

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-graduação em Bioquímica

**Células estromais mesenquimais diferenciadas em células produtoras de
insulina: estratégia de neuroproteção em modelo diabético**

Krista Minéia Wartchow

Orientador: Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Coorientadora: Dra. Patrícia Sesterheim

Porto Alegre
Novembro de 2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-graduação em Bioquímica

**Células estromais mesenquimais diferenciadas em células produtoras de insulina:
estratégia de neuroproteção em modelo diabético**

Krista Minéia Wartchow

Orientador: Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Coorientadora: Dra. Patrícia Sesterheim

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Bioquímica.

Porto Alegre

Novembro de 2019

CIP - Catalogação na Publicação

WARTCHOW, KRISTA MINÉIA

Células estromais mesenquimais diferenciadas em células produtoras de insulina: estratégia de neuroproteção em modelo diabético / KRISTA MINÉIA WARTCHOW. -- 2019.

161 f.

Orientador: Carlos Alberto Gonçalves.

Coorientadora: Patrícia Sesterheim.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Diabetes. 2. Células Estromais Mesenquimais. 3. Neuroproteção. 4. Adipócitos. 5. S100B. I. Gonçalves, Carlos Alberto, orient. II. Sesterheim, Patrícia, coorient. III. Título.

Das Utopias

(Mário Quintana)

Se as coisas são inatingíveis... ora!

Não é motivo para não querê-las...

Que tristes seriam os caminhos

Sem a mágica presença das estrelas!

Dedicatória

Dedico esta tese a minha família, que sempre acreditou em mim e sempre sonhou junto comigo. Obrigada, Pai, Mãe, William e Christian por nunca desistirem de mim e sempre estarem do meu lado.

“Você nunca achará o arco íris, se estiver olhando para baixo.” Charles Chaplin

RESUMO

O diabetes melito tipo 1 (DM1) resulta da imunomediada destruição das células beta pancreáticas. Dentre as terapias experimentais vigentes, destaca-se o uso de células estromais mesenquimais (MSCs) transdiferenciadas em células produtoras de insulina (CPIs). Embora existam vários protocolos experimentais de diferenciação em CPIs, sua complexidade, baixa taxa de eficiência e funcionalidade exigem maiores estudos e alterações estratégicas. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico das MSCs oriundas de tecido adiposo epididimal diferenciadas em CPIs na reversão do DM1 e neuroproteção em ratos Wistar Kyoto (WKY). A primeira fase deste estudo (*in vitro*) constituiu-se em caracterizar as células estromais mesenquimais adipoderivadas (ADSCs) e submetê-las a três diferentes protocolos de diferenciação em CPIs. As células expostas ao meio de cultura enriquecido com nicotinamida/exendin-4/activina A apresentaram o melhor perfil secretório, com características endócrinas de CPIs. Na segunda fase *in vivo*, para avaliação da funcionalidade das CPIs em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, as células foram implantadas em dois sítios distintos: subcapsular renal (SR) e subcutâneo (SC). Após duas semanas de implantação das células, em ambos sítios anatômicos, foi observada uma diminuição da hiperglicemia. Ainda, as células implantadas no sítio SC melhoraram o desempenho cognitivo e a reatividade astrogliar hipocampal. Adicionalmente, usando células GFP+, podemos observar a permanência das células implantadas nos diferentes sítios, além da migração para o pâncreas e hipocampo. O desenvolvimento de uma população ainda heterogênea, composta de CPIs, mas também de ADSCs indiferenciadas, poderia ajudar a explicar a redução periférica dos AGEs (por depuração autofágica) e a recuperação do comprometimento cognitivo (por imunomodulação no hipocampo). Juntos, esses dados reforçam a importância das CPIs nas estratégias neuroprotetoras, bem como apontam a importância da via de implante no tratamento do DM1. Paralelamente, estudamos, além da capacidade de transdiferenciação e potencial neuroprotetor, a diferenciação adipogênica ortodoxa das ADSCs se apresentando como ferramenta importante no estudo da expressão, da secreção e da propriedade do tipo adipocina da S100B.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is an autoimmune disease characterized by the destruction of insulin-producing pancreatic β cells. Among the current experimental therapies, we highlight the use of transdifferentiated mesenchymal stromal cells (MSCs) into insulin-producing cells (IPCs). Despite the fact that there are several differentiation protocols in IPCs, there is still a need for further study and modification of induction strategies due to long, complex protocols with low efficiency and functionality rates. Thus, the present study aims to evaluate the therapeutic potential of differentiated adipose mesenchymal stromal cells in IPCs in the reversal of DM1 in Wistar Kyoto rats in DM1. The first phase of this study (*in vitro*) was to characterize adipose-derived stromal cells (ADSCs) and to evaluate the best protocol for their differentiation in IPCs. For this, ADSCs isolated from epididymal adipose tissue of Wistar-Kyoto rats were submitted to three different differentiation protocols. The secretory profile was analyzed and the IPCs differentiated in the presence of nicotinamide / exendin-4 / activin A showed the best secretory profile. The second phase was to assess the functionality of the IPCs *in vivo*. The cells were implanted in two distinct sites: Subcapsular renal (SR) and Subcutaneous (SC). Finally, we observed that the implantation of IPCs caused a decrease in hyperglycemia after two weeks of implantation in DM1 rats at both implantation regions. The cells implanted in SC improved cognitive impairment (assessed by object recognition) and hippocampal astroglial reactivity (assessed by S100B and GFAP). Using GFP + cell implants, we could observe survival at implant sites, but also cell migration to the pancreas and hippocampus. The presence of undifferentiated ADSCs in our preparation of IPCs could help explain peripheral reduction of AGEs (by autophagic clearance) and recovery of cognitive impairment (by hippocampal immunomodulation). Together, these data reinforce the importance of IPCs in neuroprotective strategies, as well as the logistical importance of the subcutaneous route for its administration in the treatment of DM1. In addition to the neuroprotective potential of ADSCs, they are useful for differentiation into adipocytes and study of S100B expression and secretion, which is being characterized as a new adipokine.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADSCs	Células estromais derivadas de tecido adiposo
A-FABP	Proteínas de ligação a ácidos graxos
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AKT	Proteína cinase B
AMPc,	Adenosina 3,5-monofosfato cíclica
Beta 2	Transativador 2 de células beta
BM-HSCs	Células tronco hematopoéticas derivadas da medula óssea
CPIs	Células produtoras de insulina
CT	Células tronco
DA	Doença de Alzheimer
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DPSCs	Células estromais mesenquimais derivadas de polpa dentária
DTZ	Ditizona
ERKs	Cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESCs	Células tronco embrionárias
EX-4	Exendina-4
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT	Transportador de glicose
IMC	Índice de massa corporal
iPSCs	Células tronco pluripotentes induzidas
IRS-1	Substrato do receptor de insulina
IV	Via intravenosa
JNK	Cinase c-Jun N-terminal

LY294002	Inibidor da PI3K
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MO	Medula óssea
MSCs	Células estromais mesenquimais adultas
p38	Cinase N -terminal
PARP	poli-ADP-ribose polimerase
PDX-1	homeobox 1 pancreático e duodenal
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
RO	Teste de reconhecimento de objetos
RSV	Resveratrol
SB2003580	Inibidor da p38
SC	Espaço subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS3	Supressor da sinalização de citocinas 3
SR	Espaço subcapsular renal
STAT-3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
STZ	Estreptozotocina
TLR-2	Receptor Toll-like tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WJ-MSCs	Células estromais mesenquimais Wharton's Jelly

APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada em seções organizadas da seguinte maneira: *Introdução, Resultados* (Capítulo I, Capítulo II, Capítulo III), *Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas*.

Na *Introdução*, são apresentados os temas estudados, a fundamentação teórica que nos levou ao desenvolvimento deste trabalho e os focos de estudo, descritos no item *Objetivos*.

A seção de *Resultados* está dividida em três capítulos, de acordo com os diferentes focos de estudo. Em cada capítulo estão descritos os materiais e métodos utilizados bem como os resultados obtidos, sendo o primeiro capítulo o artigo científico publicado.

Capítulo I: *Short-term protocols to obtain insulin-producing cells from rat adipose tissue: signaling pathways and in vivo effect*; Este capítulo refere-se aos objetivos 1 a 4.

Capítulo II: *Insulin-Producing cells from Adipose-derived mesenchymal stromal cells: Protection against cognitive impairment in diabetic rats depends on implant site*; Este capítulo refere-se aos objetivos 5 e 6.

Capítulo III: *Estudo da expressão e secreção da S100B em adipócitos derivados de ADSC: dados preliminares*. Este capítulo refere-se ao objetivo 7.

A *Discussão* contém a argumentação bibliograficamente embasada da interpretação e da importância dos resultados obtidos nos três capítulos. A seção *Conclusões* aborda as hipóteses concluídas na tese. Nas *Perspectivas*, estão elucidados os próximos passos para que o capítulo III seja complementado e publicado na forma de artigo científico, bem como as novas abordagens suscitadas pela tese que podem

ser investigadas a fim de colaborar com capítulo II e a linha de estudo. A seção *Referências Bibliográficas* lista elementos bibliográficos utilizado na redação da tese.

SUMÁRIO

PARTE I

1 Introdução.....	14
1.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1	14
1.2 ALTERAÇÕES CENTRAIS NO DIABETES TIPO 1	15
1.3 TERAPIAS PARA O DIABETES TIPO 1.....	18
1.4 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS.....	21
2 Objetivos	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27

PARTE II

3 Capítulo 1.....	29
4 Capítulo 2.....	48
5 Capítulo 3.....	89

PARTE III

6 DISCUSSÃO.....	117
7 CONCLUSÕES	138
8 PERSPECTIVAS	139
9 REFERÊNCIAS	140

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1

O diabetes mellitus (DM) afeta em torno de 36 milhões de pessoas de todas as idades de acordo com a *Federação Internacional de Diabetes*, sendo o diabetes tipo 1 (DM1) responsável por 10% do total da população diabética (“International Diabetes Federation - Type 1 diabetes,” n.d.). Caracterizada por ser uma doença multifatorial dependente da complexa interação entre fatores genéticos predisponentes, resposta imunológica e influência do meio-ambiente, o DM1 é uma doença autoimune crônica em que as células T CD4 + e CD8 + se infiltram nas ilhotas de Langerhans, resultando na destruição das células- β pancreáticas (van Belle et al., 2011) e conseqüentemente na perda da produção e secreção de insulina (Chhabra and Brayman, 2013a).

Considerada uma das doenças crônicas mais comuns entre crianças e adultos jovens, o DM1 pode se desenvolver em qualquer faixa etária, sendo mais frequente antes dos 20 anos de idade. O entendimento dos aspectos envolvidos no desenvolvimento desta patologia constitui a base para a detecção e prevenção do DM1 e, 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. No período de manifestação da doença, com a presença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já estão em número muito reduzido ou praticamente ausentes (Balda and Pacheco-Silva, 1999).

O efeito comum do DM1 é a hiperglicemia, a qual pode induzir diversas alterações, tais como a auto-oxidação da glicose, a geração de produtos finais de glicação avançada (AGEs), o desequilíbrio entre a geração de radicais livres e defesas antioxidantes, distúrbios vasculares, inflamação, além de alterações na homeostase do

cálcio e o aumento da peroxidação lipídica (Beauquis et al., 2010; Gispen and Biessels, 2000a; Parvizi et al., 2014). A hiperglicemia leva a complicações macro e microvasculares. As complicações macrovasculares incluem obstruções dos vasos, como doenças das artérias coronárias, aterosclerose e doenças vasculares periféricas. Enquanto que as microvasculares incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia, levando à cegueira, insuficiência renal e até amputações (Chilelli et al., 2013).

Experimentalmente, o agente de indução de DM1 mais empregado em modelos animais é a estreptozotocina (STZ), uma nitrosamida metilnitrosureia ligada a uma D-glicose, isolada a partir da bactéria *Streptomyces achromogenes*, que entra seletivamente na célula β através do transportador de glicose GLUT2 (Karunanayake et al., 1976; Tjälve et al., 1976), destruindo permanentemente as células pancreáticas produtoras de insulina, originando assim, um quadro de diabetes (Baydas et al., 2003). O mecanismo de ação consiste na captação de STZ pelas células β , gerando N-nitrosureido o qual causa a fragmentação do DNA celular, seguida da ativação de uma enzima de reparo, a poli-ADP-ribose-polimerase (PARP), consumindo NAD^+ e promovendo a formação de radicais livre causando a morte celular (Szkudelski, 2001; Uchigata et al., 1982). Em fases posteriores, o diabetes induzido por STZ em ratos, na dose em que é administrada (50-100mg/Kg), pode ocasionar perda de peso significativa, possivelmente como resultado dos efeitos catabólicos da deficiência de insulina e hiperglicemia grave, bem como a depleção de volume corporal associada à diurese osmótica (Kitada et al., 2016).

1.2. ALTERAÇÕES CENTRAIS NO DIABETES TIPO 1

A mortalidade e a morbidade do DM são determinadas por diversas complicações como vasculopatia, retinopatia, nefropatia, e neuropatia periférica (Rathmann and Giani,

2004). Recentemente, muitos estudos têm indicado que o DM também possui implicações no sistema nervoso central (SNC), designadas respectivamente por um tipo de encefalopatia diabética que é uma complicação do DM caracterizado por déficit cognitivo leve e neuropatologia (Bauduceau et al., 2010; Morsi et al., 2018; Zhou et al., 2013). Encefalopatia diabética apresenta diversos sintomas, os quais podem ser descritos como características de envelhecimento do cérebro, incluindo a atrofia, a acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs), vasculopatia cerebral e comprometimento da cognição (Baquer et al., 2009). A observação clínica tem demonstrado que a atrofia do cérebro é mais notável em pacientes diabéticos do que em pacientes controles (Ho et al., 2011).

No DM, a hiperglicemia é uma das principais causas da disfunção endotelial e precursora de complicações microvasculares (Kade and Rocha, 2013) que podem contribuir a déficits funcionais e cognitivos em regiões cerebrais específicas, como, por exemplo, o hipocampo (Gandhi et al., 2010). A glicotoxicidade resultante da hiperglicemia está entre as principais causas das complicações do DM1 (Wu and Yan, 2015).

O DM1 está associado a vários efeitos adversos no SNC, incluindo alterações no metabolismo energético cerebral, aumento dos níveis de cálcio livre, bem como aumentos mediados pela glicose no estresse oxidativo e na inflamação, possivelmente mediados pelos AGEs (Amin et al., 2013; Lebed et al., 2008). Estudos neuroanatômicos mostraram que modelos animais para diabetes e para demência compartilham neuropatia semelhante no hipocampo, incluindo neurogênese adulta suprimida no giro dentado do hipocampo (DG) e atrofia dendrítica e comprometimento cognitivo (Kandimalla et al., 2018; Mufson

et al., 2015). Além disso, o DM1 está associado a um risco aumentado de doença de Alzheimer (DA) e outras demências (Jolivald et al., 2010).

Dados experimentais sugerem que a deficiência na aprendizagem está associada com as alterações na plasticidade sináptica no hipocampo em modelo animal induzido por STZ (Zhang et al., 2008). O trabalho desenvolvido por Wang e colaboradores observou que os animais com diabetes induzido por STZ apresentavam o metabolismo alterado, incluindo hiperglicemia e hiperlipidemia seguinte a uma deficiência de insulina, além de atrofia hipocampal e neurodegeneração, com um prejuízo cognitivo e deposição de β -amilóide (Wang et al., 2014). Além disso, níveis de xantina oxidase e óxido nítrico no hipocampo, córtex, cerebelo, tronco cerebral e na medula espinhal aumentaram significativamente nos ratos diabéticos induzidos por STZ, sugerindo notável geração de EROs no SNC (Calabrese et al., 2012).

Willem Hendrik Gispen e Geert-Jan Biessels sugeriram que a hiperglicemia está associada com a disfunção cognitiva leve em populações com o DM tipo 1 ou tipo 2 (Gispen and Biessels, 2000b). Outro estudo sugeriu que a insulina está envolvida na patogênese do declínio da memória e da encefalopatia diabética (Cholerton et al., 2011), podendo atuar como um neuromodulador que regula a liberação e recaptação dos neurotransmissores e, provavelmente, afeta o aprendizado e a memória (Watson et al., 2006).

Ainda, estudos revelaram que prejuízos na utilização da glicose cerebral e do metabolismo de energia representam alterações precoces que precedem ou acompanham os estágios iniciais do comprometimento cognitivo (Cunnane et al., 2011). A deficiência na utilização de glicose cerebral e diminuição de sinalização da insulina são características comuns entre o DM e a doença de Alzheimer (DA) (Götz et al., 2009).

O DM1, além de promover dano neurovascular, aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, é capaz de afetar o número e a morfologia das células astrocíticas (Parpura et al., 2012). Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC, com funções que vão desde fornecer nutrientes, regular a função metabólica neuronal e atuar na homeostase do SNC até controlar a formação e a manutenção de sinapses e circuitos neuronais (Liu et al., 2017; Parpura et al., 2012). Ainda, se tornam reativos em resposta a numerosas lesões no SNC, modificando a morfologia celular e a expressão de marcadores específicos (Pekny and Pekna, 2014).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a proteína S100B são marcadores astrocíticos de atividade e lesão cerebral em várias doenças neuropsiquiátricas (Gonçalves et al., 2008). A S100B intracelular interage com várias proteínas alvo (por exemplo, GFAP (Ziegler et al., 1998)), modulando a atividade astroglial enquanto que a S100B extracelular atua em receptores para AGEs (Nathan et al., 2008), podendo atuar como uma neurotrofina ou citocina inflamatória dependendo da situação e contexto (Donato et al., 2009; Kleindienst et al., 2007). No DM1, a redução na expressão de GFAP em astrócitos está associada à secreção lábil de insulina e aumento da proteína S100B (Coleman et al., 2010).

1.3. TERAPIAS PARA O DIABETES TIPO 1

O DM1 afeta drasticamente a saúde, o bem-estar e a qualidade de vida, uma vez que pacientes diagnosticados com diabetes são três vezes mais suscetíveis a hospitalização devido a complicações a longo prazo (Rossing et al., 1998). Além disso, apesar de os tratamentos clássicos melhorarem drasticamente a hiperglicemia, a vida útil de jovens com DM1 diminui de 1 a 13 anos em comparação com a população, indicando que o desenvolvimento de novas terapias para pacientes com DM1 é realmente urgente

(Livingstone et al., 2015).

A administração de insulina exógena através de injeções diárias ou bombas computadorizadas continuam sendo o tratamento mais proeminente oferecido aos pacientes com DM1. A administração exógena de insulina aumenta significativamente a expectativa de vida e ajuda a normalizar a glicose sanguínea, mas a falta de resposta fisiológica leva a episódios de hiperglicemia. Contudo, além de não ser uma terapia de cura, a insulino terapia subcutânea pode ocasionar lipodistrofia, além de expor os pacientes a episódios de hipoglicemia, um dos piores efeitos colaterais desse tratamento (Aye and Atkin, 2014).

Dentre as estratégias de tratamento definitivo, corrigindo a insulino dependência para o DM1, podemos citar o transplante de pâncreas, o transplante de ilhotas pancreáticas e, mais recentemente, o bloqueio da autoimunidade e a terapia celular baseada na utilização de células-tronco (Aghazadeh and Nostro, 2017).

O transplante total de pâncreas e de ilhotas podem ser eficazes como tratamento para DM1, no entanto, eles são limitados pela escassez de doadores e pela imunossupressão ao longo da vida. Devido aos riscos associados ao regime imunossupressor, esses tipos de tratamentos são recomendados apenas para pacientes que apresentam episódios frequentes de hipoglicemia e/ou insuficiência renal secundária ao DM1. Portanto, o transplante de pâncreas é recomendado quando associado ao transplante renal, responsável por apenas 0,001% dos pacientes com DM1 (Gruessner and Gruessner, 2016).

O transplante de ilhotas foi introduzido inicialmente em 1989 por Warnock e Scharp e permaneceu ineficiente entre 1990 e 2000, onde, dos 267 receptores de transplantes de ilhotas, apenas 8,2% permaneceram independentes da insulina exógena

após 1 ano (Warnock et al., 1988). Alguns anos depois Shapiro et al. introduziu o “protocolo de Edmonton” que levou à independência da insulina 1 ano após o transplante das ilhotas (Shapiro et al., 2000). Desde então, a purificação de ilhotas e a preservação da massa celular foram significativamente melhorados. No entanto, grandes desafios ainda permanecem, como uma perda de ilhota de 60% instantaneamente após infusão e a perda adicional de ilhotas a longo prazo (Biarnés et al., 2002).

Assim, a necessidade de suprimento ilimitado de um substituto para as células β levou a aumentar os esforços para introduzir outras fontes potenciais de tratamento para o DM1, tais como as células-tronco (CTs). Em 1963 Becker e colaboradores definiram que as CTs poderiam se diferenciar em vários tipos celulares em resposta a sinais apropriados e com capacidade de se regenerar. As CTs podem ser classificados como CTs embrionárias, CTs pluripotentes induzidas (iPSCs), CTs hematopoiéticas derivadas da medula óssea (BM-HSCs), células estromais mesenquimais adultas (MSCs) (Pittenger et al., 1999).

As estratégias baseadas na utilização de MSCs representam um potencial terapêutico significativo, tanto pela capacidade regenerativa intrínseca como pelas propriedades imunomoduladoras que são aproveitadas para impedir a destruição das células β , preservando a massa residual e facilitando a regeneração tecidual no DM1 (Chhabra and Brayman, 2013). O principal objetivo da terapia celular no DM1 é obter controle glicêmico estável, ausência de episódios hipoglicêmicos graves, melhorando assim a qualidade de vida e complicações diabéticas de longo prazo. A independência da utilização de insulina, embora desejável, não é necessariamente o objetivo primário da terapia celular, embora uma redução significativa na necessidade de insulina e a

restauração da secreção do peptídeo C sejam desejáveis (Thakkar et al., 2017).

