simões Pires, Leo Anderson Meira Martins, Moema Queiroz Vieira, José Cláudio Fonseca Moreira, Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma, Mariana Migliorini Parisi, Cássia Maciel Duarte, Dandara Vázquez Ocampos, Elvira Aparício Cordero, Patrícia Sesterheim.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica. Ramiro Barcelos St. 2600 – anexo, 90035-000, Porto Alegre – RS, Brazil

Corresponding author: Tel/fax: +55 51 3217-9624

E-mail address: patriciasester@gmail.com (Sesterheim P)

HYPERGLYCEMIA AS A CAUSE OF OXIDATIVE STRESS ON MESENCHYMAL STEM CELL FROM DIABETIC NOD MICE

Abstract

Hyperglycemia is a characteristic of diabetes mellitus responsible for micro- and macro-vascular complications which are the main cause of morbidity/mortality in diabetic patients representing a clinical and economic issue. Under hyperglycemic conditions the increased in ROS production activates important pathways that cause vascular damage.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells which have been seen as attractive tools in cell therapy for many diseases such as DM1. Due to the perivascular origin of MSCs they can be affected by hyperglycemia which increases oxidative stress. Our aim in this study was evaluate and compare ultrastructural changes and oxidative stress parameters on MSCs derived from pancreas and kidney of diabetic NOD mice, nondiabetic NOD and BALB/c.

Our results show an increase of oxidative stress caused by hyperglycemia in MSCs from diabetic NOD mice (NOD+). These NOD+MSCs showed an expressive change in ultrastructural morphology of mitochondria, an increase in reactive species content, imbalance of antioxidant enzymes activity and an oxidative damage in proteins compared to non-diabetic controls NOD- and BALB/c.

Keywords Diabetes · Hyperglycemia · Oxidative stress · Mesenchymal stem cell

Introduction

Type 1 diabetes mellitus, is a chronic autoimmune disorder that precipitates in genetically susceptible individuals driven by the activation of lymphocytes against pancreatic β -cells [1]. Overall, diabetic micro- and macro- vascular complications are caused by prolonged exposure to high glucose levels which are the main causes of morbidity/mortality in diabetic patients representing a major clinical and economic issue [2].

The vast majority of publications about the mechanisms underlying hyperglycemia-induced diabetic vascular damage focus on a mitochondrial overproduction of the reactive oxygen species (ROS) [3, 4]. In order to keep of intracellular ROS content in low levels, cells have developed a complex antioxidant defense mechanism to limit the amount of these radicals. Among these antioxidant defenses, we highlight the main antioxidant enzymes: superoxide dismutase enzyme (SOD) which is responsible for removing the peroxide radical, generating molecular oxygen and hydrogen peroxide, and catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) which in turn, removes hydrogen peroxide [5]. When the amount of the antioxidant exceeds, oxidative damage occurs to lipids, proteins and DNA leading to physiological changes in the cells knowing as oxidative stress. Oxidative stress can result from an increased generation of ROS and / or loss of antioxidant defenses [6].

The increased in ROS production activates four main pathways under hyperglycemic conditions: I) nonenzymatic protein glycosylation that produces advanced glycosylation end products (AGE); II) acceleration of the polyol pathway with consequent decrease in NADPH, the cofactor of the antioxidant enzyme glutathione reductase and other intermediate products; III) increased hexosamine pathway activity, in which N-acetylglucosamine is formed; and IV) activation of protein kinase C (PKC) via de novo synthesis of diacylglycerol (DAG) [7, 8].

Through the overstimulation of these four pathways mentioned above, hyperglycemia ultimately affects the vascular tissue and contributing to the onset of micro and macroangiopathias. Several studies describe changes in vascular endothelium related to an increased oxidative stress [9, 10], but few of them describe direct changes in pericytes. Among the works that address changes related to pericytes, we highlight those that describe retinopathy, where loss of cells in the pericytes of retinal capillaries is associated with neovascularization [11-14]. However, what is known about the loss of retinal pericytes in the capillaries can not be extrapolated to other tissues as differences in the distribution and structure of these cells suggest that they follow the rules vessel or tissue specific [15].

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been isolated from several tissues, including bone/bone marrow, fat, pancreas, etc. They are multipotent cells which can differentiate into a several cell types as osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. Their easy isolation, high 'ex-vivo' expansion potential, ability to differentiate into multiple lineages and immunomodulatory property make them attractive tools in cell therapy for many diseases such as diabetes mellitus type 1 (DM1) [16]. Due to the perivascular origin of MSCs have already been demonstrated in different tissues, it is important to investigate possible damage to the MSCs generated by changes in the perivascular niche on the pathology of diabetes, especially when

there is a movement in the search for new therapeutic strategies that include autologous transplant of MSCs in patients with diabetes [17-19].

The similarities with human autoimmune diabetes, which include a genetic predisposition and the presence of insulinitis, have led to the use of the nonobese diabetic mice (NOD) as the mainstay of preclinical diabetes research [20, 21]. In this study, we evaluated and compared ultrastructural changes and oxidative stress parameters on MSCs derived from pancreas and kidney of diabetic NOD mice, nondiabetic NOD and BALB/c.

Material and methods

Animals

In this study, approved by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA – 21695) of the Federal University of Rio Grande do Sul, we used adult animals (6- to 10-months-old) of the BALB/c and NOD strains. These animals were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of 22 °C) with free access to food and water. The animals were provided by State Foundation for Health Research and Production (FEPPS) and received humane treatment in compliance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

Mesenchymal Stem Cell isolation

MSCs from kidney and pancreas were isolated from BALB/c mice, normoglycemic NOD mice (NOD-) and hyperglycemic NOD mice (NOD+) as previously described [22]. In short, kidneys and pancreas were removed and cut into small pieces. The fragments were placed DMEM/10 mM HEPES with collagenase type I (1 mg/ml; Sigma-Aldrich) for 40 min at 37°C and then triturated with a glass Pasteur pipette. Cells were centrifuged for 7 min at 1500 rpm at room temperature. After that, cells were resuspended in 10ml of DMEM/10 mM HEPES supplemented with 1% (vol./vol.) penicillin/streptomycin solution (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) and 10% (vol./vol.) and seeded in six-well dishes (4 ml/well). These dishes were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 24h, the medium was changed to removal of non-adherent cells. The medium was changed twice a week and cells were trypsinised and subcultured always when cultures reached 100% of confluence which usually happened once a week.

Mesenchymal Stem Cell characterization - Flow cytometric analysis

MSCs from NOD and Balb/c mice were analyzed for surface expression of some markers at passage 4 (P4). Anti-mouse antibodies against CD45, CD11b, CD34 and isotype control, were purchased

from Invitrogen. Antibodies against Sca-1 was from Caltag Medsystems and CD44 and CD90.2 were purchased from BD Biosciences.

Oxidative stress analysis

Protein quantification

Bradford total protein assay was used to determine the concentration of protein in all samples and bovine serum albumin was used as the standard [23].

Evaluation of the intracellular reactive species production

The intracellular production of reactive species such as ROS was analysed using the non-fluorescent and cell-membrane permeable 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma Inc.). DCFH-DA is hydrolysed by intracellular esterases and then oxidized by a range of reactive species to a fluorescent, polar and non-permeable 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) compound [24]. The cells were incubated in the dark with 1 μ M DCFH-DA in L-DMEM without serum for 30 min. at 37°C. The fluorescence was measured in a 24-well microplate reader (M5 Gemini XPS, Molecular Devices) after exciting at 485 nm, and collecting the emission at 520 nm. The results were expressed as fluorescence units per μ g of proteins.

Antioxidant enzyme activities quantification

SOD (E.C. 1.15.1.1) activity was assessed by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480 nm, as previously described [25]. Results are expressed as Units SOD/mg protein.

CAT (E.C. 1.11.1.6) activity was assayed by measuring the rate of decrease in H₂O₂ absorbance in a spectrophotometer at 240 nm [26]. The reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM H₂O₂ and 200 μ L of enzyme extract in a final volume of 2 mL at 25°C. CAT activity is expressed as Units CAT/mg protein.

GPx (E.C. 1.11.1.9) activity was determined by measuring the rate of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidation in a spectrophotometer at 340 nm, as previously described [27]. The rate of glutathione oxidized by t-butyl hydroperoxide was evaluated by the decrease of NADPH in the presence of EDTA, excess reduced glutathione and glutathione reductase. GPx activity was expressed as Units (nmol NADPH oxidized/min)/mg protein.