1.4. CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

As células estromais mesenquimais (MSCs) são consideradas células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo a medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos (da Silva Meirelles et al., 2008; Mambelli et al., 2009). As MSCs caracterizam-se por serem uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar de forma limitada em células especializadas necessárias num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, adipócitos, hepatócitos, neurônios, dentre outras (Pittenger et al., 1999). Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo *turnover* e pela manutenção de todos os tecidos do organismo (Caplan, 2009). Vale ressaltar que as MSCs não são uma população pura de células-tronco. Os critérios da Sociedade Internacional para Terapia Celular realmente descrevem que as MSCs são uma mistura heterogênea e não-clonal de células-tronco multipotentes, células progenitoras e células diferenciadas. Este fato provocou uma mudança na nomenclatura de "células tronco mesenquimais" a "células estromais mesenquimais" para melhor refletir heterogeneidade, embora os termos ainda sejam usados de forma intercambiável (Squillaro et al., 2016; Viswanathan et al., 2019).

As MSCs cultivadas *in vitro* possuem três propriedades biológicas que as qualificam para utilização em terapia celular: (a) amplo potencial de diferenciação; (b) secreção de fatores tróficos que favorecem a remodelação de tecidos; e (c) propriedades imunorreguladoras (Ma et al., 2014; Oliveira, 2017). Estas características fazem das MSCs ferramentas potenciais em muitas condições. Além disso, as MSCs exibem

morfologia fibroblastoide, adesão em substrato plástico, autorrenovação e diferenciam-se em diferentes linhagens mesodérmicas (Meirelles and Nardi, 2003; Pittenger et al., 1999).

As MSCs expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células (Bobis et al., 2006). Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, a angiogênese e diferenciação das células envolvidas no processo de reparação tecidual. Além disso, as MSC secretam uma grande variedade de quimiocinas, além de expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento (Caplan, 2009).

Tais características que envolvem plasticidade, secreção de citocinas e fatores de crescimento com efeitos parácrinos (Phinney and Prockop, 2007; Ma et al., 2014;), função imunorreguladora (Prockop and Oh, 2012; Oliveira, 2017) favorecem a regeneração de tecidos e sua aplicabilidade clínica. As MSCs são naturalmente liberadas na circulação quando os tecidos possuem alguma injúria, migram para o local da lesão e secretam moléculas para criar um microambiente e assim promover a regeneração, chamada de capacidade de “*homing*” (Caplan, 2009; Chapel et al., 2003; Ullah et al., 2019).

Seguindo as recomendações das revisões anteriores, tomamos o termo “*homing*” para abranger tanto o “*homing* sistêmico” quanto “*homing* não sistêmico” (Nitzsche et al., 2017). No “*homing*” não sistêmico, as MSCs são transplantadas localmente no tecido alvo e são então guiados para o local da lesão através de um gradiente de quimiocina. No “*homing*” sistêmico, as MSCs são administradas ou endogenamente recrutadas para a corrente sanguínea e, em seguida, devem passar por um processo de várias etapas para sair da circulação e migrar para o local da lesão. O processo de “*homing*” sistêmico pode ser

dividido em cinco etapas: (1) ancoragem, (2) ativação, (3) “arrest” (apoio), (4) transmigração ou diapedese, e (5) migração (Sackstein, 2005).

Dentre as fontes de células estromais mesenquimais, se destacam as células derivadas de tecido adiposo. Em 2004, a *Fat Applied Technology Society* chegou a um consenso para adotar o termo células estromais derivadas de tecido adiposo,- do inglês ADSCs (Bunnell et al., 2008). O tecido adiposo é um tecido altamente complexo composto por adipócitos maduros (mais de 90%) e uma fração vascular estromal, que inclui fibroblastos, pré-adipócitos, células musculares lisas vasculares, células endoteliais, células imunes (monócitos/macrófagos, linfócitos) e as ADSCs (Yoshimura et al., 2009).

Similarmente à medula óssea e outros tecidos, as MSCs do tecido adiposo têm capacidade de auto-renovação e um amplo potencial de diferenciação como adipogênica, condrogênica, osteogênica, miogênica, angiogênica, neurogênica e cardiomiogênica (Strem et al, 2005). A taxa de sucesso de isolamento é de 100% e o rendimento do tecido adiposo é 40 vezes maior que a medula óssea (Kern et al, 2006). Além da fácil obtenção, tais características tornam o tecido adiposo uma fonte rica de células-tronco.

1.4.1. POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EM CÉLULAS PRODUTORAS DE INSULINA (CPI)

O processo através do qual células precursoras se diferenciam em outros tipos celulares, não relacionados ao seu tecido original, é chamado de transdiferenciação (Zhang et al., 2004). Estratégias para induzir esta transdiferenciação se assemelham às usadas nos protocolos baseados em células embrionárias. Contudo, a transdiferenciação em células β a partir de células-estromais mesenquimais é direcionada por determinantes ainda desconhecidos, que incluem interações célula-célula, sinais da matriz extracelular

e a presença de combinações de fatores de crescimento, hormônios, citocinas e nutrientes (Roche et al., 2003). Diversos estudos mostram que, em ambientes adequados, as MSCs são capazes de se diferenciar em células de tecido mesodermal, ectodermal e até mesmo células da linhagem endodérmica, incluindo as células produtoras de insulina.

As MSCs expressam um conjunto de receptores de quimiocinas, que podem desempenhar um papel crítico na regeneração do pâncreas (Sordi et al., 2005). A administração sistêmica de MSCs aumentou o conjunto de células β e reverteu a hiperglicemia em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Ezquer et al., 2008). No entanto, não está claro se as MSCs podem se diferenciar diretamente em células β , ou se novas células β podem ser geradas a partir das células β pré-existentes, ao invés de MSCs. Os autores concluíram que MSCs apenas serviram como um mediador trófico para dar suporte à função das ilhotas de forma indireta, tais como a promoção da angiogênese (Dor et al., 2004).

Embora os estudos *in vivo* não favoreçam as MSCs como uma fonte de células β , *in vitro*, muitas tentativas bem-sucedidas têm sido feitas para diferenciar as MSCs em células produtoras de insulina (CPIs). Atualmente, existem dois métodos comumente usados para induzir a diferenciação de MSCs em CPIs *in vitro*. Um deles é a introdução de fatores reguladores chave da transcrição, como estimuladores do genehomeobox 1 pancreático e duodenal (PDX-1) e transativador 2 de células β (Beta2), por engenharia genética para modular a expressão gênica. A outra é fornecer indutores solúveis específicos ou compostos de moléculas pequenas em meio de cultura de células para iniciar e promover a diferenciação em CPIs (Karnieli et al., 2007a; Takemitsu et al., 2013). A eficiência e a extensão da diferenciação de células-tronco são moduladas pelo programa genético interno e pelo microambiente externo. Devido ao acúmulo de

evidências sugerindo que o microambiente desempenha um papel importante na sobrevivência e na diferenciação de células-tronco, entender como criar um microambiente que imite os estágios de desenvolvimento pancreático e a diferenciação celular é fundamental para manipular com sucesso a diferenciação de MSCs em CPIs. No entanto, os protocolos atualmente disponíveis só podem induzir a diferenciação de 5 a 10% dos MSCs em CPIs sob condições *in vitro*. Assim, a estratégia de indução existente precisa ser modificada e melhorada, especialmente porque a maioria dos estudos mencionados acima são baseados em modelos longos e com inúmeros indutores (Gabr et al., 2014; Xin et al., 2016a).

Chen et al., em 2004, relataram a primeira diferenciação *in vitro* de MSCs em células semelhantes às ilhotas pancreáticas que, quando transplantadas, se mostraram funcionais no controle das concentrações de glicose sanguínea em ratos diabéticos (Karnieli et al., 2007b; Li et al., 2007). Desde então, há inúmeros protocolos modificados com diferentes agentes estimuladores para aumentar a eficácia da diferenciação em CPIs (Oh et al., 2004; Paz et al., 2011). Chandra et al., relataram a geração de CPIs derivadas do tecido adiposo. Essas células produziram numerosos grânulos secretores de insulina no citoplasma celular após 10 dias de cultura e, quando transplantados em ratos diabéticos induzidos por STZ, a normoglicemia foi restaurada dentro de 2 semanas. Chao et al., diferenciaram células estromais mesenquimais Wharton's jelly (WJ-MS-C) com sucesso em CPIs *in vitro* e provou que apresentavam funções típicas de células β (Chao et al., 2008).

Embora seja necessário aperfeiçoar os protocolos baseados em MSCs, além de investigar a capacidade de transdiferenciação de novas fontes celulares específicas para cada tecido, estas evidências sugerem que as MSCs são uma fonte potencial para futuras

terapias regenerativas. Além disso, a vantagem da utilização do tecido adiposo como fonte de MSCs é uma alternativa de terapia celular autóloga no tratamento do DM1. Como mencionado anteriormente, o DM1 é uma desordem metabólica que leva a mudanças funcionais e estruturais no SNC, aumentando em pelo menos duas vezes o risco de demência e disfunções cognitivas. Neste sentido, a hipótese deste trabalho foi produzir CPIs a partir de ADSCs usando protocolos de diferenciação de curto prazo *in vitro*, com um perfil eficaz de secreção de insulina. Além disso, investigar o possível efeito *in vivo* após um implante das CPIs tanto na região subcapsular renal quanto no tecido subcutâneo, afim de avaliar seus efeitos benéficos tanto em relação a recuperação metabólica quanto a neuroproteção hipocampal. Ainda, buscou-se paralelamente, estudar a diferenciação adipogênica e a expressão e secreção de S100B, esta que está sendo caracterizada como uma nova adipocina.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar e avaliar o potencial neuroprotetor de células estromais mesenquimais diferenciadas em células produtoras de insulina sobre o dano hipocampal em ratos Wistar-Kyoto diabéticos induzidos por estreptozotocina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo epididimal de ratos (ADSCs);
- Otimizar e avaliar protocolos de diferenciação de ADSCs em células produtoras de insulina (CPIs);
- Avaliar as vias de sinalização envolvidas nos protocolos de diferenciação de ADSCs em CPIs;
- Avaliar a recuperação metabólica de animais diabéticos após implante subcapsular renal ou subcutâneo de CPIs;
- Avaliar a neuroproteção hipocampal de animais diabéticos após implante subcapsular renal ou subcutâneo de CPIs;
- Avaliar a presença de células ADSCs obtidas de ratos transgênicos para proteína fluorescente verde em tecidos remotos, particularmente pâncreas e hipocampo;
- Avaliar a diferenciação de ADSCs para adipócitos com a finalidade de estudar da expressão e secreção de S100B.

PARTE II

3 CAPÍTULO 1

Article

Short-term protocols to obtain insulin-producing cells from rat adipose tissue: signaling pathways and in vivo effect

Krista Minéia Wartchow ¹, Letícia Rodrigues ¹, Lucas Zingano Suardi ¹, Barbara Carolina Federhen ¹, Nicholas Guerini Selistre ¹, Carlos-Alberto Gonçalves ^{1*}, and Patrícia Sesterheim ²

¹ Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Biochemistry Post-Graduate Program, Porto Alegre, 90035003, Brazil.

² Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul, Experimental Center, Porto Alegre, 90650-090 Brazil;

Artigo publicado no periódico *International Journal of Molecular Sciences*.



Article

Short-Term Protocols to Obtain Insulin-Producing Cells from Rat Adipose Tissue: Signaling Pathways and In Vivo Effect

Krista Minéia Wartchow ¹, Letícia Rodrigues ¹, Lucas Zingano Suardi ¹,
Barbara Carolina Federhen ¹, Nicholas Guerini Selistre ¹, Carlos-Alberto Gonçalves ^{1,*}
and Patrícia Sesterheim ²

¹ Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Biochemistry Post-Graduate Program, Porto Alegre 90035003, Brazil; kristawartchow@gmail.com (K.M.W.); letigues@gmail.com (L.R.); lucas_zingano@hotmail.com (L.Z.S.); barbarafederhen@gmail.com (B.C.F.); nicholas.gueriniselistre@gmail.com (N.G.S.)

² Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul, Experimental Center, Porto Alegre 90650-090, Brazil; patriciasester@gmail.com

* Correspondence: casg@ufrgs.br

Received: 13 April 2019; Accepted: 13 May 2019; Published: 18 May 2019



Abstract: Studies using mesenchymal stromal cells (MSCs) as a source of insulin-secreting cells (IPCs) are a promising path in the pursuit for diabetes therapy. Here, we investigate three short-term differentiation protocols in order to generate IPCs from autologous adipose-derived stromal cells (ADSCs) with an expressive insulin-secreting profile in vitro and in vivo, as well as the signaling pathways involved in the chosen differentiation protocols. We extracted and cultured ADSCs and differentiated them into IPCs, using three different protocols with different inducers. Afterwards, the secretory profile was analyzed and IPCs differentiated in exendin-4/activin A medium, which presented the best secretory profile, was implanted in the kidney subcapsular region of diabetic rats. All protocols induced the differentiation, but media supplemented with exendin-4/activin A or resveratrol induced the expression and secretion of insulin more efficiently, and only the exendin-4/activin-A-supplemented medium generated an insulin secretion profile more like β -cells, in response to glucose. The PI3K/Akt pathway seems to play a negative role in IPC differentiation; however, the differentiation of ADSCs with exendin-4/activin A positively modulated the p38/MAPK pathway. Resveratrol medium activated the Jak/STAT3 pathway and generated IPCs apparently less sensitive to insulin and insulin-like receptors. Finally, the implant of IPCs with the best secretory behavior caused a decrease in hyperglycemia after one-week implantation in diabetic rats. Our data provide further information regarding the generation of IPCs from ADSCs and strengthen evidence to support the use of MSCs in regenerative medicine, specially the use of exendin-4/activin A to produce rapid and effectively IPCs with significant in vivo effects.

Keywords: adipose-derived stromal cells; exendin-4; diabetic rats; insulin-producing cells; p38-MAPK; PI3K/Akt

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus (DM1), characterized as a multifactorial disease dependent on the complex interaction between predisposing genetic factors, immune response, and environmental influences, is a chronic autoimmune disease resulting in the destruction of pancreatic β -cells [1] and, consequently, in the loss of insulin production and secretion [2]. There has been increasing interest and progress in the regenerative therapies field, including studies focusing on the generation of insulin-producing cells

(IPCs) derived from embryonic stem cells, the umbilical cord, and various adult tissues, such as adipose tissue [3,4], since insulin administration does not prevent the long-term complications of diabetes.

The use of mesenchymal stromal cells (MSCs) as a source of β -cells has been pursued and many successful in vitro attempts have been made to differentiate MSCs in IPCs. Chen et al. [5] reported the first in vitro differentiation of MSCs into cells that were similar to pancreatic islets and which, when transplanted, proved to be functional in the control of blood glucose concentrations in diabetic rats [6]. Since then, numerous modified protocols employing different stimulatory agents have been tested in order to increase the effectiveness of IPC differentiation [7,8]. Chandra et al. [9] reported the generation of IPCs derived from adipose tissue (adipose-derived stromal cells (ADSCs)), which have been shown to be an ideal population of stem cells for cell therapy since they are found in abundance, are of the easiest availability and represent an autologous tissue. Transplantation of autologous MSCs would help overcome the major limitations of inadequate delivery and/or allogeneic rejections since they have an immunomodulatory effect in suppressing the immune response in autoimmune and inflammatory diseases [10,11].

Differentiation of IPCs from MSCs can be carried out using many inducers. Nicotinamide has been used to generate IPCs from different cell sources (e.g., [11,12]). More recent studies have shown that exendin-4 (EX-4) acts on the differentiation of MSCs in IPCs [13–15]. Interestingly, EX-4 is a long-acting GLP-1 receptor agonist (glucagon-like peptide 1) that acts directly on pancreatic β cells, increasing insulin secretion [16], with long-term beneficial effects on blood glucose levels [17] and on cognitive deficit in diabetic rats [18]. Another potential inductor is resveratrol (RSV), a naturally occurring polyphenolic compound found in various fruits and plants [19]. Studies have shown that RSV facilitates cardiomyocyte and osteogenic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells and is able to prevent cell apoptosis by decreasing levels of reactive oxygen species [20,21]. RSV can also increase the proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells [22]. In addition to its ability to promote osteogenic differentiation, RSV is also capable of stimulating the differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes [21,23].

The signaling pathways involved in the cell differentiation of IPCs are not fully understood. The Jak/STAT pathway, commonly activated by cytokine signaling, is known to play an important role in β -cell differentiation [24–26]. p38 Kinase, a member of MAPK family, has also been implicated in the differentiation of β -cells [27,28]. In addition, PI3K/Akt activation plays a critical role in the differentiation of pancreatic duct cells into IPCs during pancreatic regeneration [29] and in the survival of these cells [30]. All these three signaling pathways participate in the differentiation of IPCs, but their participation in the route stimulated by the protocols of IPC generation mentioned above have not been evaluated, in particular for the differentiation of IPCs from ADSCs.

Therefore, the aim of this work was to produce IPCs from ADSCs using short-term differentiation protocols with an effective insulin secretion profile as well as identify the signaling pathways involved in this initial phase of induction. Besides the in vitro insulin secretion, we investigated the possible in vivo effect after an implant of the IPCs based on profile of insulin secretion and glycemia control in diabetic rats.

2. Results

2.1. Morphological and Phenotypic Characterization of ADSC Culture

After reaching 80% confluence, stromal cells derived from adipose tissue were trypsinized and passaged every 4 to 5 days. No morphological changes were observed during the p1–p5 passages. ADSCs presented a fibroblast-like shape, and a homogeneous and monolayered growth (Figure 1A, first panel). Analysis of the in vitro expansion of the mesenchymal stromal cells showed a proportional growth curve over time (Figure 1C). For immunophenotyping, surface antigens from ADSCs were analyzed by flow cytometry (Figure 1B). The immunophenotypic analysis showed that ADSCs expressed molecular markers such as CD29, CD44, and CD90 (Thy-1) on their surface. Moreover,

the cells did express typical endothelial cell markers, such as CD31, CD45, and MHC II. We also evaluated the adipogenic and osteogenic differentiation of the ADSCs. After the cells were cultured in adipogenic medium for four weeks; Red Oil-positive lipid droplets without cytoplasm were formed (Figure 1A, second panel). When ADSCs were maintained in osteogenic medium for 4 weeks, they presented calcium deposits that could be stained with Alizarina Red S, a dye that stains the calcium-rich extracellular matrix (Figure 1A, third panel). As the mesenchymal stromal cells were isolated from the epididymal adipose tissue of Kyoto rats, the S100B protein content was evaluated in the ADSCs (Figure 1D) ($p < 0.0001$; $t = 47.53$; $df = 10$). This protein is highly expressed (and secreted) by adipose tissue, but is clearly not expressed in ADSCs.

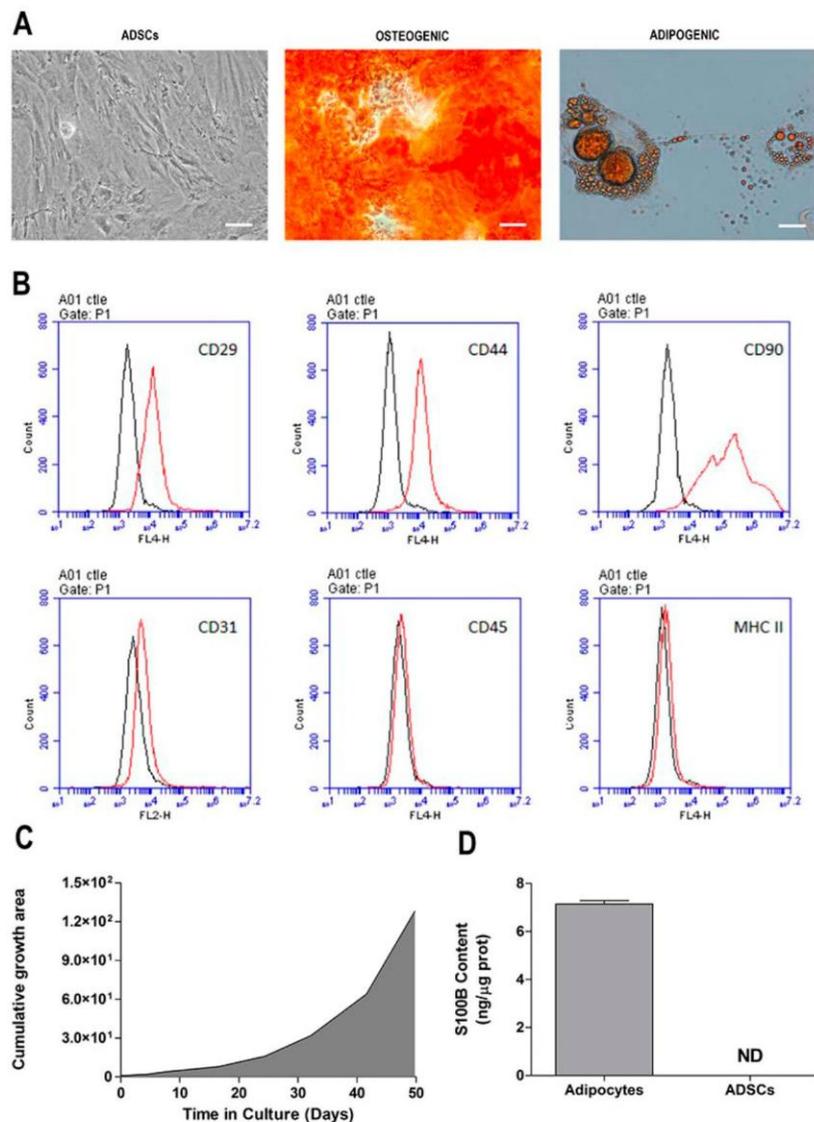


Figure 1. Morphological and phenotypic characterization of adipose-derived stromal cell (ADSC) cultures. (A) Cell morphology (first panel) and adipogenic and osteogenic differentiation of ADSCs (second and third panels, respectively) at 40 \times magnification using phase-contrast microscopy. Scale bar = 30 μ M; (B) immunophenotyping of ADSCs by flow cytometry; peaks are the expression of the selected molecules (black trace), compared to the negative isotype control (red trace); (C) curve of ADSC in vitro growth over time; (D) S100B protein content in ADSCs and adipose tissue, as measured by ELISA. Representative data of 6 independent experiments performed in triplicate.

2.2. Differentiation of ADSC into Insulin-Producing Cells (IPCs)

ADSCs were submitted to three different differentiation protocols to obtain IPCs. After the differentiation period, the IPCs were stained with DTZ, an indirect marker of insulin. Undifferentiated cells were observed to be DTZ dye negative, whereas the ADSCs submitted to the differentiation protocols were positive for DTZ, particularly following protocols II (supplemented with Exendin-4 and Activin A) and III (supplemented with resveratrol) (Figure 2A). Immunofluorescent images for anti-insulin showed that cells exposed to PII presented a higher fluorescence intensity, whereas the fluorescence was less intense in cells that underwent PI or PIII (Figure 2B). The higher expression of insulin in the IPCs submitted to PII was confirmed by ELISA (Figure 2C) ($p < 0.0001$; $f_{(7,54)} = 6.240$). Proinsulin content was evaluated by Western blotting (Figure 2D) ($p = 0.0020$; $f_{(3,20)} = 7.061$).

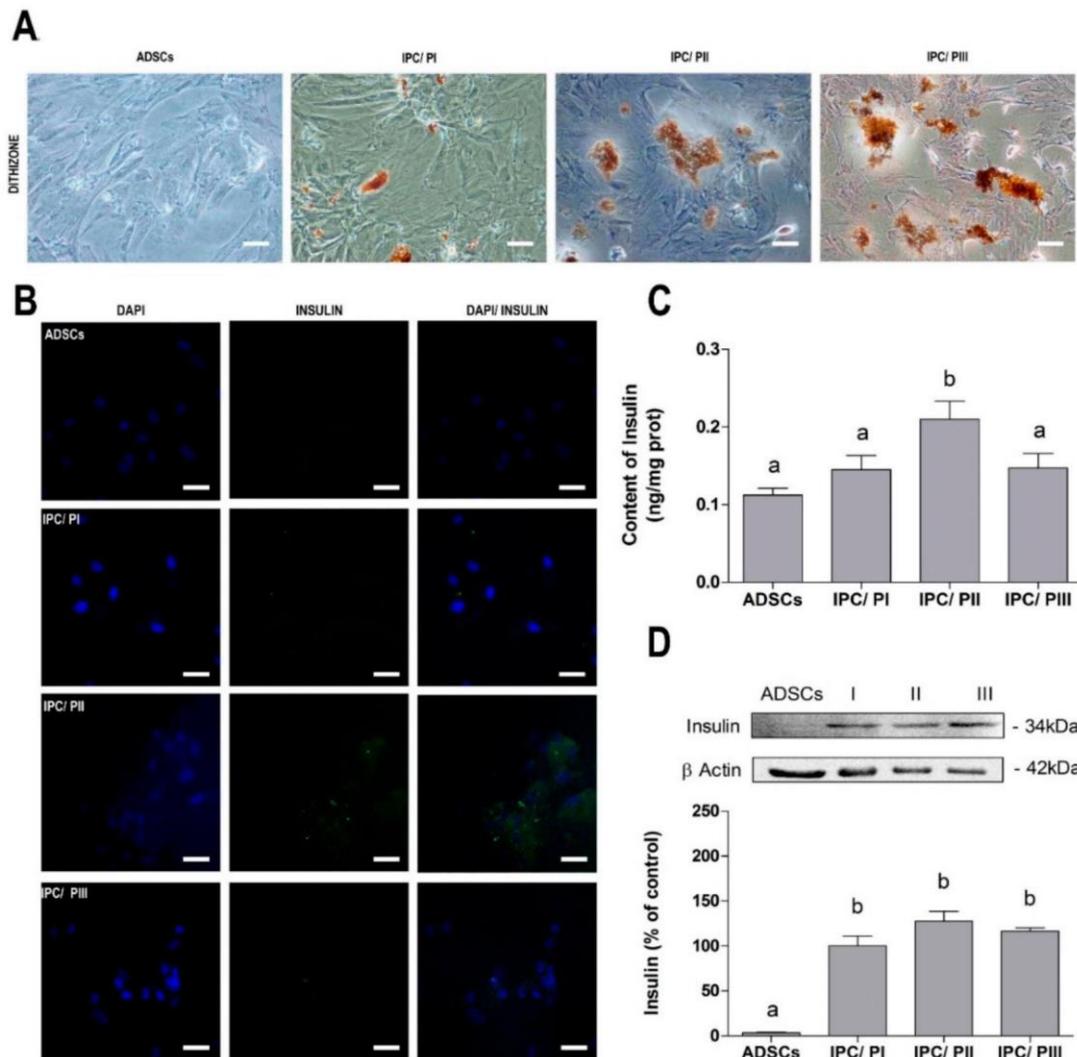


Figure 2. Differentiation of ADSCs into insulin-producing cells (IPCs). (A) Dithizone (DTZ) staining for indirect insulin assessment at 20× magnification by phase-contrast microscopy. Scale bar = 60 μ M; (B) immunofluorescence for insulin (green) and DAPI nuclear staining (blue), at 40× magnification by confocal microscopy. Scale bar = 30 μ M; (C) insulin content, measured by ELISA; and (D) pro-insulin content, evaluated by Western blotting. Data are expressed as means \pm SE of 6 independent experiments performed in triplicate. Letters indicate different statistical groups by ANOVA followed by Tukey's test, assuming $p < 0.05$.

2.3. Transport of Glucose in IPCs

Immunofluorescence detection of the glucose transporter GLUT-2 was slightly higher in the cells that underwent PII or PIII (Figure 3A), and this was confirmed by Western blotting (Figure 3B) ($p = 0.0015$; $f_{(3,20)} = 7.461$). However, glucose uptake by IPCs was equally and significantly increased in cells that underwent all three differentiation protocols, in comparison to the non-differentiated cells (Figure 3C) ($p = 0.0027$; $f_{(3,15)} = 7.484$).

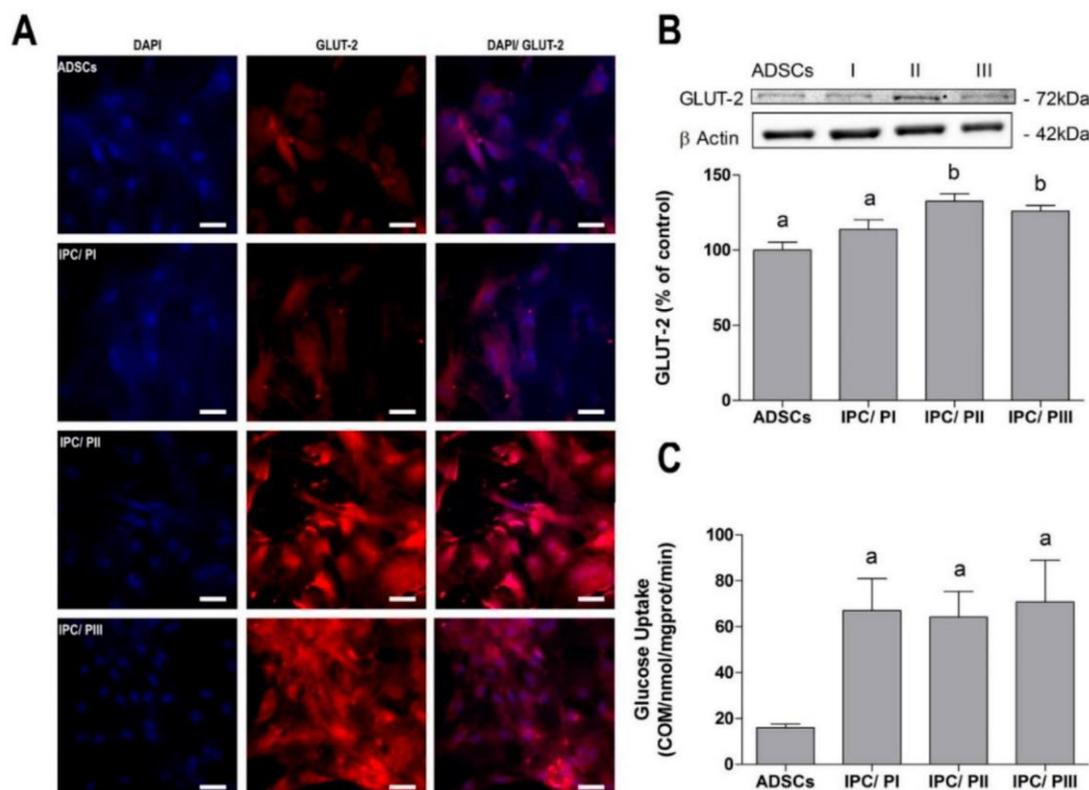


Figure 3. Evaluation of glucose transport in IPCs. (A) Immunofluorescence for GLUT-2 glucose transporter (red) and DAPI nuclear staining (blue), at 40× magnification by confocal microscopy. Scale bar = 30 μm; (B) evaluation of GLUT-2 expression by Western blotting; and (C) evaluation of glucose uptake of 0.1 μCi/mL [2,3-³H] deoxy-D-glucose. Data are shown as means ± SE of 6 independent experiments performed in triplicate. Letters indicate different statistical groups by ANOVA followed by Tukey's test, assuming $p < 0.05$.

2.4. Secretion of Insulin in Response to Glucose Stimulation in IPCs

The supernatants of cell cultures (ADSCs and IPCs) were collected at 1h after three consecutive media changes (DMEM without glucose—glucose 0; DMEM F12—glucose at 17.5 mM; and again, DMEM without glucose) and secreted insulin was evaluated by ELISA (Figure 4A). Results indicate that the undifferentiated ADSCs did not contain/release insulin and did not respond to the glucose stimulus. The IPCs differentiated by PI clearly responded to the stimulus, but the insulin secretion was higher for IPCs submitted to PII or PIII ($p = 0.0239$; $f_{(3,11)} = 6.732$), which responded by significantly increasing glucose concentration into the medium. However, when the stimulus was withdrawn, only the IPCs submitted to PII showed a decrease in insulin secretion. The cell number was quantified by the Trypan blue exclusion method to be sure that observed differences were not due to the different number of surviving cells after media changes (Figure 4B) ($p = 0.4310$; $f_{(3,18)} = 0.9644$).

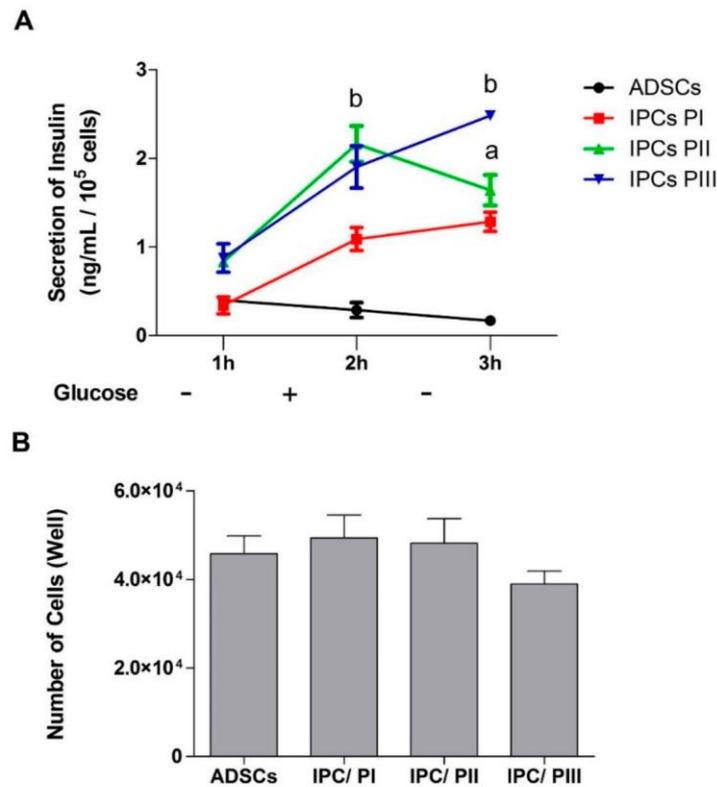


Figure 4. Insulin secretion by IPCs in response to glucose stimulation. **(A)** Insulin secretion curve in response to absence (–) or presence (+) of glucose (at 17.5 mM), as measured by ELISA. **(B)** Quantification of cells by the trypan blue exclusion method. The degree of cell integrity was determined by staining cells with Trypan blue. Stained cells were observed between 30 s and 2 min after the addition of Trypan blue using a Nikon Phase-contrast inverted light microscope at 100× magnification. In each sample, two fields of 100 cells were counted and the mean percentage of stained permeabilized cells was calculated. Data are expressed as means ± SE of 6 independent experiments performed in triplicate. Letters indicate different statistical groups in relation to undifferentiated ADSCs by repeated measures ANOVA **(A)** or one-way ANOVA **(B)** followed by Tukey’s test, assuming $p < 0.05$.

2.5. IPC Signaling Involved in Insulin Expression

Many signal pathways are involved in insulin expression and we investigated three of these in our IPCs: p38/MAPK [31], PI3K [32], and STAT-3 [33]. The enzyme inhibitors SB203580 and LY294002 were used to investigate the relationship between the MAPK/p38 and PI3K pathways in the differentiation process, throughout the induction period [34]. The presence of the SB203580 inhibitor prevented the increase in insulin in IPCs submitted to PII, suggesting that the p38/MAPK pathway is positively involved in cell differentiation (Figure 5A) ($p < 0.0001$; $f_{(7,54)} = 6.240$). Furthermore, Western blotting demonstrated an increase in the phosphorylation of p38/MAPK in these IPCs (Figure 5B) ($p < 0.0001$; $f_{(7,57)} = 67.12$) and no changes were observed in the content of this protein in any of the cells (data not shown).

On the other hand, incubation with the LY294002 inhibitor caused an increase in insulin expression in all IPCs, as well as in the ADSCs (Figure 5C). This effect was more pronounced in IPCs submitted to PII or PIII ($p < 0.0001$; $f_{(7,54)} = 67.12$). Moreover, no significant differences in PI3K phosphorylation were observed among the cells (Figure 5D) ($p = 0.4887$; $f_{(3,16)} = 0.8459$).

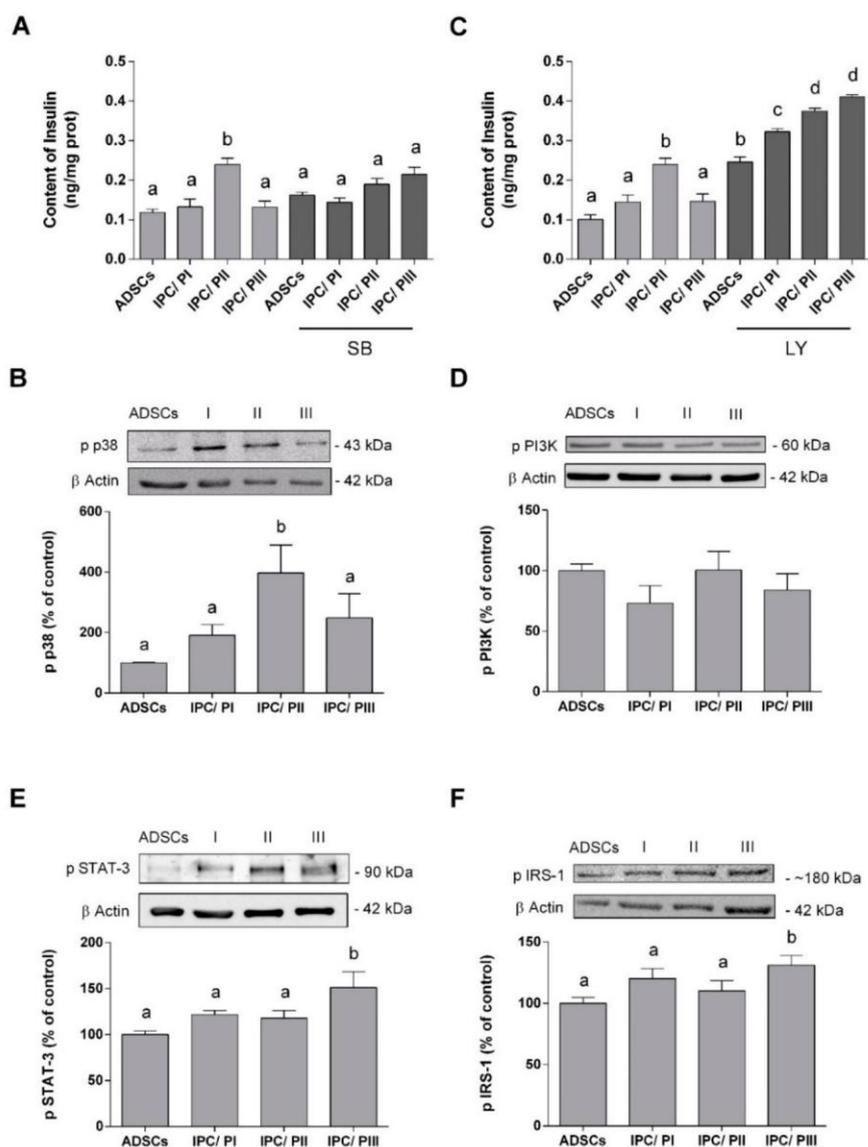


Figure 5. p38/MAPK, PI3K, Jak/STAT-3, and IRS-1 signaling pathways during the differentiation of ADSCs into IPCs. (A) Insulin content in ADSCs and IPCs (differentiated by three different protocols), incubated or not in the presence of SB203580 (at 10 μ M), an inhibitor of p38/MAPK. (B) p38/MAPK phosphorylation in ADSCs and IPCs, as measured by Western blotting. Representative Immunoblots are shown in the inset. (C) Insulin content in ADSCs and IPCs (differentiated by three different protocols), incubated or not in the presence of LY294002 (at 10 μ M)—a PI3K inhibitor. (D) PI3K phosphorylation in ADSCs and IPCs, as measured by Western blotting. Representative Immunoblots are shown in the inset. (E) STAT-3 phosphorylation content was analyzed by Western blotting in ADSCs and IPCs (differentiated by three different protocols). (F) IRS-1 phosphorylation content was analyzed by Western blotting. Data are expressed as means \pm SE of 6 independent experiments performed in triplicate. Letters indicate different statistical groups by ANOVA followed by Tukey's test, assuming $p < 0.05$.

Phosphorylation of STAT3 and the insulin-signaling pathway was assessed by Western Blotting (Figure 5E). An increase in STAT-3 phosphorylation ($p = 0.0152$; $f_{(3,20)} = 4.434$) occurred only in the IPCs submitted to PIII. As such, we determined whether autocrine insulin signaling was also affected by this resveratrol-induced increase in STAT-3 phosphorylation. IRS-1 phosphorylation (at serine-307) in IPCs submitted to PIII was found to be increased (Figure 5F, $p = 0.0423$; $f_{(3,20)} = 3.278$), but no changes were observed in the IRS-1 in any of the cells (data not shown).

2.6. Implant of IPCs from ADSCs in Diabetic Rats

Implant of IPCs generated through protocol II (supplemented with Exendin-4 and activin A) was chosen based on cells insulin production and in vitro response to glucose. IPCs cells were then implanted in the subcapsular renal region of Kyoto rats, one week after STZ-induced DM1 model (Figure 6A). In order to evaluate the effectiveness of IPCs implant, we measure the blood glucose one day, one week and two weeks afterwards. We observed that in diabetic rats that received IPCs, the hyperglycemia was reduced significantly at one and two weeks after implant (Figure 6B) ($p = 0.0002$; $f_{(9,112)} = 3.928$). This result suggests that IPCs do secrete insulin in vivo. Moreover, as expected, in animals transplanted with undifferentiated ADSC cells, the hyperglycemia remained unaltered.