Oxidative damage parameters

As an index of lipid peroxidation, we used the formation of thiobarbituric acid–reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction, which is widely adopted as a method for measurement of lipid redox state, as previously described [28]. Briefly, the samples were mixed with 0.6 ml of 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5 ml of 0.67% TBA (4,6-dihydroxypyrimidine-2-thiol) and then heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS were determined by the absorbance in a spectrophotometer at 532 nm. Results were expressed as nmol malondialdehyde equivalents/mg protein.

The oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups and the cellular free thiols content. The quantification of carbonyl groups, the most frequently used biomarker of protein damage, is based on the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described [29]. Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% TCA and redissolved in DNPH and the absorbance read in a spectrophotometer at 370 nm. Results were expressed as nmol carbonyl/mg protein.

The cellular free thiols (-SH) were analyzed through the sulfhydryl reagent 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), also referred as Elmann's reagent [30], which estimate the oxidative alterations of proteins and non-protein peptides. Briefly, cells were collected in 0.1 % of sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.01M of DTNB diluted in ethanol, then incubated at room temperature for 20 min. The absorbance was measured at 412 nm. Results were expressed as μM of -SH/ mg of protein.

Transmission electron microscopy (TEM)

Semi-confluent MSCs cells were collected by trypsinization at passage 4 (P4). The cells were harvested by centrifugation and washed twice and 0.1M phosphate buffered (pH 7.3), After, the cells were fixed in a mixture of 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde, buffered with 0.1M phosphate (pH 7.3) at RT and then postfixade in osmium tetroxido in the same buffer for 45 min. before dehydration. Dehydration was done in a graded acetone series (30-100%) and embedding in araldite (Durcupan ACM, Fluka) for 72h at 60°C. Thin sections (70 nm) were stained with 2% uranyl acetate followed with lead citrate. Ultrastructural analysis was perform by transmission electron microscopy (JEM 1200 Exll, JEOL, Tokyo, Japan) operating at 80 kV (Microscopy Center of the Federal University of Rio Grande do Sul).

Statistical analysis

All the grouped data were statistically evaluated with GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA—version 4.02) software. Hypothesis testing methods included one-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's test. $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results

MSCs flow cytometric characterization

In the absence of a positive marker itself, MSCs are able to incorporate a number of different cell populations, potentially all variables in the phenotypic characteristics and growth [31]. The qualitative analyze of the expression of stem cell and immunoregulatory markers by flow cytometry were evaluated for MSCs from both strains, NOD and BALB/c, at passage 4 (P4) with the following panel of antibodies: 1) stem cell markers (CD44 and Sca-1); 2) hematopoietic markers (CD45, CD34 and CD90.2); 3) immune cell marker (CD11b). BALB/c and NOD MSCs from pancreas and kidney expressed little or any hematopoietic or immune cell markers (CD45, CD34, CD90.2 and CD11b, Fig. 1a-1d). Stem cell marker expression was positive for CD44, and Sca-1 in pancreas- and kidney-MSCs of both NOD and BALB/c mice (Fig. 1e and 1f, respectively). Taken together, the immunophenotypic profile of cell populations showed being compatible identification of mesenchymal stem cells genuine.

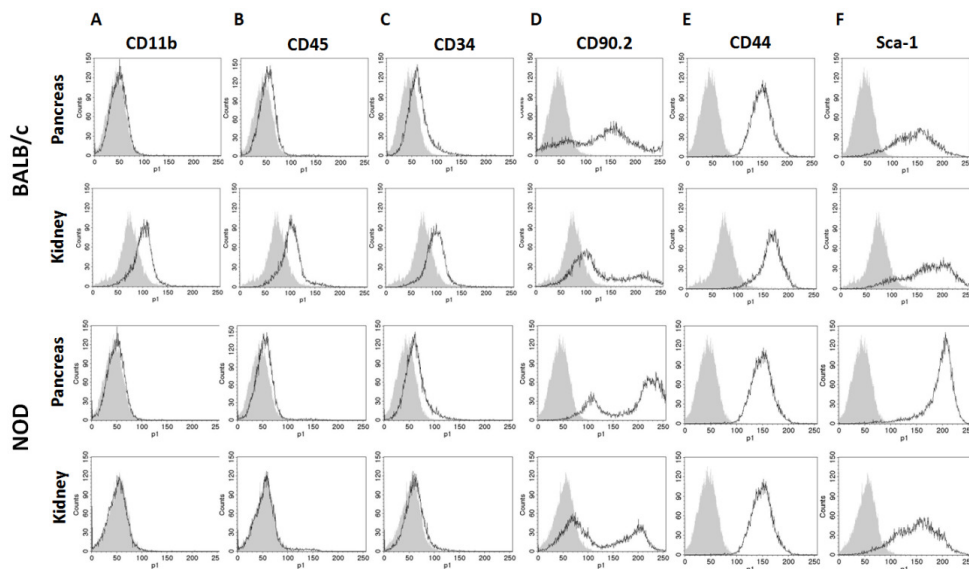


Fig. 1 BALB/c and NOD MSCs from pancreas and kidney expressed little or any hematopoietic or immune cell markers: CD45, CD34 and CD11b (**a-c**). CD90.2 showed a partial expression among all cultures (**d**). Stem cell marker expression was positive for CD44, and Sca-1 in pancreas- and kidney-MSCs of both NOD and BALB/c mice (**e** and **f**, respectively).

Evaluation of reactive species production

The incubation of MSCs with DCFH-DA allows for the determination of RS cell content. Quantitative measurement of DCFH-DA indicates an elevated production of reactive species in NOD+ MSCs from pancreas (F17,131 $p < 0.001$) and kidney (F15,180 $p < 0.001$) compared to NOD- and BALB/c mice (Fig. 2). NOD- MSCs from pancreas showed an intermediate value between NOD+ and BALB/c MSCs (Fig. 2a).

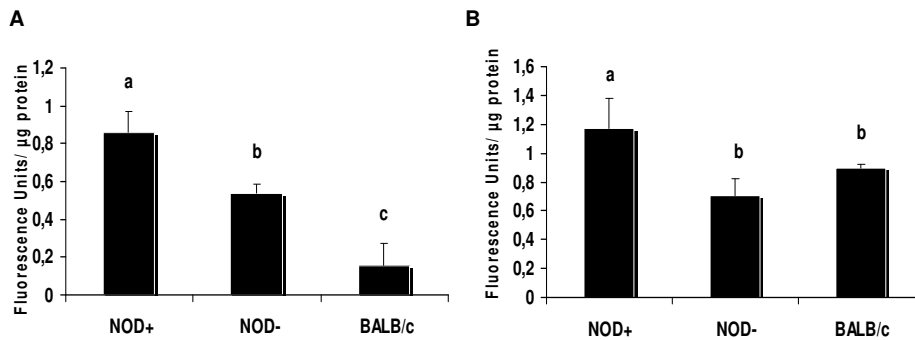


Fig. 2 Positive DCFH-DA indicates an elevated production of reactive species in NOD+ MSC from pancreas (a) and kidney (b) compared to NOD- and BALB/c mice. NOD- MSC from pancreas showed an intermediate value between NOD+ and BALB/c MSC (a). Data are mean \pm standard error of the mean (n=3 per group). Different letters mean different statistic groups.

Antioxidant enzyme activities

MSCs from pancreas presented significant differences in all the antioxidant enzyme activities analyzed (Fig. 3a-3c). These cells showed less SOD activity in NOD+ MSCs compared to NOD- MSCs and BALB/C MSCs (F 13,12 $p = 0.0064$). On the other hand, NOD+ MSCs from pancreas showed an increased in CAT (F 85,96 $p < 0.0001$) and GPx (F 45,71 $p = 0.0002$) activity compared to NOD-MSCs and BALB/c MSCs from the same tissue (Fig. 3b and 3c). Thus, NOD- MSCs present an intermediate CAT and GPx activity, which are increased compared to BALB/c but decreased compared to NOD+ (Fig. 3b and 3c).

MSCs from kidney (Fig. 3d-f) did not show significant difference neither in SOD nor in CAT activity among the groups (Fig. 3d and 3e). However, MSCs from kidney showed decreased GPx activity in both NOD- MSCs and NOD+ MSCs compared to BALB/c MSCs (F 37,45 $p = 0.0004$) (Fig. 3f).

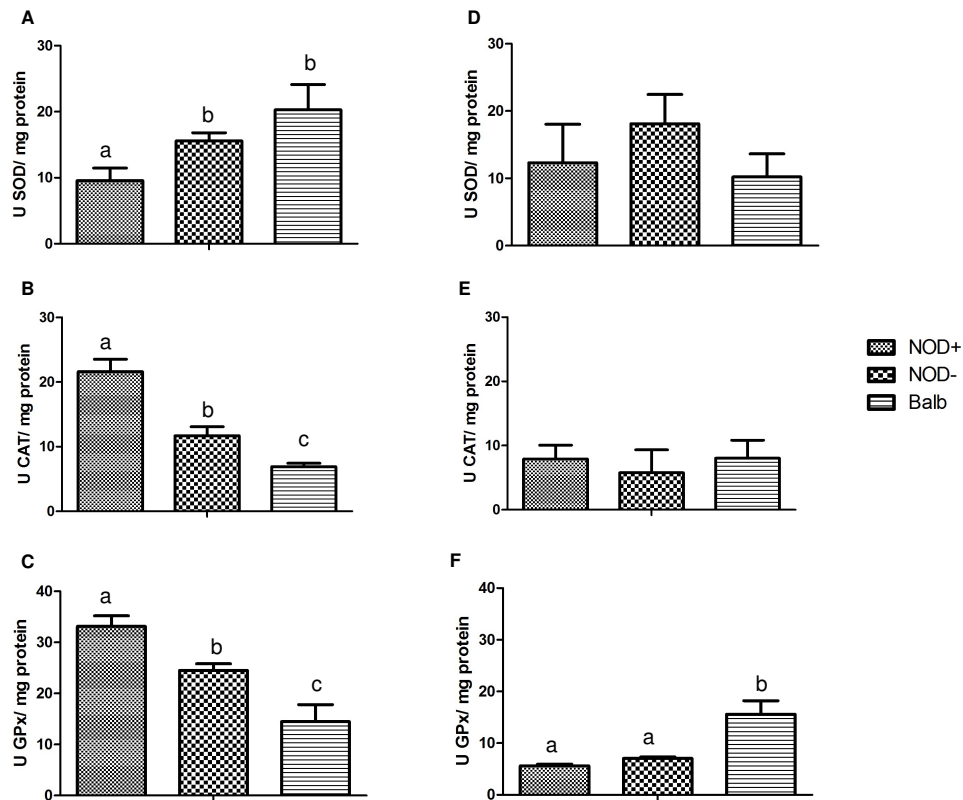


Fig. 3 Antioxidant enzyme activities. MSC from pancreas (**a**, **b**, and **c**) and MSC from kidney (**d**, **e**, and **f**). NOD+ MSC from pancreas presented decreased SOD activity (**a**) and increased CAT (**b**) and GPx (**c**) activity when compared to NOD- and BALB/c MSC. NOD- MSC from pancreas also presented an increased in CAT (**b**) and GPx (**c**) activity when compared to control BALB/c MSC. MSC from kidney showed no difference in SOD (**d**) and CAT (**e**) activity. NOD+ MSC from kidney showed less GPx activity when compared to NOD-MSC and BALB/c MSC (**f**). Furthermore, NOD- MSC also showed significant decreased in GPx activity when compared to control BALB/c. Data are mean \pm standard error of the mean (n=3 per group). Different letters mean different statistic groups.

Oxidative damage parameters

NOD+ MSCs either from pancreas as well as from kidney showed an increase in protein carbonylation content compared to NOD- MSCs and BALB/c MSCs (F 140,4 $p < 0.0001$ and F 24,88 $p = 0.0012$, respectively) (Fig. 4a and 4d). While in NOD+ MSCs from kidney, the amount of RS almost doubled compared to NOD- and BALB/c MSCs (Fig. 4d), in NOD+ MSCs from pancreas we saw an increased of reactive species content more than 3 times compared to NOD- and BALB/c MSCs (Fig. 4a).

On the other hand, we observed no difference in the cellular free thiols content among groups (Fig. 4b and 4e). We also observed no difference in lipid peroxidation content among groups (Fig. 4c and 4f).

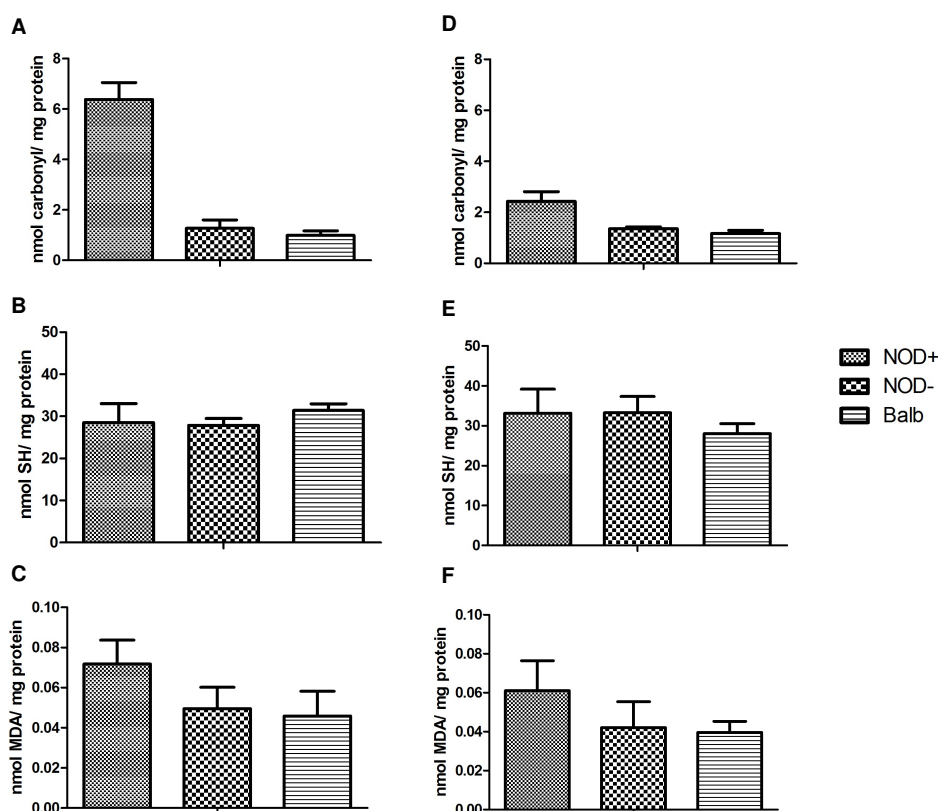


Fig. 4 Oxidative damage parameters. MSC from pancreas (**a**, **b**, and **c**) and MSC from kidney (**d**, **e**, and **f**). NOD+ MSC either from pancreas as well as from kidney showed an increase in protein carbonylation content compared to NOD- MSC and BALB/C MSC (**a** and **d**). In both MSC from pancreas and from kidney, we did not find any difference in cellular free thiols (**b** and **e**) and lipid peroxidation (**c** and **f**) content. Data are mean \pm standard error of the mean (n=3 per group). Different letters mean different statistic groups.

Cell morphology by electron microscopy

MSCs from pancreas of diabetic NOD mice (NOD+ MSCs) showed some differences in their ultrastructural morphology compared to MSCs of normoglycemic NOD mice (NOD- MSCs) and BALB/c MSCs (Fig. 5). BALB/c MSCs show a cytoplasm with many mitochondrias which presents a regular shape with visible and preserved cristae (Fig. 5a-5c). NOD-MSCs present similar morphology compared to BALB/c MSCs (Fig. 5d-5f). On the other hand, the NOD+ MSCs show a cytoplasm with many vacuoles and disrupted mitochondria structure (Fig. 5g-5i). Despite the difference in mitochondrial morphology, all strains BALB/c, NOD-, and NOD+, appear to be quite similar as the amount of others

organelles such as lysosomes and endoplasmic reticulum (Fig. 5). MSCs from kidney were also analyzed by TEM and they showed the same differences which we saw in pancreas (data no show).