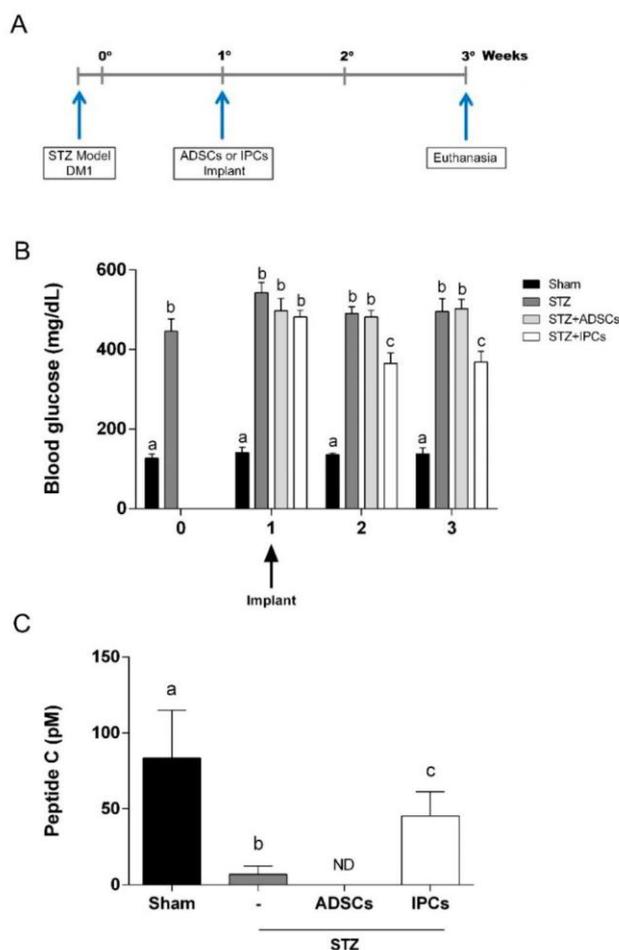


Figure 6. Implant of IPCs from ADSCs in diabetic rats. IPCs or ADSCs were implanted into renal subcapsular space of STZ-induced DM1 male Kyoto-Wistar rats. (A) Timeline of in vivo experiment, showing STZ-induced DM model and cell implant. (B) Blood glucose measurements before and after ADSCs and IPCs implant. (C) C-peptide serum content, measured by ELISA, at 2 weeks after cell implant. Data are expressed as means \pm SE ($n = 8$). Letters indicate different statistical groups by ANOVA followed by Tukey's test, assuming $p < 0.05$.

Additionally, to confirm the in vivo insulin secretion, we evaluate the serum C-peptide in all experimental groups two weeks after the implants. Elevated levels of C-peptide were observed in IPC-treated diabetic animals when compared to untreated diabetic or ADSC-treated diabetic animals (Figure 6C) ($p = 0.0123$; $f_{(3,20)} = 4.682$). However, C-peptide levels in IPC-treated diabetic rats did not reach serum levels found in sham group.

3. Discussion

In recent years, MSCs derived from different tissues, including adipose tissue, have attracted attention for its use in cell regeneration research, mainly because of the abundance of available tissue and the ease of production as well as the trophic capacity of the cells. All of the characteristics of ADSCs provide the potential for these cells to differentiate into IPCs and make them a good alternative to pancreatic islet transplantation, which is considered a promising treatment for diabetes mellitus [9,13,35,36].

The ADSCs in this study presented functional criteria that are compatible with the identification of genuine mesenchymal stromal cells according to the International Society of Cell Therapy criteria [37]. In addition, as the mesenchymal stromal cells were isolated from the epididymal adipose tissue, the content of S100B, a calcium-binding protein characteristically expressed in this tissue [38,39] was investigated. In fact, S100B is highly expressed (and secreted) by adipose tissue [40], but was clearly not expressed in ADSCs.

There are several available protocols that can be used to differentiate ADSCs into IPCs and, based on a combination of those, we chose three protocols, considering simplicity (number of inductors), short duration and those that are currently in use, to provide a more direct comparative analysis. Our previous studies with EX-4 and resveratrol influenced this choice [41,42]. It is also important to emphasize that we look for functional insulin-secreting cells in this work rather than a pancreatic β cell phenotype, which takes in account, in addition to insulin secretion, other features such as morphology or islet aggregation (for a review, see [43]). We observed that protocols II (supplemented with EX-4 and activin A) and III (supplemented with resveratrol) generated cells with higher affinity for DTZ stain (indirect labeling of insulin presence) and pro-insulin (evaluated by Western blotting). However, a much higher content of insulin (as measured by ELISA and immunofluorescence) was observed in cells differentiated by protocol II than with the other two protocols.

The GLUT-2 transporter is involved in the detection of glucose by pancreatic β cells and in the mechanism of insulin secretion [44,45]. The production of insulin and the expression of GLUT-2 by cells confirm their differentiation and functionality as IPCs [46]. When the expression of GLUT-2 was evaluated, both protocols II and III induced increased GLUT-2 expression, although glucose uptake was increased in the IPCs that were differentiated with all three protocols, when compared with the undifferentiated cells. Moreover, the IPCs responded to glucose stimulus, but insulin secretion was higher in the IPCs differentiated by protocols II and III. Glucose withdrawal caused a decrease in insulin secretion only in the IPCs that were differentiated by protocol II, indicating that those cells were more similar to β -cells. These data reinforce the trophic role of EX-4 in the differentiation of IPCs and insulin secretion in β -cells [47]. Due to intrinsically low levels of antioxidant enzyme expression and activity, insulin-producing pancreatic β -cells are particularly susceptible to free radical attack [48], motivating us to use resveratrol due to its antioxidant properties in addition to its ability to promote cell differentiation. However, while IPC differentiation was observed, physiological glucose responsiveness was not observed in the cells that were differentiated with resveratrol.

Specific signaling pathways are involved in the initial stages IPCs differentiation induced by different protocols. Co-incubation with the SB203580 inhibitor during differentiation prevented the increase in insulin in IPCs submitted to protocol II, suggesting that the p38/MAPK pathway positively regulates the cell differentiation induced by EXE-4 and activin A. Reinforcing this idea, we observed an increase in the phosphorylation of p38/MAPK in these IPCs without any change in content. A previous study has shown that MAPKs play crucial roles in chondrogenesis and osteogenesis in MSCs [47] and are important for the proliferation and differentiation of mesenchymal stromal cells derived from dental pulp [49]. More recently, a positive role for the p38 pathway was demonstrated in the differentiation of osteogenic lineage from dental pulp [50]. EX-4 is a GLP-1 agonist and binds to the GLP-1 receptor by activating the p38/MAPK via the PKA pathway [51,52], consistent with our data regarding the differentiation of IPCs from ADSCs using EX-4. Moreover, activin A (also used in protocol II), which stimulates the proliferation of adipocyte progenitors cells but inhibits adipocyte

differentiation [53], may contribute to IPC differentiation via the activation of p38/MAPK [54]. However, this hypothesis deserves further investigation.

Another signaling pathway investigated was the PI3K/Akt, where its inhibitor LY294002 increased insulin expression in all protocols for IPC differentiation; furthermore, PI3K phosphorylation did not differ among the cells. The role of the PI3K/Akt pathway in IPCs differentiation has been previously described (e.g., [55]), but some conflicting evidence exists in the literature. For example, PI3K activation was described in the differentiation of pancreatic endocrine cells [56], but an opposite effect has also been described [57]. In our study, the presence of LY94002 increased insulin expression in ADSCs, suggesting an inductive behavior of this compound per se. Moreover, the increase in the presence of this inhibitor was more pronounced in the protocols with EX-4/activin A or resveratrol. The molecular basis of this mechanism is unclear, but clearly, PI3K/Akt has a negative role in the modulation of IPC differentiation from ADSCs.

In contrast to the EX-4/Activin A protocol, resveratrol did not activate the p38/MAPK pathway, but activated the JAK/Stat pathway, as demonstrated by augmented STAT3 phosphorylation. This pathway has previously been reported as involved in IPC differentiation (e.g., [33]). Notably, cytokine signaling, thought to stimulate IPC differentiation, is able to activate both the p38/MAPK and Jak/STAT3 pathways. Assuming that STAT3 activation could affect autocrine insulin signaling via SOCS [58,59], we investigated IRS-1 phosphorylation in IPCs during differentiation. In fact, in protocol III, which employed resveratrol, IRS-1 phosphorylation at serine-307 was increased, suggesting a lower sensitivity to insulin and insulin-like activators. Resveratrol is apparently able to differentiate MSCs into adipocytes and to work as an insulin agonist in these cells [60]. Thus, our results suggest that resveratrol can also differentiate ADSCs into IPCs, but that these IPCs exhibit lower autocrine sensitivity to insulin (and other insulin-like activators) as well as lower responsiveness to glucose withdrawal. Figure 7 summarizes the signaling pathways studied herein; however, the involvement of other signaling pathways cannot be ruled out.

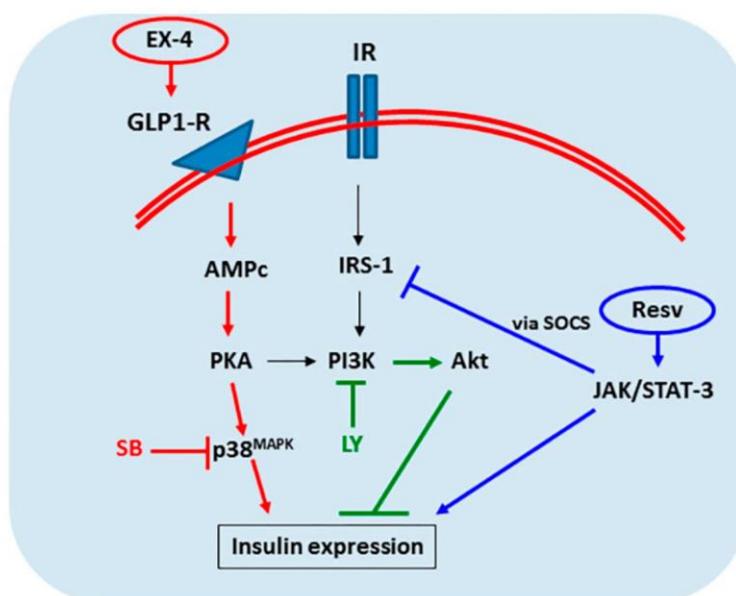


Figure 7. Schematic representation of some of the signaling pathways involved in the differentiation of ADSCs into IPCs. The increase in insulin expression by ADSCs is dependent on a set of signaling pathways. The MAPK/p38 (red) and Jak/STAT-3 (blue) pathways act positively on the differentiation of cells into insulin-producing cells, whereas the PI3K (green labelled) pathway acts negatively. Exendin-4 has been shown to be a good inducer of cell differentiation by enhancing p38 phosphorylation, which is inhibited by SB203580 (SB). PI3K inhibition by LY294002 (LY) augmented insulin production in all protocols of differentiation. Resveratrol (Resv) activates the Jak/STAT-3 pathway, culminating in insulin expression, but to a lesser extent when compared to exendin-4.

Based on *in vitro* insulin production and glucose responsivity we decided to implant IPCs differentiated by protocol II. Implanted IPCs in the renal subcapsular region were able to secrete functional insulin, confirmed through the presence of serum C-peptide and the reduction of hyperglycemia. The renal subcapsular space is a site commonly used in experimental cell implantation [8,15,61], being a potential approach for clinical application. Our findings indicate that adipose-derived IPCs, obtained with a simple and fast protocol was able to reduce (although partially) the hyperglycemia in DM1. According to the literature, other works also had obtained the similar effect on glycemia control, even using longer protocols of differentiation and adding more inducers (e.g., [62]).

Some limitations of our study deserve to be commented. Firstly, we are aware that the time of cell differentiation (three days for protocols II and III versus seven days for protocol I), as well as the presence of FBS (protocol I) complicate analysis and comparisons between the different media of differentiation. Nevertheless, the medium with EX-4 and activin A has consistently been found to generate IPCs. Secondly, no differentiation protocol results in fully differentiated cells [15,63]. Therefore, our implant strategy (4×10^6 differentiated cells/rat) may not had had the enough IPCs for a complete reversion in hyperglycemia, although it had contributed to a significantly reduction. Perhaps larger implants or implants more enriched with differentiated cells would improve the results in further investigations. Thirdly, despite of the promising results, we evaluated the efficacy of the implants only one and two weeks after surgery. Future investigations will determine whether these cells are able to control glycemia for long-term periods or at least to diminish some of the global consequences of diabetes mellitus, such as the neurodegenerative alterations and cognitive deficits observed in patients and experimental models.

4. Material and Methods

4.1. Animals

ADSCs were isolated from abdominal adipose (8-week-old) obtained from male Kyoto-Wistar rats maintained at our breeding colony (Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul, Experimental Center, Porto Alegre, Brazil). The animals were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of 22 ± 1 °C) with free access to commercial chow and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Animal Care and Use Committee (process number 30626, 17 August 2016).

4.2. Chemicals

Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), and other materials for cell culture were purchased from Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA). D-[3-³H] deoxy-glucose (20 Ci/mmol) was purchased from Perkin-Elmer (Boston, MA, USA). Cytochalasin B (Cyt B), 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), S100B protein, anti-S100B antibody (SH-B1), o-phenylenediamine (OPD), Anti-S100B antibody (clone SH-B) and antibodies for blotting: anti-p PI3K was purchased from Cell Signaling (Frankfurt, Germany); anti-p p38 and anti-GLUT2 were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); anti-insulin and anti-p STAT3 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); and anti- β -actin and anti-p IRS were from EMD Millipore (Darmstadt, Germany). Other reagents were purchased from local commercial suppliers (Sulquímica, Labsul or Biogen; Porto Alegre, Brazil).

4.3. Isolation and Expansion of Rat Adipose Tissue-Derived Stromal Cells (ADSCs)

Epididymal fat was collected aseptically from the animals and minced into small pieces. The fragments were digested with 1.5 mg/mL of collagenase type I (Sigma) and diluted in DMEM without

serum for 20 min at 37 °C, and then added DMEM 10% FBS with 0.1 mg/mL streptomycin/100 U/mL penicillin for interruption of enzymatic activity. After centrifugation at 1500 rpm for 5 min, each pellet was resuspended using DMEM 10% FBS in a wet chamber at 37 °C/5% CO₂ until cell confluence. The cells were detached using 0.05% trypsin-EDTA solution. In all experiments, were used cells at the fourth passage [64].

4.4. Characterization of ADSCs

Surface marker analysis of the isolated MSCs was performed by incubation with phycoerythrin-conjugated antibodies against murine CD29, CD44, CD90, CD45, CD31, and MHC II for 30 min at 4 °C. The cells were analyzed using a FACSARIA III cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with a 488nm argon laser, and graphs were generated in WinMDI 9.2 software. The adipogenic and osteogenic differentiation of the MSCs was performed according to previously published protocols [65]. After 4% paraformaldehyde fixation, the calcium deposition and lipid droplets were stained with Alizarin Red S and Oil Red O solution, respectively.

4.5. ELISA for S100B

S100B contents were determined by ELISA according previously work [66]. In short, 50 µL of sample plus 50 µL of Tris buffer were incubated on a microtiter plate previously coated with anti-S100B monoclonal antibody (SH-B1, from Sigma) for 2 h. Anti-S100 polyclonal antibody (from DAKO) was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. The color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.002 to 1 ng/mL.

4.6. Protocol for Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells into Insulin-Producing Cells (IPCs)

In each of the protocols tested, including the control (DMEM serum free), the cells used were in passage 4 (P4), cultured in triplicate in a 6-well plate (TPP), and with a confluence of greater than 80% (~4 × 10⁵ cells/mL). Cells were incubated in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. Protocol I: Insulin-Producing Cells (IPC/PI) (adapted from Chen et al., 2004 [5]). Cells were maintained in DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco) for 7 days with 1% penicillin/streptomycin, 2% FBS supplemented with 10 nM nicotinamide. Protocol II: Insulin-Producing Cells (IPC/PII) (adapted from Timper et al., 2006 [67]). Cells were maintained for 3 days in serum-free DMEM-F12 with 1% penicillin/streptomycin, supplemented with 10 nM nicotinamide (Sigma), 10 ng/mL activin-A (Sigma), and 10 nM exendin-4 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Protocol III: Insulin-Producing Cells (IPC/PIII). Cells were maintained for 3 days, in serum-free DMEM-F12 with 1% penicillin/streptomycin, supplemented with 10 nM nicotinamide (Sigma) and 25 µM resveratrol [60]. For the evaluation of the different signaling pathways that are involved in cell differentiation, the protocols listed above were incubated (serum-free DMEM) concomitantly with the following specific inhibitors: 10 µM LY294002 (PI3K inhibitor) or 10 µM SB203580 (p38 inhibitor) [68].

4.7. Staining with Dithizone

Dithizone (DTZ) is a zinc ion-chelating agent (Zn²⁺) that is present in the insulin granules, and selectively stains them. In order to identify the insulin-producing cells, 10 µg/mL of sterile DTZ from a stock solution was added to the culture medium, as described by Shiroi et al., 2002 [69].

4.8. Immunofluorescence

The cells were cultured on circular glass cover slips. After treatment (and control) protocols, cells were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PBS), washed with PBS and permeabilized for 20 min in PBS containing 0.2% Triton X-100. The cells were then blocked for 1 h with PBS containing 5% bovine serum albumin and incubated overnight with anti-insulin

monoclonal antibody (clone H-86) at a 1:200 dilution, or monoclonal anti-GLUT2 at a 1:500 dilution. Following overnight incubation, cells were washed in PBS/triton 0.2% (3×5 min) and incubated for 2 h with the respective secondary antibody at a 1:1000 dilution—Alexa Fluor 528 (goat anti-mouse-IgG; red fluorescence) and Alexa 488 (goat anti-rabbit-IgG; green fluorescence). After washing, cells were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) for 10 min. Images were captured using an Olympus BX51 phase-contrast fluorescent microscope (Olympus, Japan) and transferred to a computer with a digital camera and Fluoviewer 3.1 FV1000 software for analysis [70].

4.9. Insulin Content

Measurement of insulin content was performed using commercial Rat/Mouse ELISAs (Millipore), according to the manufacturer's instructions.

4.10. Evaluation of Glucose-Stimulated Insulin Secretion

Insulin secretion into the cell culture supernatant was evaluated using the commercial Rat Insulin ELISA (Millipore), according to the manufacturer's instructions. Briefly, the IPCs were incubated for 1 hour, three times. Each incubation step was performed with the collection of the medium at the end for the evaluation of insulin secretion. Cells were washed carefully three times with DPBS and then incubated with DMEM without glucose—DMEM F12 (17.5 mM glucose)—and DMEM without glucose, respectively. The three steps each lasted one hour and cell supernatants were collected every time for evaluation.

4.11. Glucose Uptake Assay

Glucose uptake was performed as previously described [34,70], with some modifications. The cells were incubated with DMEM without glucose during 1 hour at 37 °C. Then, the medium was removed and cells were incubated at 35 °C in a Hank's balanced salt solution (HBSS). The assay started by the addition of 0.1 μ Ci/well D-[2,3-³H] deoxy-glucose during 15 min. The incubation was stopped by removing the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed in a 0.5 M NaOH solution. Glucose uptake was calculated by subtracting the nonspecific uptake, obtained using the glucose transporter inhibitor, cytochalasin B (25 μ M), from the total uptake. Radioactivity was measured using a scintillation counter. Results are expressed as nmol/mg protein/min.

4.12. Western Blot Analysis

Samples were prepared in lysis buffer (containing 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v), 2% (w/v) SDS, glycerol, 5% (w/v) β -mercaptoethanol, and 0.002% bromphenol blue), and analyzed by SDS-PAGE on 12% (w/v) acrylamide gel before electro transferring onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in TBS-T (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 137 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20) containing 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) for 1 h at room temperature. After, the membranes were incubated overnight with the respective primary antibodies—anti-insulin, anti-GLUT-2, anti-p IRS-1, anti-p STAT3, anti-p P38, anti-p PI3K (dilution 1:1000), and anti- β -actin (dilution 1:5000)—rinsed with TBS-T, and exposed to horseradish peroxidase-linked anti-IgG antibodies for 2 h at room temperature. Detection of chemiluminescent bands were made using Image Quant LAS4000 GE Healthcare, and densitometric analyses were performed using Image-J software. Results are expressed as percentages of the control.

4.13. DM1 Model and Surgical Procedure—IPCs Implant

DM 1 model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (60 mg/kg in citrate buffer, pH 4.5). Animals with a glycemic greater than 250 mg/dL will be considered diabetic. A schematic representation of the experimental protocol is shown in Figure 6A.

Adult male Kyoto-Wistar rats were divided in four groups: Group I (Sham group): included 8 rats injected with vehicle via intraperitoneal (IP) injection and passed through all surgical steps except transplantation. Group II, III, and IV: each group included 8 rats injected once with streptozotocin (60 mg/kg body weight) via IP injection; Group II (diabetic group—STZ): passed through all surgical steps except transplantation. Group III (STZ + ADSCs group): ADSCs were transplanted into subcapsular renal (4×10^6 cells/ rat), after 1-week DM 1 induction. Group IV (STZ + IPCs group): IPCs were transplanted into subcapsular renal (4×10^6 cells/ rat), after 1-week DM 1 induction.

Surgical procedure for subcapsular renal transplantation. Animals were anesthetized with ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively, IP. After trichotomy in the left inferior dorsolateral region, the kidney was exposed through a 1.5 cm incision and, with the aid of a straight thin forceps, 4×10^6 cells were implanted under the renal capsule. Sutured the two planes with suture wire 7.0, the animal was placed on heating plate and monitored until it presents reactions to external stimuli [71].

4.14. Protein Determination

Protein content was measured by Lowry's method with some modifications, using bovine serum albumin as the standard [72].

4.15. Statistical Analysis

All in vitro experiments were performed in triplicate in at least six independent experiments and the data represent means \pm SD. Statistical comparisons between different groups were tested by one-way ANOVA followed by the Tukey's test. For the S100B content, data are presented as means \pm S.E.M. and statistically evaluated by Student's *t*-test. For the evaluation of glucose-stimulated insulin secretion, statistical comparisons between different groups were made using repeated measures ANOVA followed by Tukey's test. All in vivo experiments were expressed as means \pm SE ($n = 8$) and were tested by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. All analyses were performed using the Graphpad Prism software version 6 (La Jolla, CA, USA).

5. Conclusions

In summary, our data showed that is obtaining IPCs from ADSCs is viable and relatively easy using a short-duration protocol. Protocols using EX-4 and activin A or resveratrol were able to generate IPCs more efficiently, as shown by their expression of biomarkers (e.g., insulin and GLUT-2), but only the protocol employing EX-4 and activin A was able to yield IPCs exhibiting a response to glucose that was more similar to that of β -cells. Moreover, p38/MAPK is involved in the process of IPC differentiation and possibly in the responsiveness to glucose. Resveratrol also promoted IPC differentiation independently of p38/MAPK, possibly by Jak/STAT3 activation, but these IPCs cells did not respond to glucose withdrawal and exhibited lower sensitivity to the insulin-substrate receptor 1, an adapter protein that binds insulin and insulin-like receptors. Our data contribute to the understanding of the generation of IPCs from autologous adipose tissue and preparation of effective implants of these cells, reinforcing the use of ADSCs in regenerative medicine for DM1.

Data Availability: The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Author Contributions: P.S., C.-A.G. and K.M.W. designed the study. K.M.W., L.R., L.Z.S., B.C.F., N.G.S. and P.S. performed laboratory experiments and collected data. K.M.W. and P.S. performed statistical analyses. P.S., C.-A.G., K.M.W. and L.R. wrote the manuscript. All authors edited and approved the manuscript.

Funding: CNPq; CAPES, FAPERGS and INCTEN/CNPq.

Acknowledgments: This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN/CNPq).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Van Belle, T.L.; Coppieters, K.T.; von Herrath, M.G. Type 1 diabetes: Etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 79–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Chhabra, P.; Brayman, K.L. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: From hype to hope. *Stem Cells Transl. Med.* **2013**, *2*, 328–336. [[CrossRef](#)]
3. Aguayo-Mazzucato, C.; Bonner-Weir, S. Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 57–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Daley, G.Q. The promise and perils of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 740–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chen, L.-B.; Jiang, X.-B.; Yang, L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J. Gastroenterol.* **2004**, *10*, 3016–3020. [[CrossRef](#)]
6. Karnieli, O.; Izhar-Prato, Y.; Bulvik, S.; Efrat, S. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells Dayt. Ohio* **2007**, *25*, 2837–2844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Oh, S.-H.; Muzzonigro, T.M.; Bae, S.-H.; LaPlante, J.M.; Hatch, H.M.; Petersen, B.E. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **2004**, *84*, 607–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Paz, A.H.; Salton, G.D.; Ayala-Lugo, A.; Gomes, C.; Terraciano, P.; Scalco, R.; Laurino, C.C.F.C.; Passos, E.P.; Schneider, M.R.; Meurer, L.; et al. Betacellulin overexpression in mesenchymal stem cells induces insulin secretion in vitro and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Stem Cells Dev.* **2011**, *20*, 223–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Chandra, V.; Swetha, G.; Muthyala, S.; Jaiswal, A.K.; Bellare, J.R.; Nair, P.D.; Bhonde, R.R. Islet-like cell aggregates generated from human adipose tissue derived stem cells ameliorate experimental diabetes in mice. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20615. [[CrossRef](#)]
10. Francese, R.; Fiorina, P. Immunological and regenerative properties of cord blood stem cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **2010**, *136*, 309–322. [[CrossRef](#)]
11. Domínguez-Bendala, J.; Lanzoni, G.; Inverardi, L.; Ricordi, C. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells for Diabetes. *STEM CELLS Transl. Med.* **2012**, *1*, 59–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kim, B.; Yoon, B.S.; Moon, J.H.; Kim, J.; Jun, E.K.; Lee, J.H.; Kim, J.S.; Baik, C.S.; Kim, A.; Whang, K.Y.; et al. Differentiation of human labia minora dermis-derived fibroblasts into insulin-producing cells. *Exp. Mol. Med.* **2012**, *44*, 26–35. [[CrossRef](#)]
13. Khorsandi, L.; Saremy, S.; Khodadadi, A.; Dehbashi, F. Effects of Exendine-4 on The Differentiation of Insulin Producing Cells from Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell J.* **2016**, *17*, 720–729. [[PubMed](#)]
14. Nejad-Dehbashi, F.; Hashemitabar, M.; Orazizadeh, M.; Bahramzadeh, S.; Shahhosseini Pourshoushtary, E.; Khorsandi, L. The effects of exendine-4 on insulin producing cell differentiation from rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell J.* **2014**, *16*, 187–194. [[PubMed](#)]
15. Xin, Y.; Jiang, X.; Wang, Y.; Su, X.; Sun, M.; Zhang, L.; Tan, Y.; Wintergerst, K.A.; Li, Y.; Li, Y. Insulin-Producing Cells Differentiated from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro Ameliorate Streptozotocin-Induced Diabetic Hyperglycemia. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0145838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Xu, G.; Stoffers, D.A.; Habener, J.F.; Bonner-Weir, S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* **1999**, *48*, 2270–2276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Greig, N.H.; Holloway, H.W.; De Ore, K.A.; Jani, D.; Wang, Y.; Zhou, J.; Garant, M.J.; Egan, J.M. Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* **1999**, *42*, 45–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Nardin, P.; Zanotto, C.; Hansen, F.; Batassini, C.; Gasparin, M.S.; Sesterheim, P.; Gonçalves, C.-A. Peripheral Levels of AGEs and Astrocyte Alterations in the Hippocampus of STZ-Diabetic Rats. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 2006–2016. [[CrossRef](#)]
19. Das, S.; Das, D.K. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **2007**, *6*, 168–173. [[CrossRef](#)]

20. Kao, C.-L.; Tai, L.-K.; Chiou, S.-H.; Chen, Y.-J.; Lee, K.-H.; Chou, S.-J.; Chang, Y.-L.; Chang, C.-M.; Chen, S.-J.; Ku, H.-H.; et al. Resveratrol promotes osteogenic differentiation and protects against dexamethasone damage in murine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* **2010**, *19*, 247–258. [[CrossRef](#)]
21. Liu, H.; Zhang, S.; Zhao, L.; Zhang, Y.; Li, Q.; Chai, X.; Zhang, Y. Resveratrol Enhances Cardiomyocyte Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells through Inhibiting Canonical WNT Signal Pathway and Enhancing Serum Response Factor-miR-1 Axis. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 2524092. [[CrossRef](#)]
22. Dai, Z.; Li, Y.; Quarles, L.D.; Song, T.; Pan, W.; Zhou, H.; Xiao, Z. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2007**, *14*, 806–814. [[CrossRef](#)]
23. Ding, H.; Xu, X.; Qin, X.; Yang, C.; Feng, Q. Resveratrol promotes differentiation of mouse embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Cardiovasc. Ther.* **2016**, *34*, 283–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Baeyens, L.; Bouwens, L. Can beta-cells be derived from exocrine pancreas? *Diabetes Obes. Metab.* **2008**, *10* (Suppl. 4), 170–178. [[CrossRef](#)]
25. Koblas, T.; Leontovyč, I.; Zacharovová, K.; Berková, Z.; Kříž, J.; Girman, P.; Saudek, F. Activation of the Jak/Stat signalling pathway by leukaemia inhibitory factor stimulates trans-differentiation of human non-endocrine pancreatic cells into insulin-producing cells. *Folia Biol.* **2012**, *58*, 98–105.
26. Valdez, I.A.; Dirice, E.; Gupta, M.K.; Shirakawa, J.; Teo, A.K.K.; Kulkarni, R.N. Proinflammatory Cytokines Induce Endocrine Differentiation in Pancreatic Ductal Cells via STAT3-Dependent NGN3 Activation. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 460–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lemper, M.; Leuckx, G.; Heremans, Y.; German, M.S.; Heimberg, H.; Bouwens, L.; Baeyens, L. Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to β -like cells. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 1117–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Makeeva, N.; Roomans, G.M.; Welsh, N. Role of TAB1 in nitric oxide-induced p38 activation in insulin-producing cells. *Int. J. Biol. Sci.* **2006**, *3*, 71–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Watanabe, H.; Saito, H.; Nishimura, H.; Ueda, J.; Evers, B.M. Activation of phosphatidylinositol-3 kinase regulates pancreatic duodenal homeobox-1 in duct cells during pancreatic regeneration. *Pancreas* **2008**, *36*, 153–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Mokhtari, D.; Al-Amin, A.; Turpaev, K.; Li, T.; Idevall-Hagren, O.; Li, J.; Wuttke, A.; Fred, R.G.; Ravassard, P.; Scharfmann, R.; et al. Imatinib mesilate-induced phosphatidylinositol 3-kinase signalling and improved survival in insulin-producing cells: Role of Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase interaction with c-Abl. *Diabetologia* **2013**, *56*, 1327–1338. [[CrossRef](#)]
31. Kemp, D.M.; Habener, J.F. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1) activation of insulin gene promoter inhibited by p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* **2001**, *142*, 1179–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lee, H.-J.; Choi, Y.-J.; Park, S.-Y.; Kim, J.-Y.; Won, K.-C.; Son, J.-K.; Kim, Y.-W. Hexane Extract of *Orthosiphon stamineus* Induces Insulin Expression and Prevents Glucotoxicity in INS-1 Cells. *Diabetes Metab. J.* **2015**, *39*, 51–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Velayos, T.; Martínez, R.; Alonso, M.; Garcia-Etxebarria, K.; Aguayo, A.; Camarero, C.; Urrutia, I.; Martínez de LaPiscina, I.; Barrio, R.; Santin, I.; et al. An Activating Mutation in STAT3 Results in Neonatal Diabetes Through Reduced Insulin Synthesis. *Diabetes* **2017**, *66*, 1022–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wartchow, K.M.; Tramontina, A.C.; de Souza, D.F.; Biasibetti, R.; Bobermin, L.D.; Gonçalves, C.-A. Insulin Stimulates S100B Secretion and These Proteins Antagonistically Modulate Brain Glucose Metabolism. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 1420–1429. [[CrossRef](#)]
35. Chen, L.; Tredget, E.E.; Wu, P.Y.G.; Wu, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gao, X.; Song, L.; Shen, K.; Wang, H.; Qian, M.; Niu, W.; Qin, X. Bone marrow mesenchymal stem cells promote the repair of islets from diabetic mice through paracrine actions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2014**, *388*, 41–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bourin, P.; Bunnell, B.A.; Casteilla, L.; Dominici, M.; Katz, A.J.; March, K.L.; Redl, H.; Rubin, J.P.; Yoshimura, K.; Gimble, J.M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* **2013**, *15*, 641–648.

38. Hidaka, H.; Endo, T.; Kawamoto, S.; Yamada, E.; Umekawa, H.; Tanabe, K.; Hara, K. Purification and characterization of adipose tissue S-100b protein. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2705–2709.
39. Michetti, F.; Dell'Anna, E.; Tiberio, G.; Cocchia, D. Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res.* **1983**, *262*, 352–356. [[CrossRef](#)]
40. Gonçalves, C.A.; Leite, M.C.; Guerra, M.C. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* **2010**, *2010*, 790431. [[CrossRef](#)]
41. Bellaver, B.; Bobermin, L.D.; Souza, D.G.; Rodrigues, M.D.N.; de Assis, A.M.; Wajner, M.; Gonçalves, C.-A.; Souza, D.O.; Quincozes-Santos, A. Signaling mechanisms underlying the glioprotective effects of resveratrol against mitochondrial dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1862*, 1827–1838. [[CrossRef](#)]
42. Zanutto, C.; Simão, F.; Gasparin, M.S.; Biasibetti, R.; Tortorelli, L.S.; Nardin, P.; Gonçalves, C.-A. Exendin-4 Reverses Biochemical and Functional Alterations in the Blood-Brain and Blood-CSF Barriers in Diabetic Rats. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 2154–2166. [[CrossRef](#)]
43. Balboa, D.; Saarimäki-Vire, J.; Otonkoski, T. Concise Review: Human Pluripotent Stem Cells for the Modeling of Pancreatic β -Cell Pathology. *Stem Cells* **2019**, *37*, 33–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kellett, G.L.; Brot-Laroche, E.; Mace, O.J.; Leturque, A. Sugar absorption in the intestine: The role of GLUT2. *Annu. Rev. Nutr.* **2008**, *28*, 35–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Olson, A.L.; Pessin, J.E. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, *16*, 235–256. [[CrossRef](#)]
46. Tang, D.-Q.; Cao, L.-Z.; Burkhardt, B.R.; Xia, C.-Q.; Litherland, S.A.; Atkinson, M.A.; Yang, L.-J. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* **2004**, *53*, 1721–1732. [[CrossRef](#)]
47. Li, J.; Zhao, Z.; Liu, J.; Huang, N.; Long, D.; Wang, J.; Li, X.; Liu, Y. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF- β 1/Smads pathway. *Cell Prolif.* **2010**, *43*, 333–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Dinić, S.; Grdović, N.; Uskoković, A.; Đorđević, M.; Mihailović, M.; Jovanović, J.A.; Poznanović, G.; Vidaković, M. CXCL12 protects pancreatic β -cells from oxidative stress by a Nrf2-induced increase in catalase expression and activity. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2016**, *92*, 436–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Zhang, H.; Liu, S.; Zhou, Y.; Tan, J.; Che, H.; Ning, F.; Zhang, X.; Xun, W.; Huo, N.; Tang, L.; et al. Natural mineralized scaffolds promote the dentinogenic potential of dental pulp stem cells via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Tissue Eng. Part A* **2012**, *18*, 677–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ba, P.; Duan, X.; Fu, G.; Lv, S.; Yang, P.; Sun, Q. Differential effects of p38 and Erk1/2 on the chondrogenic and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Mol. Med. Rep.* **2017**. [[CrossRef](#)]
51. Roussel, M.; Mathieu, J.; Dalle, S. Molecular mechanisms redirecting the GLP-1 receptor signalling profile in pancreatic β -cells during type 2 diabetes. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2016**, *26*, 87–95. [[CrossRef](#)]
52. Yang, J.-L.; Chen, W.-Y.; Chen, Y.-P.; Kuo, C.-Y.; Chen, S.-D. Activation of GLP-1 Receptor Enhances Neuronal Base Excision Repair via PI3K-AKT-Induced Expression of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1. *Theranostics* **2016**, *6*, 2015–2027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zaragosi, L.-E.; Wdziekonski, B.; Villageois, P.; Keophiphath, M.; Maumus, M.; Tchkonja, T.; Bourlier, V.; Mohsen-Kanson, T.; Ladoux, A.; Elabd, C.; et al. Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* **2010**, *59*, 2513–2521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hu, W.; Lu, H.; Wang, S.; Yin, W.; Liu, X.; Dong, L.; Chiu, R.; Shen, L.; Lu, W.-J.; Lan, F. Suppression of Nestin reveals a critical role for p38-EGFR pathway in neural progenitor cell proliferation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 87052–87063. [[CrossRef](#)]
55. Mao, G.-H.; Lu, P.; Wang, Y.-N.; Tian, C.-G.; Huang, X.-H.; Feng, Z.-G.; Zhang, J.-L.; Chang, H.-Y. Role of PI3K p110 β in the differentiation of human embryonic stem cells into islet-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *488*, 109–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kohn, A.D.; Summers, S.A.; Birnbaum, M.J.; Roth, R.A. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31372–31378. [[CrossRef](#)]
57. Hori, Y.; Rulifson, I.C.; Tsai, B.C.; Heit, J.J.; Cahoy, J.D.; Kim, S.K. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16105–16110. [[CrossRef](#)]

58. Fan, N.; Sun, H.; Wang, Y.; Zhang, L.; Xia, Z.; Peng, L.; Hou, Y.; Shen, W.; Liu, R.; Peng, Y. Midkine, a Potential Link between Obesity and Insulin Resistance. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e88299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Galic, S.; Sachithanandan, N.; Kay, T.W.; Steinberg, G.R. Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity. *Biochem. J.* **2014**, *461*, 177–188. [[CrossRef](#)]
60. Caldarelli, I.; Speranza, M.C.; Bencivenga, D.; Tramontano, A.; Borgia, A.; Pirozzi, A.V.A.; Perrotta, S.; Oliva, A.; Della Ragione, F.; Borriello, A. Resveratrol mimics insulin activity in the adipogenic commitment of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2015**, *60*, 60–72. [[CrossRef](#)]
61. Gabr, M.M.; Zakaria, M.M.; Refaie, A.F.; Ismail, A.M.; Abou-El-Mahasen, M.A.; Ashamallah, S.A.; Khater, S.M.; El-Halawani, S.M.; Ibrahim, R.Y.; Uin, G.S.; et al. Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant.* **2013**, *22*, 133–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kondo, Y.; Toyoda, T.; Ito, R.; Funato, M.; Hosokawa, Y.; Matsui, S.; Sudo, T.; Nakamura, M.; Okada, C.; Zhuang, X.; et al. Identification of a small molecule that facilitates the differentiation of human iPSCs/ESCs and mouse embryonic pancreatic explants into pancreatic endocrine cells. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1454–1466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gabr, M.M.; Zakaria, M.M.; Refaie, A.F.; Khater, S.M.; Ashamallah, S.A.; Ismail, A.M.; El-Badri, N.; Ghoneim, M.A. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Comparison of three differentiation protocols. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 832736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Meirelles, L.d.S.; Nardi, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: Isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br. J. Haematol.* **2003**, *123*, 702–711. [[CrossRef](#)]
65. Da Silva Meirelles, L.; Chagastelles, P.C.; Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 2204–2213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Leite, M.C.; Galland, F.; Brolese, G.; Guerra, M.C.; Bortolotto, J.W.; Freitas, R.; de Almeida, L.M.V.; Gottfried, C.; Gonçalves, C.-A. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* **2008**, *169*, 93–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Timper, K.; Seboek, D.; Eberhardt, M.; Linscheid, P.; Christ-Crain, M.; Keller, U.; Müller, B.; Zulewski, H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 1135–1140. [[CrossRef](#)]
68. De Souza, D.F.; Wartchow, K.; Hansen, F.; Lunardi, P.; Guerra, M.C.; Nardin, P.; Gonçalves, C.-A. Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2013**, *43*, 14–22. [[CrossRef](#)]
69. Shiroy, A.; Yoshikawa, M.; Yokota, H.; Fukui, H.; Ishizaka, S.; Tatsumi, K.; Takahashi, Y. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells Dayt. Ohio* **2002**, *20*, 284–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Pellerin, L.; Magistretti, P.J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10625–10629. [[CrossRef](#)]
71. Li, D.; Hao, J.; Yuan, Y.-H.; Yun, S.H.; Feng, J.-B.; Dai, L.-J.; Warnock, G.L. Pancreatic islet transplantation to the renal subcapsule in mice. *Protoc. Exch.* **2011**. [[CrossRef](#)]
72. Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **1977**, *83*, 346–356. [[CrossRef](#)]



4 CAPÍTULO 2

Article

Insulin-producing cells from adipose-derived mesenchymal stromal cells: Protection against cognitive impairment in diabetic rats depends upon implant site

Krista Minéia Wartchow^a, Leticia Rodrigues^a, Lílian Juliana Lissner^a, Barbara Carolina Federhen^a, Nicholas Guerini Selistre^a, Aline Moreira^a, Carlos-Alberto Gonçalves^{a*} and Patrícia Sesterheim^b.

^a Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Biochemistry Post-Graduate Program, Porto Alegre, Brazil.

^b Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul, Experimental Center, Porto Alegre, Brazil.

Artigo submetido ao periódico *Cytotherapy*

1 **Insulin-producing cells from adipose-derived mesenchymal stromal cells: Protection**
2 **against cognitive impairment in diabetic rats depends upon implant site**

3

4 Krista Minéia Wartchow^a, Leticia Rodrigues^a, Lilian Juliana Lissner^a, Barbara Carolina
5 Federhen^a, Nicholas Guerini Selistre^a, Aline Moreira^a, Carlos-Alberto Gonçalves^{a*} and
6 Patrícia Sesterheim^b.

7

8 ^aFederal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Biochemistry Post-Graduate
9 Program, Porto Alegre, Brazil.

10

11 ^bInstitute of Cardiology of Rio Grande do Sul, Experimental Center, Porto Alegre,
12 Brazil

13

14 *Corresponding author:

15 Dr Carlos Alberto Gonçalves

16 Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Biochemistry Post-Graduate
17 Program.

18 Ramiro Barcelos, 2600-Anexo

19 90035003, Porto Alegre, RS, Brazil

20 E-mail: casg@ufrgs.br

21

22

23

24

25

26 **Abstract**

27 Diabetes mellitus (DM) is a serious public health problem and can cause long-term
28 damage to tissues in the brain, resulting in cognitive impairment in these patients. Insulin
29 therapy for type 1 DM (DM1) can achieve overall blood glucose control, but glycemic
30 variations can occur during injection intervals, which may contribute to some
31 complications. Among the additional therapies available for DM1 treatment is the
32 implantation of insulin-producing cells (IPCs) to attenuate hyperglycemia and even
33 reverse diabetes. We investigated the strategy of implanting IPCs obtained from
34 mesenchymal stromal cells (MSCs) from adipose tissue, comparing two different IPC
35 implant sites, subcapsular renal (SR) and subcutaneous (SC), to investigate their putative
36 protection against hippocampal damage, induced by STZ, in a rat DM1 model. Both
37 implants improved hyperglycemia and reduced the serum content of advanced-glycated
38 end products in diabetic rats, but serum insulin was not observed in the SC group. The
39 SC-implanted group demonstrated ameliorated cognitive impairment (evaluated by novel
40 object recognition) and modulation of hippocampal astroglial reactivity (evaluated by
41 S100B and GFAP). Using GFP + cell implants, the survival of cells at the implant sites
42 was observed, as well as their migration to the pancreas and hippocampus. The presence
43 of undifferentiated MSCs in our IPC preparation could help explain the peripheral
44 reduction in AGEs (by autophagic degradation) and the recovery of cognitive impairment
45 (by immunomodulation at the hippocampus) observed. Together, these data reinforce the
46 importance of MSCs for use in neuroprotective strategies, and highlight the logistic
47 importance of the subcutaneous route for their administration.