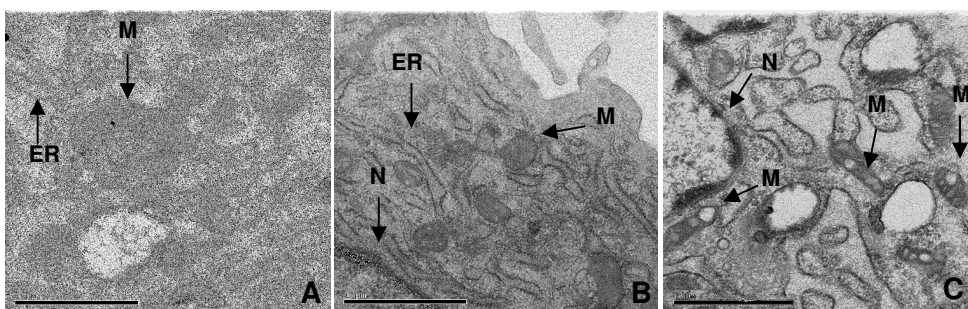


Fig. 5 Representative electron micrographs of pancreas MSCs from BALB/c (a), NOD- (b) and NOD+ (c) mice. BALB/c and NOD- MSCs present a cytoplasm with many mitochondria which show a regular shape with visible and preserved cristae. On the other hand, NOD+ MSCs shows a cytoplasm with many vacuoles and disrupted mitochondria structure (c). We also can see a mitochondrial swelling in NOD+ MSCs (c). *N* (nucleus), *M* (mitochondria) and *ER* (endoplasmic reticulum). ——— Means, 1 μ m. Images increased 50.000X

Discussion

Hyperglycemia is a characteristic of diabetes mellitus which activates multiple metabolic pathways that produce ROS. A large rise of ROS might be a consequence of mitochondria increased metabolism and/or reduction in cellular antioxidant defense. In the presence of high levels of glucose, the rise in electron flux through the mitochondrial electron transport chain increases the ATP/ADP ratio and causes hyperpolarization of the mitochondrial membrane potential what leads to partial inhibition of the electron transport in complex III, resulting in an accumulation of electrons to coenzyme Q. The excess of electrons drives partial reduction of oxygen to generate the free radical anion superoxide. This mitochondrial dysfunction might be a link between high glucose levels and the main pathways responsible for hyperglycemic damage in protein and lipids which affects many biological activities such as cell proliferation and apoptosis [2].

Mitochondrial superoxide radical production causes inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and subsequent accumulation of glycolysis intermediates which activated four main pathways under hyperglycemic conditions: I) nonenzymatic protein glycosylation that produces AGE; II) acceleration of the polyol pathway with consequent decrease in NADPH, the cofactor of the antioxidant enzyme glutathione reductase and other intermediate products; III) increased hexosamine pathway activity, in which N-acetylglucosamine is formed; and IV) activation of PKC via *de novo* synthesis of DAG [7].

The results of this study showed that hyperglycemia related to DM1 resulted in dysfunction of redox balance in MSCs from pancreas and kidney of diabetic NOD mice. Our results are in agreement

with others studies which support the link between increase of ROS production by hyperglycemia and pericyte damage which has been implicated in the development of a variety of microangiopathy and some macroangiopathy related to diabetes [11, 12, 32]. Our data show that MSCs of pancreas and kidney from diabetic NOD mice (NOD+) presents oxidative stress when compared to MSCs from controls nondiabetic NOD (NOD-) and BALB/c mice. We confirmed this oxidative stress through the increase of reactive species cellular content, imbalance among antioxidant enzymes activity (SOD, CAT and GPx) and through the rise of carbonyl cell content which demonstrates the presence of oxidative damage in protein.

The increase of a pro-oxidant intracellular environment which we found in these MSCs may activate antioxidants defense, as well as the transcription of genes encoding antioxidant and detoxification enzymes. Those adaptive mechanisms protect the cells against ROS-mediated toxicity and maintain tissue redox balance [33]. The first enzyme which participates in the cellular antioxidant defense is the superoxide dismutase that catalyses the dismutation of superoxide anion into hydrogen peroxide, playing a critical protective role. However, prolonged oxidative stress eventually decreases the intracellular SOD activity leading to an oxidative imbalance and a raise in the oxidative damage [34]. Thus, the decrease in SOD activity in NOD+MSCs from pancreas might be a consequence of a chronic oxidative stress on SOD enzyme which could reduce its expression or activity. In the face of hyperglycemia, glucose auto oxidation may increase the production of oxygen free radicals and glycation of enzymatic proteins, which could include de glycation of the SOD itself. In erythrocytes of diabetic patients, for example, about 50% of SOD is glycated resulting in trace activity [35]. We cannot be sure about why SOD activity is decreased in these MSCs, but following what we already know about oxidative stress, it is possible that the increase in AGE production might be related to decrease in activity of antioxidants enzymes.

On the other hand, GPx and CAT activity showed to be increased in the same cells (NOD+MSCs from pancreas). As a significant increase of DCF content was detected in these cells we know that they have a pro-oxidant environment with a rise in some reactive species such as H₂O₂. Knowing that the hydrogen peroxide is catalyzed by CAT or by GPx at the expense of reduced glutathione [34], a rise in H₂O₂ cell content might be responsible for the increased of GPx and CAT activity. Therefore, the significant increase in CAT and GPx activity may acts as an adaptive phenomenon in response to increased substrate concentration in mild oxidative stress, what could be the explanation why NOD- show an intermediary GPx and CAT activity (increased compared to BALB/c control, but decreased compared to NOD+). Although NOD- mice have no increased levels of circulating glucose, they do have a genetic predisposition to DM1 and present insulinitis from the age of 5 weeks onwards [21]. These features per se could justify the increase in CAT and GPx activity as an adaptive phenomenon in response to a mild oxidative stress caused by the inflammation in these animals.

NOD+MSCs from kidney presented no difference in SOD and CAT activity among the groups despite showing increase of reactive species content and oxidative damage in proteins. However, they do present a decrease in GPx activity which, as already described above about SOD activity in NOD+MSCs from pancreas, might be a consequence of oxidative stress on the enzyme itself. In this case, besides the increase in AGE production, which might be affecting directly the activity of the enzyme, we also could have a problem related to availability of its cofactor. The increase in intracellular glucose can lead to an increase in the flux of glucose to sorbitol via the polyol pathway with concomitant decreases in NADPH

and glutathione [2]. Therefore, the lack of the reduced glutathione (GPx cofactor) could be responsible for the decrease in its activity which lead to a redox imbalance with accumulation of H₂O₂ and increased oxidative stress. Decrease in GPx activity were also reported in a recent study about chronic kidney disease related an increased of oxidative stress [36].

The difference in the antioxidant defense mechanisms in MSCs from pancreas and kidney of NOD+ mice may correspond to different adaptive responses of these cells to the increased oxidative stress in diabetes. Thus, it is important to make clear that our objective in this paper is not to explain why one enzyme is more active than another or vice versa, but investigate if the hyperglycemia as a consequence of DM1 can affect MSCs in those tissues, leading to an oxidative stress condition. By this point of view, our results indicated that in this diabetic animal model (NOD+) we do have an increased oxidative stress, at least, in MSCs from pancreas and kidneys. MSCs from other tissues also need to be investigated for the same parameters because it is likely that many MSCs from different niches can be affect in different ways. It is also important to keep in mind that there is no rule about the effects caused by hyperglycemia and that it might be different in each tissue. In support, differences in distribution and structure among pericytes suggest that they have vessel- or tissue- specific roles which can support the hypothesis of different effects in MSCs from different tissues [15].

Oxidative stress describes a pathologic condition in which exists an imbalance between production of oxidant species and antioxidants defense which either increases the amount of reactive species as causes damage in lipids and proteins [37]. Carbonyl assay is the most frequently used biomarker of measurement of protein carbonyl groups. Carbonyls can arise as a result of protein glycation by sugars, by the binding of aldehydes to proteins and by the direct oxidation of amino-acid side chains by reactive species [24]. Our results show that both pancreas and kidney MSCs presented an increase in carbonyl cell content. This protein damage is a consequence of the increased RS production and redox imbalance found in these cells. Taken together, these data support the presence of oxidative stress in MSCs from diabetic NOD mice.