48 **Key words:** Diabetes mellitus, hippocampus, insulin-producing cells, MSCs,
49 subcutaneous implant, S100B.

50 **Introduction**

51 Diabetes mellitus (DM) is a serious and growing public health problem, affecting
52 around 30 million people of all ages. According to the American Diabetes Association,
53 type 1 diabetes (DM1) accounts for 5 to 10% of the total diabetic population (Drive et al.
54 2017). DM1 is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia caused by T cells
55 infiltrated in the Langerhans islets, resulting in destruction of the pancreatic β -cells (van
56 Belle et al., 2011) and consequent loss of the production and secretion of insulin (Chandra
57 et al., 2011). In Brazil, almost 90% of DM1 patients fail to achieve glycemic control
58 (Coutinho and Silva Júnior, 2015).

59 In addition to the well-known peripheral complications resulting from DM,
60 several studies report that the disease can also affect the central nervous system (CNS),
61 incurring complications such as diabetic encephalopathy, and increasing the probability
62 of cognitive decline and the acceleration of Alzheimer's disease (AD), among other
63 dementias (Bauduceau et al., 2010; Jolivald et al., 2010; Klimova et al., 2018; Zhou et al.,
64 2013). Experimental data in animal models of DM1, induced by streptozotocin (STZ),
65 suggest that learning deficits resulting from DM are associated with impairments in
66 synaptic plasticity in the hippocampus (Nardin et al., 2016; Zhang et al., 2008). Through
67 this model, a series of studies has demonstrated evidence of brain damage, including
68 astrocyte reactivity (Jing et al., 2013; Nardin et al., 2016), neuronal damage and memory
69 deficits (Mao et al., 2014), and even deposition of β -amyloid peptide, in these rats (Zhang
70 et al., 2010).

71 Potential definitive treatment strategies for DM1, which intend to correct insulin
72 dependence, include pancreas transplantation, pancreatic islet transplantation and, more
73 recently, autoimmunity blockade and stem cell-based therapy (Aguayo-Mazzucato and
74 Bonner-Weir, 2018; Vanikar et al., 2016). Mesenchymal stromal cells (MSCs) can be

75 obtained from various tissues for differentiation into insulin-producing cells (IPCs)
76 (Karnieli et al., 2007; Sapir et al., 2005; Sun et al., 2007; Timper et al., 2006; Wang et al.,
77 2011). The adipose tissue offers distinct advantages due to its availability and significant
78 therapeutic potential, characterized by its intrinsic regenerative capacity and its
79 immunomodulatory properties (Chhabra and Brayman, 2013; Skyler, 2018). The rate of
80 adipose stromal cell (ADSC) isolation is 100% and the yield of adipose tissue is 40 times
81 higher than that of bone marrow (Kern et al., 2006). Therefore, in addition to being easily
82 obtained, the adipose tissue is a rich source of stromal cells that can be successfully used
83 in autologous transplants (Lin et al., 2017).

84 For regenerative application, the route for cell implantation is very important for
85 homing prediction. Numerous sites have been proposed and tested, both experimentally
86 and in some cases clinically, including the liver, kidney subcapsular region, spleen,
87 pancreas, omentum, gastrointestinal wall and subcutaneous spaces (Lacy et al., 1989;
88 Mellgren et al., 1986). For some time, the kidney capsule was used for experimental islet
89 implants (Szot et al., 2007). This site offers many advantages, such as a highly
90 vascularized space that provides better survival and graft protection (Faleo et al., 2017;
91 Stokes et al., 2017). Another attractive option for the implant is the subcutaneous site,
92 which offers accessibility and retrievability, as well as the potential for biopsy and simple
93 monitoring (Bruni et al., 2014). Nevertheless, it is still unclear as to what degree the
94 implantation site influences the transplant outcome, and few studies have compared
95 whether the IPC implantation site interferes in the cognitive deficit consequent to DM1.

96 Despite the successful transdifferentiation of ADSCs to IPCs, an ideal site for
97 IPC transplantation has yet to be determined. To evaluate this issue, we investigated and
98 compared the efficacy of IPC implants in the renal subcapsular space and subcutaneous
99 region of rats submitted to the DM1 model induced by STZ. We looked at metabolic

100 peripheral changes, as well as CNS alterations, particularly in the hippocampus, and
101 observed cognitive behavior that is dependent on this brain region.

102 **Material and Methods**

103 **Animals**

104 Eight-week-old male Wistar Kyoto rats (WKY) were used for mesenchymal stromal cell
105 isolation from adipose tissue. Cells were then expanded and differentiated into insulin-
106 producing cells (Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul, Experimental Cardiology
107 Center, Porto Alegre, Brazil). The animals were maintained in constant 12-h light/dark
108 cycle, temperature of $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 50–60% relative humidity and were housed in groups
109 of four in standard cages with ad libitum access to drinking water and standard food
110 pellets. All animal procedures were performed according to guidelines of the National
111 Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and all protocols
112 were approved by the Federal University of Rio Grande do Sul Animal Care and Use
113 Committee (process number 30626). For MSC/IPC tracking, we used Lewis rats and
114 transgenic (tg) Lewis rats ubiquitously expressing green fluorescent protein (GFP-tg
115 Lewis).

116 **Chemicals**

117 Streptozotocin (STZ), fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle medium
118 (DMEM) and other materials for cell culture were purchased from Gibco BRL (Carlsbad,
119 CA, USA). S100B protein, anti-S100B antibody (SH-B1), o-phenylenediamine (OPD),
120 anti-S100B antibody (clone SH-B) and anti-synaptophysin were purchased from Santa
121 Cruz Biotechnology (Santa Cruz CA, USA). Anti- β -actin was from EMD Millipore
122 (Darmstadt, Germany). Other reagents were purchased from local commercial suppliers
123 (Sulquímica and Labsul, Porto Alegre, Brazil).

124 **Isolation and expansion of adipose-derived mesenchymal stromal cells (ADSCs)**

125 Epididymal fat was collected aseptically from WKY rats (or GFP-tg Lewis) and minced
126 into small pieces. The fragments were digested with 1.5 mg/mL of collagenase type I
127 (Sigma) and diluted in DMEM without serum for 20 min at 37 °C; 10% FBS with 0.1
128 mg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin in DMEM was then added for interruption
129 of enzymatic activity. After centrifugation at 1500 rpm for 5 min, pellets were
130 resuspended in DMEM with 10% FBS in a wet chamber at 37 °C/5% CO₂ until cell
131 confluence. The cells were detached using 0.05% trypsin-EDTA solution. Cells were used
132 at the fourth passage in all experiments (Wartchow et al., 2019).

133 **Characterization of ADSCs**

134 For surface marker analysis of the isolated ADSCs, cells were incubated with
135 phycoerythrin-conjugated antibodies against murine CD29, CD44, CD90, CD45, CD31,
136 and MHC II for 30 min at 4°C. The cells were analyzed using a FACS Aria III cytometer
137 (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with a 488nm argon laser, and graphs were
138 generated with WinMDI 9.2 software. The adipogenic and osteogenic differentiation of
139 the MSCs was performed according to previously published protocols (da Silva Meirelles
140 et al., 2006). After 4% paraformaldehyde fixation, the calcium deposition and lipid
141 droplets were stained with Alizarin Red S and Oil Red O solution, respectively.

142 **Differentiation of mesenchymal stromal cells into insulin-producing cells (IPCs)**

143 Cells used (in passage 4, P4) were cultured in triplicate in a 6-well plate (TPP) and had a
144 confluence of greater than 80% (~ 4x10⁵ cells/mL). Cells were incubated in a humidified
145 atmosphere at 37°C and 5% CO₂. Control cells were cultured with serum free DMEM.
146 To obtain IPCs (previously described by Wartchow et al., 2019), cells were maintained
147 for 3 days in serum-free DMEM-F12 with 1% penicillin/streptomycin, supplemented

148 with 10 nM nicotinamide (Sigma), 10 ng/ml activin-A (Sigma) and 10 nM exendin-4
149 (Sigma, St. Louis, MO).

150 **Evaluation of glucose-stimulated insulin secretion**

151 Insulin secretion into in the cell culture supernatant was measured by colorimetric assay
152 (Labtest Diagnostica Kits), as indicated by the manufacturer, and employing the Labmax
153 240 equipment (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brazil). Briefly, the IPCs were
154 incubated for 1 hour, twice. Cells were washed carefully three times with DPBS and then
155 incubated with DMEM without glucose and DMEM F12 (17.5 mM glucose),
156 respectively. The two steps each lasted one hour and cell supernatants were collected at
157 the end for evaluation of insulin secretion. Medium insulin was measured again two
158 weeks later in the absence of the differentiation inductors to confirm the maintenance of
159 insulin secretion potential.

160 **DM1 model and surgical procedure for IPC implantation**

161 The DM1 model was induced by intraperitoneal (IP) injection of streptozotocin (STZ)
162 (60 mg/kg in citrate buffer, pH 4.5). Animals with a glycemia of greater than 250 mg/dL
163 were considered diabetic. A schematic representation of the experimental protocol is
164 shown in Fig. 2 A. WKY rats were used to analyze the stromal and immunomodulatory
165 effects of ADSCs and the effectiveness of cell treatment using ADSCs differentiated into
166 IPCs for the prevention of cognitive damage by untreated diabetes. The groups (8 male
167 WKY rats per group) were divided into: **Group I** (Sham group): Animals injected with
168 vehicle via IP injection and submitted to all surgical steps except transplantation. **Group**
169 **II, Group III and Group IV**: Rats injected once with STZ (60 mg/kg body weight) via
170 IP injection. **Group II** (diabetic group - STZ): Animals submitted to all surgical steps
171 except transplantation. **Group III** (SCR -IPCs): Animals received IPCs transplanted into

172 subcapsular renal space (4×10^6 cells/ rat) at 1 week after DM1 induction. **Group IV**
173 (SC- IPCs): Animals received IPCs transplanted into subcutaneous space (4×10^6 cells/
174 rat), at 1 week after DM1 induction.

175 Briefly, on the day of the surgery, all animals were anesthetized with ketamine/xylazine
176 (75 and 10 mg/kg, respectively, i.p.).

177 Surgical procedure for Subcapsular renal implantation: After trichotomy of the
178 left inferior dorsolateral region, the kidney was exposed through a 1.5 cm incision and,
179 with the aid of straight thin forceps, 4×10^6 cells were implanted under the renal capsule.
180 After suturing the two planes with 7.0 suture wire the animal was placed on a heating
181 plate and monitored until it presented reactions to external stimuli.

182 Surgical procedure for subcutaneous implantation: A longitudinal incision
183 (0.5cm) was made in the dorsal of the rat, the skin was separated from the underlying
184 muscle with forceps and 4×10^6 cells were implanted in this subcutaneous space.

185 Similarly, following the same procedure and at the same sites, IPCs from adipose-
186 derived mesenchymal stromal cells of green fluorescent protein (GFP-tg Lewis) rats were
187 transplanted into Lewis rats subjected to diabetes mellitus (induced by STZ) for tracking
188 the cells.

189 **Glycemia control**

190 Weekly blood glucose measurements were performed with a blood glucose monitor
191 (Accu-Chek Advantage II-Roche) on 20- μ L blood samples, collected by pricking the
192 distal portion of animals' tails with an insulin needle.

193 **Peptide C release**

194 Measurement of peptide C content was performed using commercial rat / mouse ELISAs
195 (Millipore), according to the manufacturer's instructions.

196 **AGE measurement**

197 AGEs were measured in the serum by ELISA, as previously described by Ikeda et al.
198 (Ikeda et al., 1996) with some modifications. Briefly, the wells of a microtiter plate were
199 coated overnight with 0.1µg protein in 0.1mL of 50mM carbonate bicarbonate buffer (pH
200 9.6). The wells were washed with washing buffer (PBS containing 0.05% Tween 20) and
201 then incubated for 3h with 2% albumin. Subsequently, wells were washed again and
202 incubated with 100µL of anti-AGE (6D12) for 1h. After washing, wells were incubated
203 with 100µL peroxidase-conjugated secondary antibody for 1h. The reactivity of
204 peroxidase was determined by incubation with OPD for 30 min. The reaction was stopped
205 by the addition of 50µL sulfuric acid (3M). Absorbance measurements were taken at 492
206 nm. Results were calculated and expressed as a percentage of the control.

207 **Novel recognition test (NOR)**

208 The novel recognition test (NOR) is a task comprised of three phases; habituation,
209 training and test performed in an open field apparatus (50 cm side). To habituate the
210 animals, rats were placed in the lateral of the apparatus and allowed to freely explore the
211 open-field arena in the absence of objects during 10 minutes. Twenty-four hours after the
212 habituation phase, the animals underwent a training phase, where the rat was returned to
213 the apparatus that contained two identical sample objects (A + A). 1 hour and 24 hours
214 after the training phase, the rats returned to the apparatus to test short-term (STM) or
215 long-term (LTM) memory, respectively. In the test session, the rat was returned to the
216 open-field arena that contained two objects; one object was identical to the training
217 session and the other object was novel (A + B). For LTM, the object 'B' was replaced by

218 a third one 'C', and the 'A' object was maintained the same. The recognition index in
219 each session was calculated as follows: time exploring the novel object/time exploring
220 both objects. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose
221 and/or forepaws. The apparatus and the objects were thoroughly cleaned with 70%
222 ethanol between the trials to ensure the absence of olfactory cues (Biasibetti et al., 2017).

223 **ELISA for S100B and GFAP**

224 Hippocampal S100B content was measured by ELISA (Leite et al., 2008). Briefly, 50 μ L
225 of sample plus 50 μ L of Tris buffer were incubated for 2h on a microtiter plate previously
226 coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for
227 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30
228 min. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The
229 standard S100B curve ranged from 0.020 to 10 ng/mL. The ELISA for hippocampal
230 GFAP (Tramontina et al., 2007) was carried out by coating the microtiter plate with
231 100 μ L samples containing 30 μ g of protein for 24h at 4°C. Incubation with a rabbit
232 polyclonal anti-GFAP for 2h was followed by incubation with a secondary antibody
233 conjugated with peroxidase for 1h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged
234 from 0.1 to 10 ng/mL.

235 **Western blot analysis for synaptophysin**

236 Proteins in the samples were homogenized in sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8,
237 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (w/v) β -mercaptoethanol and 0.002% bromphenol
238 blue) and separated by SDS-PAGE on 12% (w/v) acrylamide gel before electro
239 transferring onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 2%
240 chicken egg) in tris-buffered saline with Tween 20 (TTBS) ((20 mmol/L Tris-HCl, pH
241 7.5, 137 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20)) and then incubated overnight (4°C).

242 Subsequently, the membranes were incubated overnight with the appropriate primary
243 antibodies: anti-synaptophysin (diluted 1:5,000 in TTBS and 1% and 1% bovine standard
244 albumin (BSA). Next, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with
245 secondary antibody, horseradish peroxidase (HRP)- conjugated anti-mouse IgG
246 (1:10,000, Dako). Actin (Millipore (Darmstadt, Germany)) was used as a loading control.
247 Chemiluminescent bands were detected using Image Quant LAS4000 GE Healthcare, and
248 densitometric analyses were performed using Image-J software. Results are expressed as
249 percentages of the control.

250 **Immunofluorescence**

251 Rats were anesthetized using ketamine/xylazine and were perfused through the left
252 cardiac ventricle with 200 mL of saline solution, followed by 200mL of 4%
253 paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4. The tissues were removed and left
254 for post-fixation in the same fixative solution at 4°C for 24h. Subsequently, the material
255 was cryoprotected by immersing the brain in 30% and 15% sucrose in phosphate buffer
256 at 4°C. The tissues were sectioned (40µm) on a cryostat (Leitz) and the slices were put
257 on the sheets. Sections were surrounded by a liquid blocker pen to help to maintain the
258 antibody solutions in contact with the slices. The slices were covered with Fluor save[®]
259 and the images were captured using an Olympus BX51 phase contrast fluorescent
260 microscope (Olympus, Japan) (Rodrigues et al., 2019).

261 **Protein Determination**

262 Protein content was measured by Lowry's method with some modifications, using bovine
263 serum albumin as the standard (Peterson, 1977).

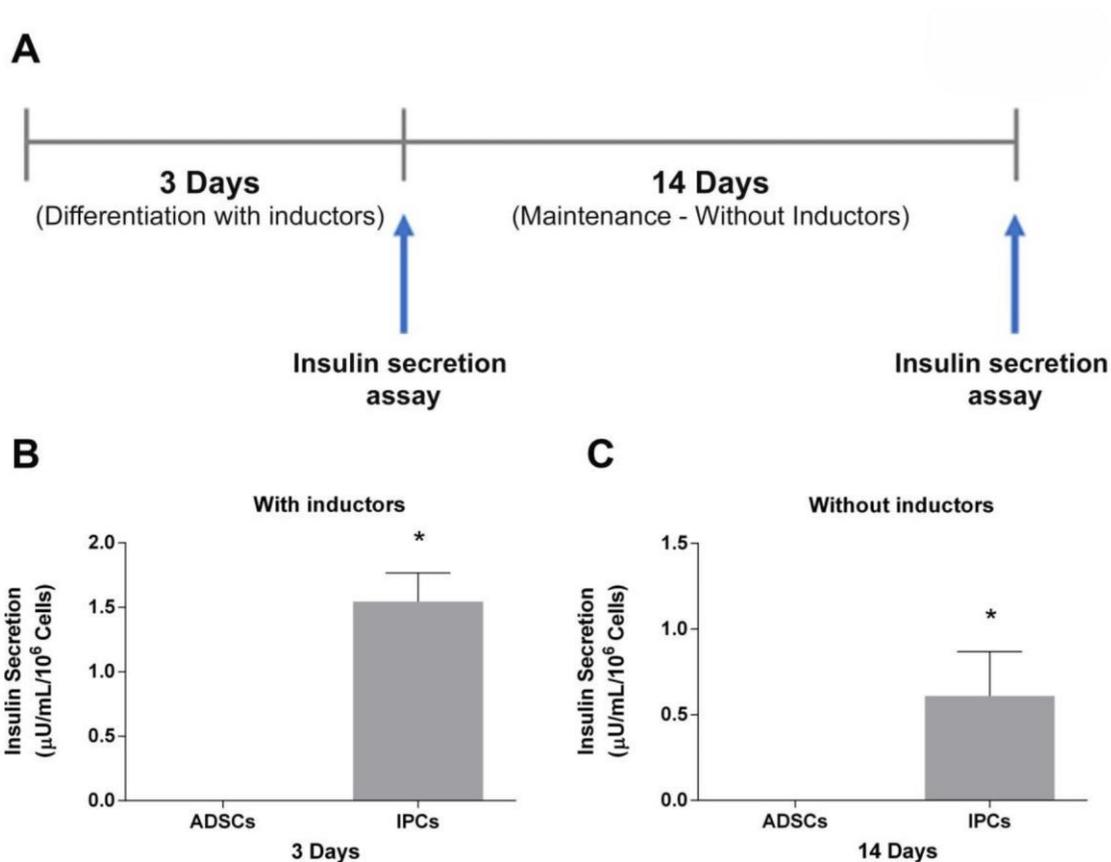
264 **Statistical Analysis**

265 For blood glucose over time, parametric data from the experiments are presented as mean
266 \pm standard error and statistically evaluated by two-way analysis of variance, followed by
267 the Tukey's test. Statistical comparisons between different groups were tested by one-
268 way ANOVA followed by the Tukey's test. For the NOR test, data are presented as means
269 \pm S.E.M. and statistically evaluated by Student's t-test. For the evaluation of glucose-
270 stimulated insulin secretion, statistical comparisons between different groups were made
271 using repeated measures ANOVA followed by Tukey's test. Values of $P < 0.05$ were
272 considered significant. All analyses were performed using the Graphpad Prism software
273 version 6 (La Jolla, CA, USA).

274 **Results**

275 *In vitro glucose-stimulated secretion of insulin in IPCs generated from ADSCs*

276 ADSCs were submitted to a short-term (3 days) differentiation protocol to obtain insulin-
277 producing cells (IPC) containing nicotinamide/exendin-4/activin-A (inductors).
278 Glucose-stimulated secretion of insulin was evaluated immediately after differentiation
279 and 14 days afterwards; during this period they were maintained in culture, but in the
280 absence of inductors. The experimental scheme is shown in Figure 1A. Insulin secretion
281 is compared with ADSCs cultured for the same time. Glucose-stimulated insulin secretion
282 was performed by replacing the basal culture medium with medium containing 0 or 17.5
283 mM glucose. Insulin secretion, measured by colorimetric assay, at 1h after medium
284 replacement corresponds to the difference between the extracellular content of insulin in
285 the presence and absence of glucose. Insulin secretion was clearly characterized, when
286 compared with ADSCs (Fig 1B, $p < 0.0001$). IPCs were able to secrete insulin after 2
287 weeks when stimulated by glucose, even when cultured in the absence of inductors (Fig
288 1C, $p = 0.0323$).



289

290 **Figure 1. *In vitro* glucose-stimulated secretion of insulin in IPCs generated from**
 291 ***ADSCs*.** *ADSCs* were submitted to a short-term (3 days) differentiation protocol with
 292 inductors (nicotinamide/exendin-4/activin-A) to obtain insulin-producing cells (IPC*s*). *A*
 293 shows the timeline of the experiment. Glucose-stimulated secretion of insulin was
 294 evaluated immediately after differentiation (in *B*) and 14 days afterwards (in *C*), during
 295 this period they were maintained in culture, but in the absence of inductors. The insulin
 296 secretion, measured by colorimetric assay at 1h after medium replacement, corresponds
 297 to the difference between the extracellular content of insulin in the presence (17.5 mM)
 298 and absence of glucose. Insulin secretion was significant (* Student t test and $p < 0.05$)
 299 when compared with *ADSCs* at both times. Data are expressed as means \pm SE of 6
 300 independent experiments performed in triplicate.

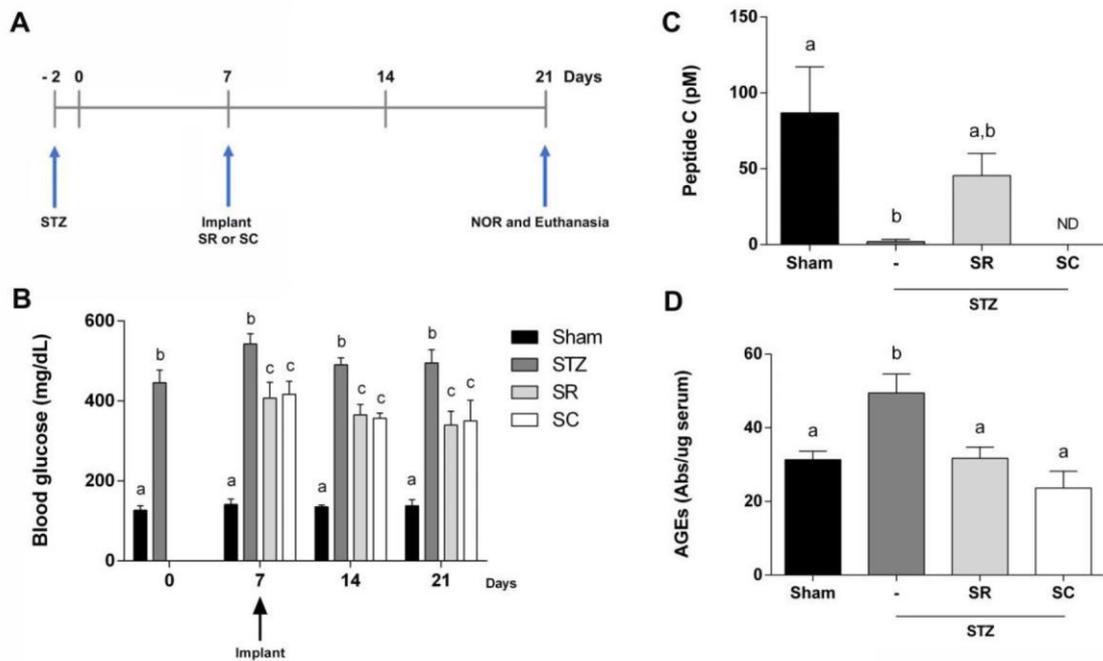
301

302 ***IPC* implantation affects blood glucose, insulin and AGEs in diabetic rats, dependent**
 303 ***on the via of administration***

304 The diabetes mellitus model was induced by STZ and animals were included in the
305 diabetic group when they exhibited a blood glucose of higher than 250 mg/dL (80% of
306 animals). One week after diabetes induction, rats were implanted with IPCs, which were
307 administered by two different routes: subcapsular renal (SR) and subcutaneous (SC). The
308 experimental schedule is shown in Figure 2A.

309 Blood glucose was measured at one day, one week and two weeks after
310 implantation to evaluate the effectiveness of IPCs for controlling glycemia (Figure 2B, p
311 <0.0001 and $f_{(3,112)} = 116.0$). An increase in blood glucose was observed on the second
312 day after STZ administration and in the following weeks in the STZ group. At one week
313 after IPC implantation, blood glucose was reduced independently of the via of
314 administration, although animals still presented high blood glucose levels compared to
315 sham animals. Furthermore, STZ-treated animals lost body weight and this parameter was
316 not altered by IPC implantation (data not shown).

317 Additionally, to confirm *in vivo* insulin secretion, we evaluated serum C-peptide
318 in all experimental groups at two weeks after the implants (Figure 2C, $p <0.0001$ and f
319 $_{(3,20)} = 5.938$). Elevated levels of C-peptide were observed in STZ rats that received IPCs
320 by the SR route, while those that received the SC implant presented non-detectable
321 peptide C levels. In order to evaluate long-term glucose toxicity, we determined serum
322 AGE content and found an increase in AGE levels in diabetics rat, as expected. However,
323 implantation of IPCs at both implant sites (SR and SC) reversed this condition, returning
324 levels to those found in sham group (Figure 2D, $p = 0.0015$ and $f_{(3,20)} = 7.484$).



325

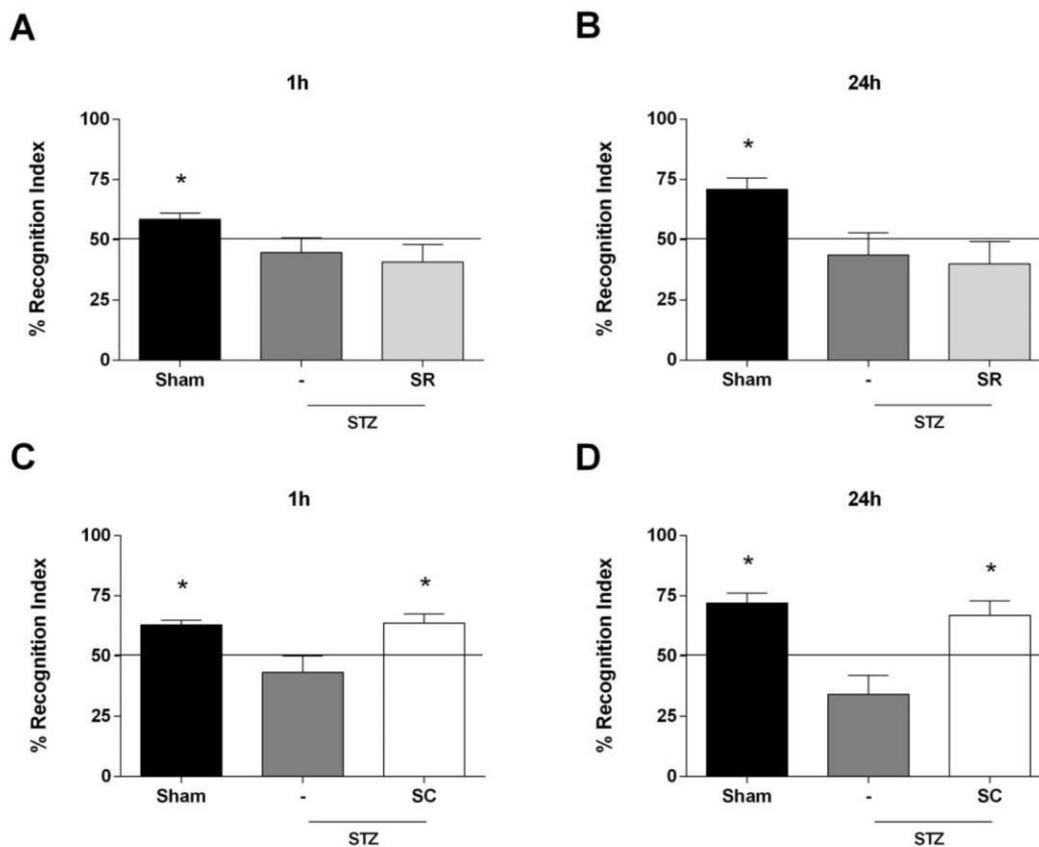
326 **Figure 2. Effect of IPC implantation on blood glucose, insulin and AGEs in diabetic**
 327 **rats depends on the via of administration.** IPCs were implanted into the subcapsular renal
 328 (SR) or subcutaneous (SC) space in STZ diabetic Kyoto-Wistar rats. In A, timeline of the
 329 *in vivo* experiment. In B, blood glucose measurements before (- 1 week) and after (1 and
 330 2 weeks) the IPC implant. Groups were compared each week, by ANOVA. In C, C-
 331 peptide serum content measured by ELISA in the third week after IPC implantation. In
 332 D, serum AGE content, measured by ELISA, in the third week after IPC implantation.
 333 Data are expressed as means \pm SE (8 rats in each group). Letters indicate different
 334 statistical groups by ANOVA followed by Tukey's test, assuming $p < 0.05$.

335

336 ***SC-implanted IPCs prevent cognitive impairment in diabetic rats***

337 At three weeks after STZ-induced diabetes induction (or two weeks after the IPC
 338 implant), rats were submitted to cognitive evaluation, using the novel object recognition
 339 (NOR) test performed at 1 and 24h to evaluate cognitive performance (short- and long-
 340 term memory, respectively). Results demonstrated that three weeks after STZ exposure
 341 were enough to cause cognitive impairment, when compared to the sham group, at both
 342 times evaluated. However, the SR implant of IPCs at one week after STZ was unable to

343 prevent the cognitive deficit observed in diabetic rats, evaluated by the NOR task at 1 h
 344 (Figure 3A, $p_{\text{sham}} = 0.0149$; $p_{\text{STZ}} = 0.4209$; $p_{\text{SR}} = 0.2348$) and at 24 h ($p_{\text{sham}} =$
 345 0.0020 ; $p_{\text{STZ}} = 0.5114$; $p_{\text{SR}} = 0.3120$). In contrast, interestingly, the SC implantation
 346 of IPCs was able to prevent the cognitive deficit found in diabetic rats, as evaluated by
 347 the NOR test at 1 h (Figure 3C, $p_{\text{sham}} = 0.0005$; $p_{\text{STZ}} = 0.3709$; $p_{\text{SC}} = 0.0049$) and at
 348 24 h ($p_{\text{sham}} = 0.0012$; $p_{\text{STZ}} = 0.0838$; $p_{\text{SC}} = 0.0207$).



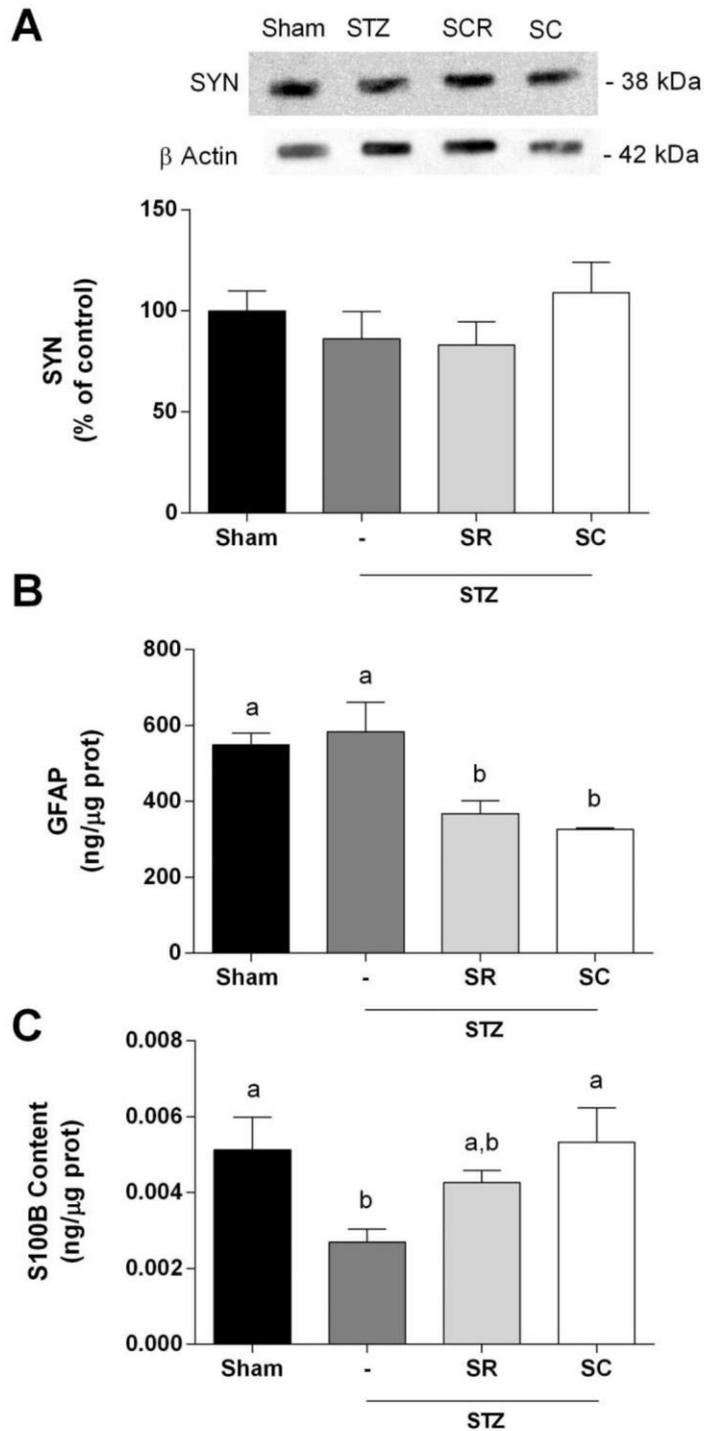
349

350 **Figure 3. Implantation of IPCs via SC, but not SR, prevented cognitive impairment**
 351 **observed in diabetic rats.** the cognitive performance of diabetic rats was performed three
 352 weeks after STZ, by the NOR task at 1 h (for short-term memory) and 24 h (for long-term
 353 memory). IPC implantation was carried out in two different sites: subcapsular renal (SR)
 354 or subcutaneous (SC). In A, object recognition index of rats with or without SR implant
 355 of IPCs, one hour after training trial. In B, object recognition index of rats with or without
 356 SR implant of IPCs, 24 h after training trial. In C, object recognition index of rats with or
 357 without SC implant of IPCs, one hour after training trial. In D, object recognition index

358 of rats with or without SC implant of IPCs, 24 h after training trial. * Statistically different
359 from training trial (Student t test, 8-9 rats/group, $p < 0.05$).

360 ***Hippocampal S100B content was reduced in diabetic rats and prevented by IPC***
361 ***implantation***

362 Three markers, synaptophysin (neuronal marker) and the GFAP and S100B glial markers,
363 were investigated in the hippocampus. Synaptophysin content was not altered at 3 weeks
364 after STZ administration or by IPC implantation in either site (Figure 4A, $F_{(3,21)} = 0.7500$,
365 $p = 0.5345$). However, changes in glial markers were observed; STZ-induced diabetes did
366 not change hippocampal GFAP in rats at 3 weeks, but IPC implantation decreased GFAP,
367 independently of implant via (Figure 4B, $F_{(3,27)} = 6.642$, $p = 0.009$). On the other hand,
368 S100B content was decreased in diabetic rats, and IPC implantation at both sites
369 prevented this alteration; SR implantation partially inhibited the S100B decrease, while
370 SC implantation completely inhibited this decrease (Figure 4C, $F_{(3,27)} = 3.937$, $p =$
371 0.0188).



372

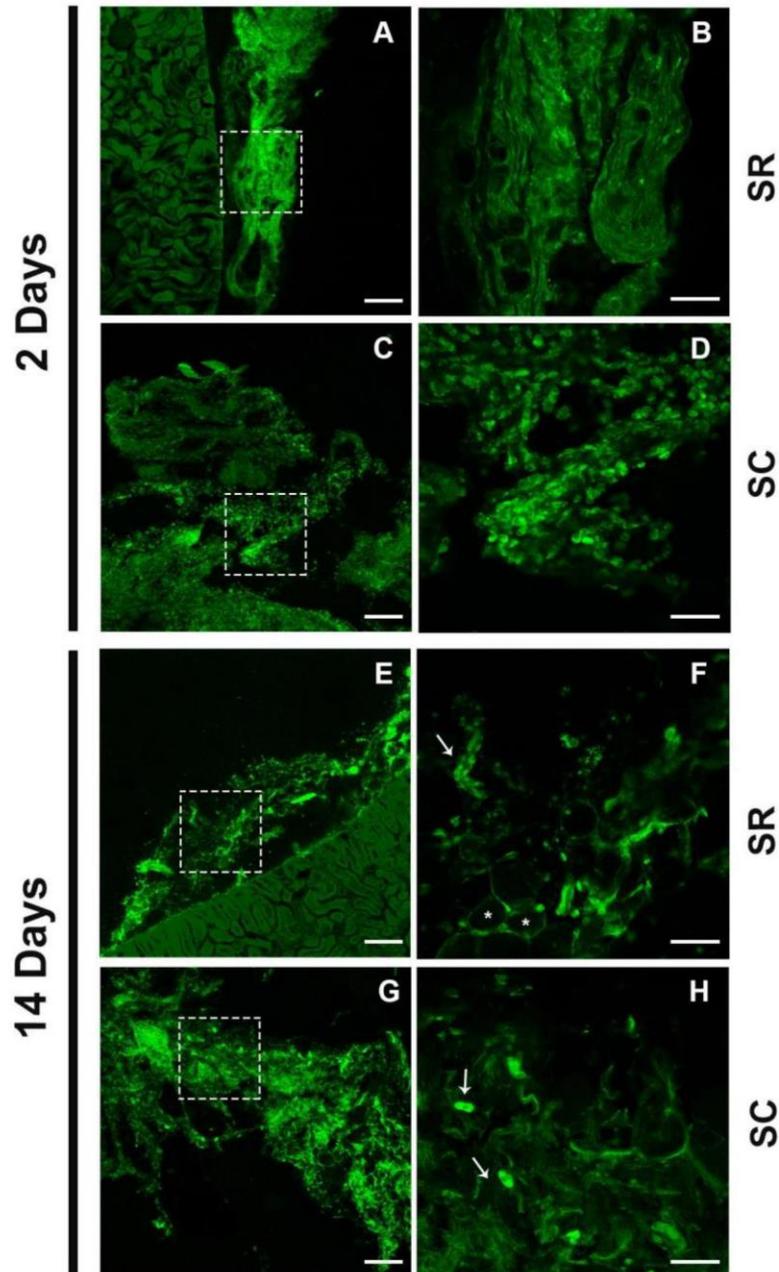
373 **Figure 4. Cell markers in the hippocampus of diabetic rats after IPC implant.**
 374 Immunocontents of three cell markers were investigated in the hippocampus of diabetic
 375 rats at three weeks after STZ, in rats submitted or not to IPC implant (subcapsular renal,
 376 SR, or subcutaneous, SC). In A, the content of synaptophysin (SYN), measured by
 377 Western blotting. Representative blot containing bands of SYN and β -actin at the top of

378 the panel. In B and C, the contents of GFAP and S100B, respectively, measured by
379 ELISA. Data are expressed as means \pm SE (8 rats/group). Letters indicate different
380 statistical groups (ANOVA followed by Tukey's test, assuming $p < 0.05$).

381 ***IPCs survive and maintain undifferentiated morphology after implantation at both sites***

382 Another set of experiments was performed using IPCs from GFP-labelled Lewis rats.
383 GFP+ IPCs were implanted in SR or SC sites and rats were euthanized at 2 or 14 days
384 after implantation. Histological analysis showed that the preparation of IPCs remained
385 morphologically undifferentiated (i.e., they did not exhibit morphological characteristics
386 of adipocytes or osteocytes) two days after the implantation in both sites. Panels A and B
387 of Figure 5 (magnified by 10 X and 40 X, respectively) show representative images at 2
388 days after IPC implantation in the SR site, and panels C and D show images at 2 days
389 after implantation in the SC site (also magnified by 10 X and 40 X, respectively).

390 At fourteen days after implantation (Figure 5 E-H), a decrease in GFP+ cell
391 density in the graft was observed, and an apparent change in the cellular population at
392 both implantation sites (SR and SC), as indicated by the presence of some differentiated
393 adipocytes. Panels E and F of Figure 5 show representative images at 14 days after
394 implantation in the SR site (magnified by 10 X and 40 X, respectively) and panels G and
395 H show images at 14 days after implantation in the SC site (also magnified by 10 X and
396 40 X, respectively).