Abnormal mitochondrial morphology is frequently seen in many pathological conditions, including diabetes. Mitochondrial shape change in hyperglycemic exposure may alter structural organization and arrangement of respiratory chain complexes within the membrane, leading to perturbation of electron transport chain (ETC) activity and ROS overproduction [38]. Our results let clear that there is an expressive change in ultrastructural morphology in mitochondria from NOD+MSCs. Some studies, especially those about diabetes type 2, defend that the morphological change of mitochondria is an upstream causal factor for the ROS production under acute hyperglycemic stimulation while others, claim that change in mitochondrial morphology in hyperglycemic insult could be either the cause or consequence of the ROS increase [2]. According to our results, abnormal mitochondria morphology was detect in NOD+MSCs from both tissues analyzed which was not detect in MSCs from controls (NOD- and BALB/c), supporting the hypothesis that morphological dysfunction is related to onset of DM1 disease. Thus, many mitochondria in the electronic microscopic image present a morphologic dysfunction known as “swelling mitochondrial” which has been associated with increased ROS production and oxidative stress [39]. Mitochondrial swelling is defined as an “increase in the volume of mitochondria

due to an influx of fluid” which seems to affect mitochondrial electron transport, leading to an increased in ROS production [40].

According to our results, we confirm the presence of oxidative stress caused by hyperglycemia on mesenchymal stem cells isolated from pancreas and kidney of diabetic mice, and considering the perivascular niche of MSCs *in vivo*[41], we believe that other tissues may also have their cells affected in some way. Although our results indicate an oxidative stress of MSCs in diabetic mice, we did not evaluate the existence of a possible adaptation of these cells to this condition. The search for changes in the basic characteristics of these cells such as proliferation, adhesion, migration and differentiation capacity is extremely important for future therapies aimed at transplanting autologous stem cells in patients with DM1.

Conclusion

In summary, our results support the presence of oxidative stress caused by hyperglycemia in MSCs from diabetic NOD mice (NOD+). These NOD+MSCs showed an expressive change in ultrastructural morphology of mitochondria, an increase in reactive species content, imbalance of antioxidant enzymes activity and a oxidative damage in proteins compared to non-diabetic controls NOD- and BALB/c.

Reference

1. Mallone R, Brezar V, Boitard C. (2011) T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. *Clin Dev Immunol* 2011:513210.
2. Rolo AP, Palmeira CM. (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 212(2):167-78.
3. Bassi R, Trevisani A, Tezza S, Ben Nasr M, Gatti F, Vergani A, Farina A, Fiorina P. (2012) Regenerative therapies for diabetic microangiopathy. *Exp Diabetes Res* 2012:916560.
4. Cooper ME (2009) Metabolic memory: implications for diabetic vascular complications. *Pediatr Diabetes* 10(5):343-6.
5. Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2):312-22.
6. Roberts CK, Sindhu KK (2009) Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 84(21-22):705-12.
7. Schalkwijk CG, Stehouwer CD (2005) Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction 109(2):143-59.
8. Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107(9):1058–1070.

9. Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW (2009) Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res* 335(1):165-89.
10. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA (2010) Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord* 11(1):61-74.
11. Devi TS, Hosoya KI, Terasaki T, Singh LP (2013) Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: Implications for diabetic retinopathy. *Exp Cell Res* pii: S0014-4827(13)00019-0.
12. Fu D, Wu M, Zhang J, Du M, Yang S, Hammad SM, Wilson K, Chen J, Lyons TJ (2012) Mechanisms of modified LDL-induced pericyte loss and retinal injury in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 55(11):3128-40.
13. Hammes HP, Lin J, Renner O, et al (2002) Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 51:3107-12.
14. Geraldès P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, et al (2009) Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nature Medicine* 15(11):1298–306.
15. Hirschi KK, D'Amore PA (1996) Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 32(4):687-98.
16. Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA (2009) Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 11(4):377-91.
17. Yuan SM, Chen RL, Shen WM, Chen HN, Zhou XJ (2012) Mesenchymal stem cells in infantile hemangioma reside in the perivascular region. *Pediatr Dev Pathol* 15(1):5-12.
18. Crisan M, Chen CW, Corselli M, Andriolo G, Lazzari L, Péault B (2009) Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Ann N Y Acad Sci* 1176:118-23.
19. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466:829–34.
20. Van Belle TL, Taylor P, and Herrath MG (2009) Mouse Models for Type 1 Diabetes. *Drug Discov Today Dis Models* 6(2): 41–5.
21. Signore A, Pozzilli P, Gale EA, Andreani D, Beverley PC (1989) The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. *Diabetologia* 32(5):282-9.
22. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:220413.
23. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–54.
24. Halliwell, B and Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142(2): 231-55.

25. Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170–75.
26. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–26.
27. Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–33.
28. Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421-31.
29. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtma ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464–78.
30. Elmann, GL (1959) Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-7.
31. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, et al (2009) Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev bras hematol Hemoter* 31(1):25-35.
32. Kanasaki K, Taduri G, Koya D (2013) Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:7.
33. Kaszubowska L, Kaczor JJ, Hak L, Dettlaff-Pokora A, Szarynska M, Kmiec Z (2011) Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly. *J Physiol Pharmacol* 62: 101-9.
34. Lee SH, Park MH, Park SJ, Kim J, Kim YT, Oh MC, Jeong Y, Kim M, Han JS, Jeon YJ (2012) Bioactive compounds extracted from *Ecklonia cava* by using enzymatic hydrolysis protects high glucose-induced damage in INS-1 pancreatic β -cells. *Appl Biochem Biotechnol* 167(7):1973-85.
35. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W (1998) Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 13(11):2829-32.
36. Crawford A, Fassett RG, Coombes JS, Kunde DA, Ahuja KD, Robertson IK, Ball MJ, Geraghty DP (2012) Relationship between antioxidant enzyme genotype and activity and kidney function: a case-control study. *Clin Nephrol* 78(2):135-44.
37. Halliwell B (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31(4):261-72.
38. Moreira PI and Oliveira CR (2011) Mitochondria as potential targets in antidiabetic therapy. *Handb Exp Pharmacol* 203:331-56.
39. Galindo MF, Jordán J, González-García C, Ceña V (2003) Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *Br J Pharmacol* 139(4):797-804.
40. Kaasik A, Safiulina D, Zharkovsky A, Veksler V (2007) Regulation of mitochondrial matrix volume. *V. Am J Physiol Cell Physiol* 292(1):C157-63.

41. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB (2008) In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26:2287–99.

Acknowledgments

We acknowledge the Brazilian funding agencies The Coordination of Training of Higher Education Graduate Foundation for the financial support.

4. DISCUSSÃO

A hiperglicemia, uma característica presente na patologia do diabetes mellitus, é capaz de ativar diversas rotas metabólicas que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS). Um aumento significativo na concentração intracelular de ROS pode ser uma conseqüência do aumento do metabolismo de mitocôndrias e/ou de uma redução das defesas antioxidantes da célula. Na presença de altas concentrações de glicose circulante, o aumento no fluxo de elétrons através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, aumenta a razão ATP/ADP, levando a hiperpolarização do potencial de membrana da mitocôndria, o que, por sua vez, leva a uma inibição parcial do transporte de elétrons no complexo III, resultando em um acúmulo de elétrons na coenzima Q. Este excesso de elétrons acumulados leva a uma redução parcial da molécula de oxigênio que acaba gerando o radical superóxido. Esta disfunção mitocondrial pode ilustrar a ligação existente entre os altos níveis de glicose e as principais rotas responsáveis por danos em proteínas e lipídeos que afetam diversas atividades biológicas como a proliferação celular e a apoptose (Rolo e Palmeira, 2006).

A produção mitocondrial do radical superóxido causa a inibição da enzima GAPDH (gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase) e, conseqüentemente, o acúmulo de intermediários da via glicolítica que, por sua vez, são capazes de ativar quatro importantes rotas diante de uma condição de hiperglicemia: I) a glicosilação de proteínas que produz produtos finais de glicação avançada (AGEs); II) aumento da via do sorbitol com uma conseqüente diminuição de NADPH, o cofactor da enzima antioxidante glutathione redutase, e outros produtos intermediários; III) aumento de atividade da via da hexosamina, na qual N-acetilglicosamina é formada; e IV) ativação da proteína quinase C (PKC) via síntese *de novo* de DAG (Schalkwijk e Sthehouwer, 2005).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a hiperglicemia relacionada ao DM1 resulta em disfunção do balanço redox em MSCs oriundas de pâncreas e rim de camundongos NOD diabéticos. Nossos resultados estão de acordo com estudos que defendem a relação entre o aumento da produção de ROS pela hiperglicemia e o dano ao tecido vascular o que tem sido relacionado ao desenvolvimento de uma grande variedade de microangiopatias e algumas macroangiopatias relacionadas ao diabetes (Kanasaki *et al*, 2013; Devi *et al*, 2013; Fu *et al*, 2012). Nossos dados mostram que MSCs oriundas

de pâncreas e rim de camundongos NOD diabéticos (NOD+) apresentam características de estresse oxidativo quando comparados a MSCs de camundongos controles NOD não diabéticos e BALB/c. Nós confirmamos a presença do estresse oxidativo através do aumento de espécies reativas no conteúdo celular, do desequilíbrio na atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e do aumento do conteúdo de grupos carbonila, o que confirmou a presença de dano oxidativo em proteínas.