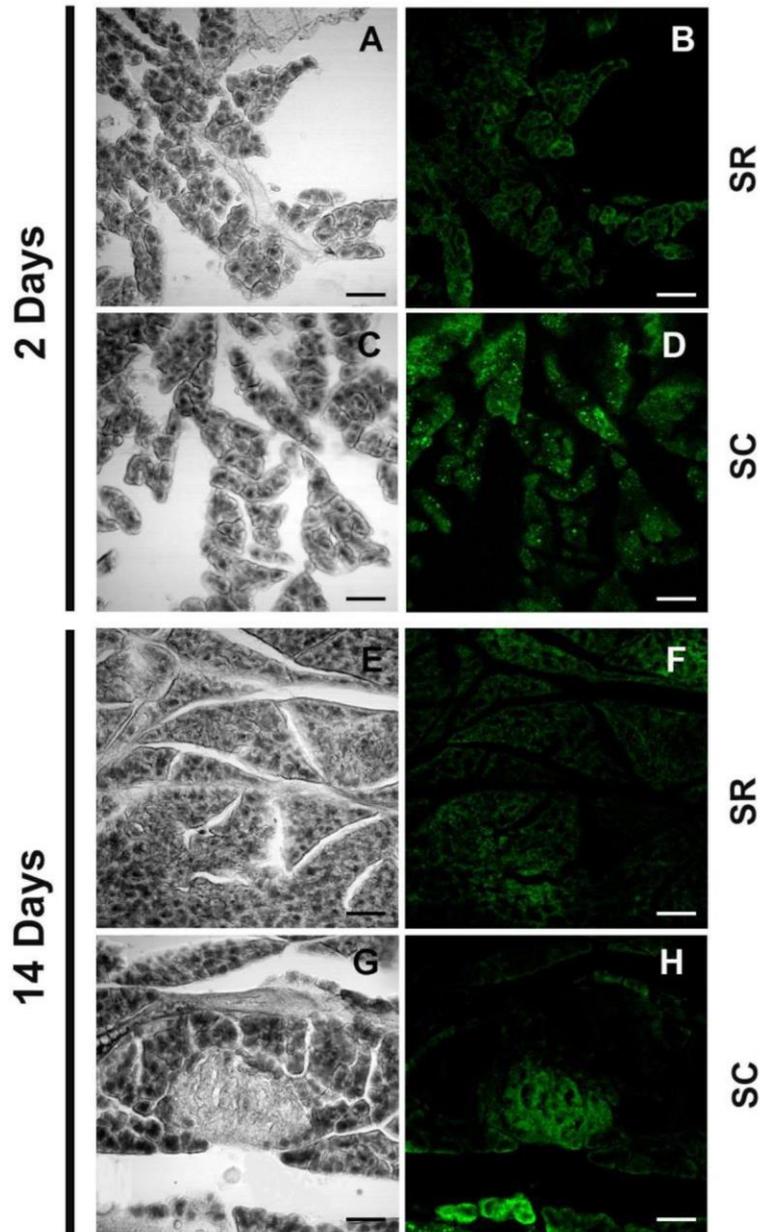
397

398 **Figure 5. GFP+ cells of IPC preparations implanted at the subcapsular renal and**
 399 **subcutaneous implant sites.** IPCs were prepared from mesenchymal stromal cells of
 400 adipose tissue of GFP-tg Lewis rats and implanted in the subcapsular renal (SR) or
 401 subcutaneous (SC) sites. In A and B, fluorescent images in the SR space, two days after
 402 implantation, magnified by 10X and 40X respectively. B corresponds to square in panel
 403 A. In C and D, fluorescent images in the SC space, at two days after implantation,
 404 magnified by 10X and 40X respectively. C corresponds to square in panel A. In E and F,
 405 fluorescent images in the SR space, at fourteen days after implantation, magnified by 10X

406 and 40X by confocal microscopy, respectively. F corresponds to square in panel E. In G
407 and H, fluorescent images in the SC space, at fourteen days after implantation, magnified
408 by 10X and 40X respectively. H corresponds to square in panel G. Scale bars = 150µm
409 (left panels) and 50 µm (right panels). Arrows indicate nuclei of GFP⁺ cells and asterisks
410 indicate adipocyte-like cells.

411 ***GFP⁺ cell from IPC preparations migrate to the pancreas***

412 We found GFP⁺ IPCs, implanted in both the SR and SC sites, in the STZ-damaged
413 pancreas (Figure 6). Within two days after implantation, there were a marked presence of
414 GFP⁺ cells in pancreatic tissue, possibly attracted by signals of damaged tissue. However,
415 when we compared both implant sites, the number of GFP⁺ cells in the pancreas of rats
416 that received SC-implanted IPCs was more abundant than in the SR-implanted rats (**Fig.**
417 **6**, panels D and B, respectively). Over the course of two weeks, a greater fluorescence of
418 GFP⁺ cells were still observed in the pancreatic tissue from SC-implanted rats than in
419 pancreatic tissue from SR-implanted rats (**Fig. 6**, panels H and F, respectively).
420 Interestingly, GFP⁺ cells from the SC implant were organized in clusters in the pancreas
421 than those placed in the SR 14 days after wards.



422

423 **Figure 6. *GFP+ cells of IPC preparations migrate to the pancreas of STZ-diabetic rats.***

424 IPCs were prepared from mesenchymal stromal cells of adipose tissue of GFP-tg Lewis

425 rats and implanted in the subcapsular renal (SR) or subcutaneous (SC) sites.

426 Corresponding phase contrast and fluorescent images, magnified 20X, from pancreatic

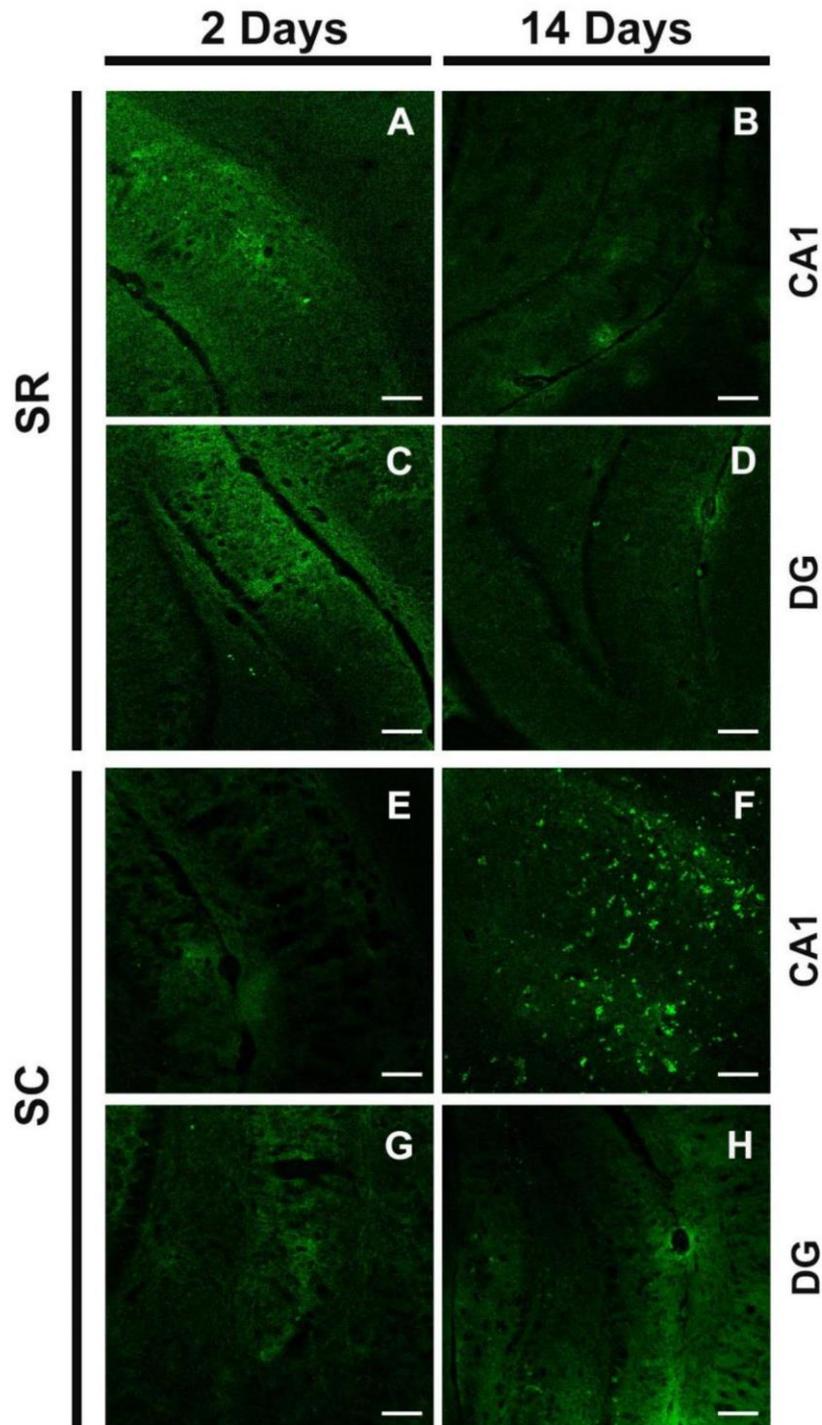
427 tissue of transplanted diabetic rats are shown in the left and right panels, respectively. A

428 and B, pancreatic tissue, two days after SR implant. C and D, two days after SC implant.

429 E and F, fourteen days after SR implant. G and H, fourteen days after SC implant. Scale
430 bar = 80 μ m.

431 *GFP⁺ cell from IPC preparations migrate to the hippocampus*

432 Based on the cognitive improvement of diabetic rats, as evaluated by the NOR task, we
433 investigated the presence of GFP⁺ cells in the hippocampus, in the CA1 and DG regions
434 (Figure 7). At two days after SR (panels A and C, respectively) and SC (panels E and G,
435 respectively) implantations, it was possible to observe GFP⁺ cells around hippocampal
436 vessels in the CA 1 and DG regions. However, at fourteen days after SC implantation, the
437 number of GFP⁺ cells increased in the CA1 (mainly) and DG regions (panels F and H,
438 respectively), while for the SR-implanted rats, the number of GFP⁺ cells in the CA1 and
439 DG regions did not alter significantly from those observed at two days and remained
440 around the blood vessels (panels B and D, respectively).



441

442 **Figure 7. GFP+ cells of the IPC preparation migrate to the hippocampus of STZ-**
 443 **diabetic rats.** IPCs were prepared from mesenchymal stromal cells of the adipose tissue
 444 of GFP-tg Lewis rats and implanted in the subcapsular renal (SR) or subcutaneous (SC)
 445 sites. Presence of GFP+ cells was evaluated by confocal microscopy in CA1 and DG
 446 regions, magnified by 10X. A and B are images of the CA1 region, at two and fourteen

447 days after SR implant, respectively. C and D are images of the DG region, at two and
448 fourteen days after SR implant, respectively. E and F are images of the CA1 region, at
449 two and fourteen days after SC implant, respectively. G and H are images of the DG
450 region, at two and fourteen days after SC implant, respectively. Scale bar = 150 μ m.

451 **Discussion**

452 Several strategies for DM treatment have been proposed in the last years. Insulin
453 therapy achieves overall blood glucose control; however, glycemic variations occur
454 during the intervals of administration, which could contribute to some of the
455 complications of DM. Alternative therapies include the implantation of IPCs, which may
456 be able to ameliorate hyperglycemia and even reverse DM. We have investigated
457 approaches for the implantation of IPCs differentiated from ADSCs using a short-term
458 protocol of culture with nicotinamide/ exendin-4 /activin A, as previously described by
459 (Wartchow et al., 2019). In the present study, we compared the use of two different IPCs
460 implantation sites (SR and SC) to investigate a putative protection against hippocampal
461 damage induced by STZ in the DM1 rat model.

462 Our previous studies have demonstrated that IPCs can be obtained from ADSCs
463 with a short-duration protocol, representing a chance to reduce costs and time in future
464 investigations that employ these cells (Wartchow et al., 2019). We confirmed that short-
465 term differentiation (for 3 days) was enough to obtain active IPCs. Moreover, when IPCs
466 were cultured for an additional 14 days, in the absence of inductors for IPC
467 differentiation, they preserved their ability to secrete insulin. We chose this time because
468 the diabetic animals were analyzed at 14 days after implantation.

469 The SR and SC sites were chosen for IPC implantation, based on advantages in
470 terms of surgical feasibility, as well as the reported achieved hyperglycemic control
471 (Stokes et al., 2017; Yang et al., 2019). Although many studies have investigated the ideal

472 IPC implantation site for the reversal of hyperglycemia, none have compared the
473 implantation sites with the aim of reducing the deleterious effects, caused by DM, on the
474 CNS. Our results show that a reduction of hyperglycemia was observed after implantation
475 at both sites, as observed in previous studies, including ours (Talavera-Adame et al., 2016;
476 Wartchow et al., 2019; Xin et al., 2016). However, serum C-peptide was detected only in
477 SR implanted rats, as also shown by other studies using IPCs for DM1 therapy (Kondo et
478 al., 2017; Talavera-Adame et al., 2016; Xin et al., 2016).

479 Uncontrolled or prolonged hyperglycemia can lead to the formation of advanced
480 glycation end products (AGEs), produced from non-enzymatic glycation and
481 glycooxidation processes, and creating a pro-oxidant environment (Vlassara and Uribarri,
482 2014). Glucotoxicity is one the causes of almost all complications of untreated DM, both
483 peripherally and centrally (Wu and Yan, 2015). Our results demonstrated that, as
484 expected, diabetic rats presented an increase in serum AGEs levels and, interestingly,
485 after IPC implantation at both sites, serum AGEs returned to control levels. This effect
486 may result from the presence of MSCs remaining, along with IPCs, in cell preparations,
487 and these MSCs could provide an autophagic clearance behavior (Hu et al., 2019; Li et
488 al., 2018). MSCs are capable of removing abnormal proteins or glycated amino acids,
489 promoting cell repair *in vivo* (Park et al., 2014). Although the mechanisms of the
490 autophagy activity and scavenging capacity of MSCs in DM1 are unclear, a scavenging
491 capacity and AGE removal has been observed in diabetic wounds (Han et al., 2017),
492 removing intracellular β -amyloid (Shin et al., 2014), abnormal pulmonary epithelial cells
493 (Jung et al., 2013; Zhou and You, 2016) and alleviating beta cell damage (Zhao et al.,
494 2015).

495 Interestingly, based on the NOR task, the cognitive impairment observed in
496 diabetic rats was prevented when IPCs were implanted via the SC space (but not via SR).

497 SC-IPC implanted rats presented improvements in both short- and long-term memory.
498 This cognitive improvement is not due to the hyperglycemia amelioration observed or
499 due to the decrease in circulating AGEs, since these were detected in both the SR and SC
500 groups. Based on the serum C-peptide content, it is also possible to rule out the cognitive
501 improvement in SC group due to increased insulin secretion.

502 Considering the fact that beneficial results in the CNS did not derive from changes
503 in glycemia, AGEs and insulin, we consider a putative effect of the MSCs present in the
504 cellular grafts. The benefits of the use of MSCs for the treatment of cognitive disorders
505 has been well documented. Treatments with MSCs in animal models of Alzheimer`s
506 disease (Cui et al., 2017; Zheng et al., 2017), as well as the effect of exosomes derived
507 from MCSs (Chen et al., 2019; Cui et al., 2018), have been reported, as have their
508 influence on cognitive deficits as a consequence of DM (Nakano et al., 2016).

509 The MSCs have a homing capability, which allow the cells to navigate to regions
510 of injury and inflammation, similarly to the response of leukocytes to cytokines (Kidd et
511 al., 2009; Rüster et al., 2006), promoting tissue repair, including in the brain (Ulrich et
512 al., 2014). Systemic homing consists of a multistep process where cells from the
513 circulation or directly administered reach a target site guided by chemical signals (see.
514 Nitzsche et al., 2017 for a review). It is well known that none of the numerous protocols
515 available for obtaining IPCs result in complete cell differentiation (e.g. Gabr et al., 2014;
516 Xin et al., 2016). Therefore, our implant strategy (4×10^6 differentiated cells/rat) may not
517 have provided enough IPCs for a reversal of the peripheral parameters of DM1, however,
518 implantation in the SC region contributed to a total reversal of the cognition impairment
519 observed. Assuming that IPCs lost their capacity for migration, the presence of MSCs
520 could help explain cognitive improvements in diabetic rats. These cells could migrate to
521 damaged brain sites in diabetic rats. However, it is unclear, at this time, as to why

522 preparations of IPCs implanted in the SC site would provide more cells and/or more
523 effective cells than cells implanted in the SR site, for improving hippocampal damage in
524 diabetic rats.

525 We investigated two specific markers of astrocytes (GFAP and S100B), as well
526 as synaptophysin, a neuron-specific marker, in the hippocampus of diabetic rats,
527 submitted or not to IPC implantation. We did not find any alteration in hippocampal
528 GFAP content at 3 weeks after STZ administration, but we observed a decrease in S100B
529 in diabetic rats, in agreement with our previous report (Nardin et al., 2016). With regard
530 to GFAP, there are conflicting results in the literature, reporting increments, decrements
531 and no changes in the hippocampal tissue (Baydas et al., 2003; Coleman et al., 2010;
532 Nardin et al., 2016; de Senna et al., 2011). It is also important to emphasize that, although
533 GFAP is the most common marker of astrogliosis, its modulation does not indicate
534 cellular dysfunction (Anderson et al., 2014). Herein, diabetic rats did not present changes
535 in hippocampal GFAP, but when they received the IPC implant, independently of
536 implantation in the SC or SC region, a decrease in GFAP was observed. Considering that
537 GFAP expression increases with maturity and injury (Yang and Wang, 2015), we can
538 postulate that astrocytes were “rejuvenated” by the presence of trophic factors released
539 from implanted cells. This possibility requires further study involving other approaches.

540 With regard to hippocampal S100B, conflicting results exist, possibly due to
541 methodological approaches. A transitory increase in S100B-positive cells has been
542 reported at one week after STZ administration (Lebed et al., 2008), which together with
543 our current data, is in agreement with another study using a model of sporadic type
544 Alzheimer’s disease. Alzheimer’s disease can offer a parallel for comparison, due to
545 cognitive impairment and hippocampal astrocyte reactivity, and an increase in
546 hippocampal S100B was described in the first week after induction, with a decrease later,

547 in the fourth week (Dos Santos et al., 2018). S100B has many molecular targets in
548 astrocytes, but is also secreted and has a trophic role in neurons via RAGE (Donato et
549 al., 2009). Interestingly, the decrease in S100B observed in diabetic animals was partially
550 reversed by IPC implantation via SR and fully reversed via SC. This suggests a putative
551 neurotrophic effect mediated by S100B in diabetic rats that received MSC/IPC via SC.

552 Synaptophysin is a membrane protein of synaptic vesicles and related to neuronal
553 plasticity of learning and memory, including in the NOR task (Hernández-Hernández et
554 al., 2018). We measured synaptophysin content and no changes were observed in
555 hippocampal tissue, in agreement with another study performed in STZ-diabetic rats (also
556 analyzed by Western blotting) (Grillo et al., 2005). We firstly hypothesized that a
557 decrease in synaptophysin would occur in diabetic rats, but as seen for glial markers, there
558 are conflicting results in the literature (e.g. (Baptista et al., 2013; Grillo et al., 2005)).
559 However, we cannot exclude the possibility of specific local changes in this protein in the
560 hippocampus, in association with the cognitive deficit observed in diabetic animals.

561 In another set of experiments, we used GFP⁺ cells in order to monitor the implant
562 sites at two and 14 days after the surgery. We wanted to know whether cells survive at
563 the implant site and if they migrate to potentially damaged sites, such as the pancreas and
564 hippocampus. In this study, GFP + cells from the preparation of IPCs were found in the
565 pancreas, lungs and brain. We postulate that undifferentiated MSCs are present in our
566 preparation, which are able to migrate to remote sites (Kurtz, 2008; Schmidt et al., 2006).

567 Two days after IPC implantation, at both sites, we found clusters and isolated
568 GFP⁺ cells. The cells at the SC site presented a looser arrangement than the cells at the
569 SR site. This probably occurred because the kidney capsule is inelastic and has a limited
570 space beneath it that cannot accommodate a large amount of cells and the cells were
571 compressed under the kidney capsule (Gray et al., 1988). With regard to remote organs,

572 we observed cell migration from both implantation sites, but with different distribution
573 profiles. Two days after implantation, GFP⁺ cells from the SC site were apparently more
574 able to migrate to the lungs (data not shown) and pancreas than to the hippocampal tissue.
575 At this time, GFP⁺ cells in hippocampus were found mainly around the blood vessels,
576 consistent with the relative short period to complete migration and brain homing
577 (Kalimuthu et al., 2017; Nitzsche et al., 2017).

578 This scenario changed at two weeks after implantation. We still found a large
579 number of GFP⁺ cells at both SR and SC implant sites, but there was a reduction in the
580 implanted cells that could be attributed to migration and cell death by local conditions
581 (e.g. hypoxia) (Faleo et al., 2017). In fact, we observed the presence of adipocyte-like
582 cells at both implant sites, which were apparently more numerous in the SR site than in
583 the SC site. The presence of adipocytes was confirmed by oil red O staining (data not
584 shown).

585 The SR site is commonly used IPC implantation, where these cells remain
586 producing insulin. In this study, GFP⁺ cells from the IPC preparation implanted at the
587 SR and SC sites were found in the pancreatic tissue. Interestingly, at 14 days after
588 implantation in the SC site, GFP⁺ cells were more numerous and more organized in
589 clusters in the pancreas than those placed in the SR. However, this greater “integration”
590 with pancreatic tissue did not result in a recovery, considering the practically absent
591 insulin secretion in SC implanted animals.

592 At 14 days, GFP⁺ cells implanted at the SC site were found in greater quantity
593 and more scattered in the hippocampus than cells implanted at the SR site, particularly in
594 the CA1 region of the hippocampus, as compared to the dentate gyrus region. In fact, GFP
595 ⁺ cells implanted at the SR site remained around the vessels for longer in both the

596 hippocampal regions. In contrast to observations in the pancreas, the presence of GFP +
597 cells from the SC implant could be associated with the cognitive recovery observed in
598 these animals.

599 MSCs and their products (exosomes, growth factors and cytokines) have been
600 used to protect brain tissues against several types of injury, and their main action in brain
601 repair may be due to the anti-inflammatory and immunosuppressive activities of these
602 cells (Paul and Anisimov, 2013; Rackham et al., 2018; Sherman et al., 2019; Ulrich et al.,
603 2014). Accordingly, our data show a decrease in GFAP and S100B level recovery in the
604 hippocampus of STZ-diabetic animals receiving IPCs, particularly at the SC site.
605 Moreover, locally transplanted MSCs may stimulate hippocampal neurogenesis
606 (Hamisha et al., 2015). Cognitive impairment in STZ-diabetic rats has been reversed by
607 treatment with MSCs administered intravenously and by intranasal administration of
608 exosomes from these cells, suggesting that soluble MSCs are mediators of
609 neuroprotection (Nakano et al., 2016; Ruzicka et al., 2016). Although differences exist