A presença de um ambiente pró-oxidante intracelular que nós encontramos nas MSCs de camundongos NOD+ pode levar à ativação de defesas antioxidantes como um aumento da transcrição de genes de enzimas antioxidantes e/ou um aumento da atividade dessas enzimas. Estes mecanismos adaptativos protegem as células contra a toxicidade mediada por ROS e ajudam a manter o equilíbrio redox do tecido (Kaszubowska *et al*, 2011). A primeira enzima que participa na defesa antioxidante das células é a superóxido dismutase (SOD) que cataliza a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, desempenhando uma função crítica para a proteção das células. Por outro lado, um estresse oxidativo prolongado eventualmente diminui a atividade intracelular de SOD levando a um desequilíbrio redox e ao surgimento de danos oxidativos (Lee SH *et al*, 2012). Sendo assim, a diminuição na atividade da SOD em MSCs de pâncreas de camundongos NOD+ pode ser uma conseqüência de um estresse oxidativo crônico que pode resultar na redução de expressão ou atividade da própria SOD. Além disso, em uma condição de hiperglicemia, a glicose em excesso pode se auto-oxidar levando a um aumento da produção de radicais livres e um aumento na glicação de proteínas enzimáticas, incluindo a glicação da própria SOD. Um estudo mostrou que em eritrócitos de pacientes diabéticos, por exemplo, cerca de 50% da SOD estava glicada, o que resultou em uma atividade bastante diminuída (Kedziora-Kornatowska *et al*, 1998). Nós não podemos afirmar o porquê houve diminuição da atividade da enzima SOD nessas MSCs, mas de acordo com o que já sabemos sobre o estresse oxidativo relacionado à hiperglicemia, é possível que um aumento na produção de AGE possa estar relacionado à diminuição da atividade de enzimas antioxidantes.

Por outro lado, a atividade das enzimas CAT e GPx mostraram-se aumentadas nestas mesmas células (MSCs de pâncreas de animais diabéticos). Como uma quantidade significativa de DCF foi detectada nestas células, nós podemos afirmar a presença de um ambiente pró-oxidante que possui um aumento de espécies reativas como o H_2O_2 . Sabendo que o peróxido de hidrogênio é catalisado pela CAT ou pela GPx - na presença de glutathione reduzida (Lee SH *et al*, 2012), um aumento intracelular de H_2O_2 pode ser responsável pelo aumento na atividade das enzimas CAT e GPx. Além disso, o aumento significativo na atividade dessas enzimas pode ser uma consequência adaptativa em resposta ao aumento da concentração de substrato diante de um estresse oxidativo mediano o que explicaria porque NOD- apresentou uma atividade de GPx e CAT intermediárias (aumentadas em relação ao controle BALB/c, mas diminuídas em relação ao controle NOD+). Embora os camundongos NOD- não apresentem aumento nos níveis de glicose circulantes, eles apresentam uma susceptibilidade genética para o desenvolvimento do DM1 bem como, e a presença de um infiltrado linfocitário (insulite) a partir da quinta semana de vida (Signore *et al*, 1989). Estas características poderiam justificar o aumento da atividade de CAT e GPx como tratando-se de uma resposta adaptativa a um estresse oxidativo mediano causado pela inflamação presente nestes animais.

Apesar de apresentarem um aumento no conteúdo de espécies reativas bem como dano oxidativo em proteínas, as MSCs de camundongos NOD diabéticos oriundas do rim não apresentaram diferenças significativas em relação aos controles quanto à quantidade de atividade das enzimas SOD e CAT. Entretanto, estas células apresentaram uma diminuição na atividade de GPx que, como já foi discutido acima para a redução de atividade da SOD em MSCs de pâncreas, pode ser uma consequência do estresse oxidativo crônico que acaba afetando diversas proteínas, incluindo enzimas antioxidantes. No caso da GPx em particular, além do aumento na produção de AGE, que poderia estar afetando diretamente a atividade da enzima, nós também podemos ter um problema relacionado à disponibilidade do cofator da enzima GPx. O aumento da quantidade de glicose intracelular pode levar a um desvio desta para a via do sorbitol com uma consequente diminuição de NADPH e glutathione (Rolo e Palmeira, 2006). Sendo assim, a ausência de glutathione

reduzida (cofactor da enzima GPx) poderia ser responsável por diminuir ainda mais a atividade da GPx *in vivo*, levando a um desequilíbrio do padrão redox com o acúmulo de H₂O₂ e aumento de estresse oxidativo. Um estudo recente sobre doenças renais crônicas também demonstrou redução na atividade de GPx relacionada ao aumento de estresse oxidativo (Crawford *et al*, 2012).

A diferença nos mecanismos de defesa antioxidante em MSCs de pâncreas e rim de camundongos NOD+ pode ser um indicativo de diferentes respostas adaptativas destas células em relação ao surgimento do estresse oxidativo durante o diabetes. Ainda assim, é importante ressaltar que o objetivo deste trabalho não é explicar porque uma enzima está mais ativa do que outra ou vice versa, mas sim, investigar se a hiperglicemia presente na patologia do diabetes afeta as MSCs destes tecidos gerando um quadro de estresse oxidativo. Sendo assim, nossos resultados indicaram que o neste modelo de animal diabético (NOD+) temos um aumento de estresse oxidativo em MSCs de pelo menos dois diferentes tecidos: pâncreas e rim. MSCs oriundas de outros tecidos também deveriam ser investigadas em relação aos mesmos parâmetros, pois é provável que MSCs de diferentes nichos possam ser afetadas de formas diferentes. Além disso, é também importante enfatizar que não existe uma regra sobre o efeito causado pela hiperglicemia e que isso pode ser diferente em cada tecido. Trabalhos, já publicados na literatura, descrevem que diferenças na distribuição e na estrutura dos pericitos sugerem que eles tenham regras tecido ou vaso específicas o que apoia a nossa hipótese de que MSCs oriundas de diferentes tecidos podem apresentar alterações distintas diante de um estresse oxidativo (Hirschi e D'Amore, 1996).

Estresse oxidativo descreve uma condição patológica na qual existe um desequilíbrio entre produção de espécies reativas e defesas antioxidantes que pode levar a um aumento de espécies reativas e causar danos em lipídeos e proteínas. (Halliwell, 1999). O ensaio da dinitrofenilhidrazina é o método mais utilizado para a quantificação de grupos carbonilas em proteínas. Estes grupos podem aumentar em consequência da glicação de proteínas por açúcares, da ligação de aldeído às proteínas e da oxidação direta das cadeias laterais de aminoácidos por espécies reativas (Halliwell e Whiteman, 2004). Nossos resultados demonstram que tanto as MSCs de pâncreas quanto as de rim apresentaram um aumento na quantidade de grupos carbonilas no conteúdo

celular. Este dano protéico é uma consequência ao desequilíbrio redox visto nestas células. Analisados em conjunto, esses resultados confirmam a presença de estresse oxidativo em MSCs de camundongos NOD diabéticos.

Uma alteração da morfologia mitocondrial é freqüentemente vista em muitas condições patológicas, incluindo o diabetes. Mudanças na forma da mitocôndria, pela presença de um ambiente com altas concentrações de glicose pode alterar a organização estrutural e o arranjo de complexos da cadeia respiratória dentro da membrana, levando a perturbações na atividade da cadeia transportadora de elétrons e uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Moreira e Oliveira, 2011). Nossos resultados demonstram que existe uma mudança expressiva na morfologia ultra-estrutural das mitocôndrias oriundas de MSCs de NOD+. Alguns estudos, principalmente os relacionados ao diabetes tipo 2, defendem que mudanças morfológicas nas mitocôndrias são a causa do aumento da produção de ROS diante de um estímulo hiperglicêmico agudo, enquanto outros, afirmam que as alterações na morfologia mitocondrial podem atuar tanto como causa quanto como consequência do aumento de ROS (Rolo e Palmeira, 2006). De acordo com os nossos resultados, a disfunção na morfologia das mitocôndrias foi detectada em MSCs de NOD+ de ambos tecidos analisados o que não foi visto em MSCs dos camundongos controles (NOD- e BALB/c), apoiando a hipótese de que a alteração na morfologia mitocondrial está relacionada ao início do diabetes.

Dentre as alterações visualizadas por microscopia eletrônica, muitas mitocôndrias presentes em MSCs de camundongos NOD+ apresentaram uma disfunção morfológica conhecida como “inchaço mitocondrial (*swelling mitochondrial*, em inglês), o que tem sido associado com um aumento na produção de ROS e estresse oxidativo (Galindo *et al*, 2003). Este inchaço mitocondrial é definido como um aumento no volume da mitocôndria devido à entrada de fluídos, o que parece afetar a cadeia transportadora de elétrons, levando ao aumento na produção de ROS (Kaasik, *et al*, 2007).

Através dos nossos resultados, confirmamos a presença de estresse oxidativo pelo efeito da hiperglicemia nas células-tronco mesenquimais isoladas de pâncreas e rim e, considerando que a zona perivascular é o nicho das MSCs *in vivo* (da Silva Meirelles *et al*, 2008), acreditamos que outros tecidos possam também ter suas células afetadas de alguma forma. Apesar

dos nossos resultados indicarem um estresse oxidativo nas MSCs de camundongos diabéticos, nós não avaliamos a existência de uma possível adaptação destas células a esta condição. A busca por alterações nas características básicas destas células, como proliferação, adesão, capacidade de migração e diferenciação é de extrema importância para futuras terapias que visem o transplante de células-tronco autólogas em pacientes com DM1.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados, célula-tronco mesenquimais (MSCs) oriundas de camundongos diabéticos da linhagem NOD apresentaram um aumento nos níveis de espécies reativas (ensaio DCF-DA), alterações na atividade de enzimas antioxidantes e dano oxidativo em proteínas (ensaio dinitrofenilhidrazina) quando comparadas aos camundongos controles NOD não diabéticos e BALB/c. Estas três características associadas confirmam a presença de estresse oxidativo causado por um quadro de hiperglicemia crônica, característico do diabetes mellitus tipo 1 (DM1) que está associado a alterações no tecido vascular que favorecem o surgimento de micro e macroangiopatias.

6. PERSPECTIVAS

Existe uma justificada, intensa e constante pesquisa em torno do DM1 em todo o mundo, particularmente, para um melhor entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença e avanços na prevenção e no tratamento da mesma. Assim, com o objetivo de darmos continuidade a este estudo aperfeiçoando o desenho experimental, destacamos como perspectivas a avaliação da produção de ROS mitocondrial através de uma análise por MitoSOX e a avaliação da viabilidade celular através de um ensaio de MTT. Estes resultados poderiam nos dar um aporte maior para o entendimento do papel da disfunção mitocondrial nas MSCs de camundongos NOD diabéticos. A determinação do imunoconteúdo das enzimas SOD, CAT e GPx pelo ensaio de *western blotting* também é uma perspectiva que pretendemos realizar em breve. O resultado do imunoconteúdo destas enzimas complementaria os nossos resultados de atividade enzimática, justificando se os aumentos/decréscimos encontrados na atividade destas enzimas foram devido a mudanças na quantidade das mesmas, o que poderia suscitar a hipótese de um aumento na expressão gênica dessas enzimas. A determinação de dienosconjugados poderia ser útil para determinar com mais acurácia danos oxidativos a lipídios de membrana visto que o tratamento é feito em meio de cultura e é a membrana que primeiro deve lidar com as consequências do aumento na concentração de glicose. Também seria interessante o isolamento das proteínas de membrana e a determinação por *blotting* dos níveis de glicação das mesmas e dos imunoconteúdos de grupamentos carbonila.

Ainda, futuros estudos nesta área poderiam continuar investigando os intrigantes processos que envolvem as MSCs no DM1, avaliando a existência de uma possível adaptação destas células ao estresse oxidativo. Este possível defeito adaptativo poderia ser avaliado através da existência de alguma alteração nas características básicas destas células como proliferação, adesão, capacidade de migração e diferenciação.

7. REFERÊNCIAS

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell response. *Blood*. 2005; 105:1815-1822.

Albiero M, Avogaro A, Fadini GP. Restoring stem cell mobilization to promote vascular repair in diabetes. *Vascul Pharmacol*. 2013 28.pii: S1537-1891(13)00004-9.

Alipio Z, Liao W, Roemer EJ, Waner M, Fink LM, Ward DC, Ma Y. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 27;107(30):13426-31.

Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, 2001; 358: 221-229.

Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res*. 2009; 335(1):165-89.

Balda CA, Pacheco-Silva A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. *Revista da Associação Médica Brasileira*,1999; 45 (2): 175-80.

Banfi A, Muraglia A, Dozin B, *et al*. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cells therapy. *Exp Hematol*, 2000; 28:707-715.

Blyszczuk P, Asbrand C, Rozzo A Embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells without selection of nestin-expressing cells. *Int J Dev Biol*. 2004; 48:1095–1104.

Boyd AS, Wu DC, Higashi Y *et al*. A comparison of protocols used to generate insulin-producing cell clusters from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26:1128–1137.

Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414, 813–820.

Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007; 213:341-7.

Cesarini PR, Mendonça E, Fernandes V *et al*. Prevalência dos marcadores imunológicos anti-GAD e anti-IA2 em parentes de primeiro grau de diabéticos do tipo 1 em amostra da população da grande São Paulo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2003; 49(4): 395-400.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-49.

Chen W, Xie A, Chan L. Mechanistic basis of immunotherapies for type 1 diabetes mellitus. *Transl Res*. 2013 Jan 21. pii: S1931-5244(12)00453-7.

Cooper ME. Metabolic memory: implications for diabetic vascular complications. *Pediatr Diabetes*. 2009; 10(5):343-6.

Couri CE, de Oliveira MC, Simões BP. Risks, benefits, and therapeutic potential of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diabetes. *Curr Diab Rep*. 2012; 12(5):604-11.

Crawford A, Fassett RG, Coombes JS, Kunde DA, Ahuja KD, Robertson IK, Ball MJ, Geraghty DP. Relationship between antioxidant enzyme genotype and activity and kidney function: a case-control study. *Clin Nephrol*. 2012; 78(2):135-44.

Crisan M, Chen CW, Corselli M, Andriolo G, Lazzari L, Péault B. Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1176:118-23.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:301-313.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26(9):2287-99.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119:2204-13.

da Silva Meirelles L, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol*. 2003; 123:702-711.

Delovitch TL, Singh B. The Nonobese Diabetic Mouse as a Model of Autoimmune Diabetes: Immune Dysregulation Gets the NOD. *Immunity*. 1997; 7: 727-738.

Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *British Medical Journal*. 2004; 24, 328: 750-754.

Devi TS, Hosoya KI, Terasaki T, Singh LP. Critical role of TXNIP in oxidative stress, DNA damage and retinal pericyte apoptosis under high glucose: Implications for diabetic retinopathy. *Exp Cell Res*. 2013. pii: S0014 4827(13)00019-0.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S e Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002; 99:3838-3843.

DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R e Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*. 1999; 107:275-281.

Domínguez-Bendala J, Ricordi C. Present and future cell therapies for pancreatic beta cell replenishment. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(47): 6876–6884.

Dulmovits BM, Herman IM. Microvascular remodeling and wound healing: a role for pericytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44(11):1800-12.

Enge M, Bjarnegård M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalén M, Asker N, *et al.* Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO Journal* 2002; 21(16):4307–16.

Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78:83-8.

Fernandes APM, Pace AE, Zanetti ML, Foss MC, Donadi EA. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. *Rev Latino-am Enfermagem*, 2005; 13(5):743-9.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 1998; 279:528-530.

Ferraro F, Lymperi S, Méndez-Ferrer S, Saez B, Spencer JA, Yeap BY, Masselli E, Graiani G, Prezioso L, Rizzini EL, Mangoni M, Rizzoli V, Sykes SM, Lin CP, Frenette PS, Quaini F, Scadden DT. Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. *Sci Transl Med.* 2011; 3(104):104ra101.

Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol.* 2009; 183(2):993-1004.

Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* 2002; 84(2-3):131-41.

Fu D, Wu M, Zhang J, Du M, Yang S, Hammad SM, Wilson K, Chen J, Lyons TJ. Mechanisms of modified LDL-induced pericyte loss and retinal injury in diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 2012; 55(11):3128-40.

Galindo MF, Jordán J, González-García C, Ceña V. Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *Br J Pharmacol.* 2003; 139(4):797-804.

Geraldes P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, *et al.* Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nature Medicine* 2009; 15(11): 1298–306.

Giannini C, Dyck PJ. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann Neurol* 1995; 37:498-505.

Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999; 31(4):261-72.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141(2):312-22.

Halliwell, B. and M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 2004; 142(2): p. 231-55.

Hammes HP, Lin J, Renner O, *et al.* Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2002; 51:3107-3112.

Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res.* 1996; 32(4):687-98.

Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomilehto J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes* 2003; 52:1052.

Inverardi L, Kenyon NS, Ricordi C. Islet transplantation: Immunological perspectives. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:507 511.

Jack M, Wright D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Transl Res.* 2012; 159(5):355-65.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001; 107:1395-1402.

Jeon K, Lim H, Kim JH, Thuan NV, Park SH, Lim YM, Choi HY, Lee ER, Kim JH, Lee MS, Cho SG. Differentiation and transplantation of functional pancreatic beta cells generated from induced pluripotent stem cells derived from a type 1 diabetes mouse model. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(14):2642-55.

Kaasik A, Safiulina D, Zharkovsky A, Veksler Regulation of mitochondrial matrix volume. *V. Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1):C157-63.

Kanasaki K, Taduri G, Koya D. Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4:7.

Kaszubowska L, Kaczor JJ, Hak L, Dettlaff-Pokora A, Szarynska M, Kmiec Z. Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62: 101-109.

Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin

dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13(11):2829-32.

Kimpimäki T, Kupila AHämäläinen, AM, Kukko M, Kulmala P, Savola K, *et al*. The first signs of β -cell autoimmunity appear in infancy in genetically susceptible children from the general population: the Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (2001); 4782–4788.

Knip M. & Siljander H. Autoimmune Mechanisms in Type 1 Diabetes. *Autoimmune Reviews*, 2008; 7: 550-557.

Koczwara K, Schenker M, Schmid S, Kredel K *et al*. Characterization of antibody responses to endogenous and exogenous antigen in the nonobese diabetic mouse. *Clinical Immunology*, 2003; 106: 155-162.

Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science*, 2003; 302: 1223- 1227.

Kulmala P, Savola K, Reijonen H, *et al*. Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes* , 2000; 49:48-58.

Kulmala P. Prediabetes in children: natural history, diagnosis and preventive strategies. *Pediatric drugs*, 2003; 5(4): 211-21.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL e Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nature Med*, 2000; 6(11):1229-1234.

Lassila M, Seah KK, Allen TJ, Thallas V, Thomas MC, Candido R, Burns WC, Forbes JM, Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Accelerated nephropathy in diabetic apolipoprotein e-knockout mouse: role of advanced glycation end products. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(8):2125-38.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE e Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 2003; 57:11-20.

Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, *et al*. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:17438-43.

Lee SH, Park MH, Park SJ, Kim J, Kim YT, Oh MC, Jeong Y, Kim M, Han JS, Jeon YJ. Bioactive compounds extracted from *Ecklonia cava* by using enzymatic hydrolysis protects high glucose-induced damage in INS-1 pancreatic β -cells. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012; 167(7):1973-85.

Li L, Shen S, Ouyang J, Hu Y, Hu L, Cui W, *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation modulates immunocompetent cells and improves β -cell function in Chinese patients with new onset of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97:1729–36.

Liu E, Eisenbarth GS. Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002; 31:391-410.

Liu J, Lu XF, Wan L, *et al.* Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line. *Transplant Proc.* 2004; 36:3272-3275.

Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, Thivolet C. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia.* 2009; 52(7):1391-9.

Matarese G, Sanna, V, Lechler R, *et al.* Leptin Accelerates Autoimmune Diabetes in Female NOD Mice. *Diabetes.* 2002; 51(5):1356-1361.

Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., Macarthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N., Frenette P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010; 466:829–834.

Milech A, Oliveira JEP. *Diabetes Mellitus – Clínica, Diagnóstico, Tratamento Multidisciplinar.* São Paulo: Atheneu; 2004.

Miller AG, Zhu T, Wilkinson-Berka JL. The Renin-Angiotensin System and Advanced Glycation End-Products In Diabetic Retinopathy: Impacts and Synergies. *Curr Clin Pharmacol.* 2012.

Moreira PI, Oliveira CR. Mitochondria as potential targets in antidiabetic therapy. *Handb Exp Pharmacol.* 2011; (203):331-56.

Moshtagh PR, Emami SH, Sharifi AM. Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell into insulin producing cells: an *in vitro* study. *J Physiol Biochem* (2012).

Obayashi H, Hasegawa G, Fukui M, *et al.* Tumor necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1*1502-DQB1*0601 allele and anti glutamic acid decarboxylase antibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:3348-51.

Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2002; 72:570-585.

Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, *et al.* Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol.* 2002; 30:783-791.

Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B e Le Blanc K . Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, 2003; 76:1208-1213.

REDCDM. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2003; 26 Suppl :5-20.

Rewers M, Klingensmith GJ. Prevention of Type 1 Diabetes. *Diabetes Spectrum*, 1997; 10(4): 282-292.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 2009; 84(21-22):705-12.

Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*, 46 (2003); 305–321.

Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 212(2):167-78.

Rosmalen JGM, Leenen PJM, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 2002; 13(5): 209-214.

Roy S, Sala R, Cagliero E, Lorenzi M. Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 404–408.

Ruggeri L, Capanni M, Martelli MF e Velardi A. Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Curr Opin Hematol*, 2001; 8(6):355359.

Ryan EA, Lakey JR, Paty, BW, Imes S, Korbitt GS, Kneteman NM *et al*. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes*, 51 (2002); 2148–2157.

Schaan BD. O Papel da Proteína Quinase C no Desenvolvimento das Complicações Vasculares do Diabetes Mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003; 47(6):654-662.

Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. 2005; 109(2):143-59.

Sesterheim P, Saitovitch D, Staub HL. Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogenia auto-imune *Scientia Medica*, Porto Alegre, 17(4):212-217; 2007.

Signore A, Pozzilli P, Gale EA, Andreani D, Beverley PC. The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. *Diabetologia*. 1989; 32(5):282-9.

Stanekzai J, Isenovic ER, Mousa SA. Treatment options for diabetes: potential role of stem cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012; 98(3):361-8.

Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(3-4):243-70.

Stratman AN, Davis GE. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. *Microsc Microanal.* 2012; 18(1):68-80.

Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010; 11(1):61-74.

Tilton RG, Failer AM, Hoffman PL, Kilo C, Williamson JR. Acellular capillaries and increased pericyte degeneration in the diabetic extremity. *Front Diabetes* 1987; 8:186-9.

Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, *et al.* Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2007; 39: 857–864.

Tracy S, Drescher KM, Jackson JD, Kim K, Kono K. Enteroviruses, type 1 diabetes and hygiene: a complex relationship. *Rev. Med. Virol.* 2010; 20:106.

Tzakis AG, Ricordi C, Alejandro R, *et al.* Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. *The Lancet.* 1990; 336(8712): 402–405.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Silva MAM, Gomes ACM. Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. *Rev Bras Hipertens.* 2007;14(4):269-74.

Vojtassak J, Danisovic L, Kubes M, Bakos D, Jarabek L, Ulicna M, *et al.* Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27(Suppl) 2:134-7.

Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, *et al.* Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA.* 2007; 297:1568–76.

Watt FM, Hogan BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000; 287:1427-1430.

Yuan SM, Chen RL, Shen WM, Chen HN, Zhou XJ. Mesenchymal stem cells in infantile hemangioma reside in the perivascular region. *Pediatr Dev Pathol.* 2012; 15(1):5-12.

Zacccone P, Raine T, Sidobre S, Kronenberg M, Mastroeni P, Cooke A. *Salmonella typhimurium* infection halts development of type 1 diabetes in NOD mice. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34:3246.

Zhang N, Li J, Luo R, Jiang J, Wang JA. Bone marrow mesenchymal stem cells induce angiogenesis and attenuate the remodeling of diabetic cardiomyopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116:104-11.

8. ANEXO I
- MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY -
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS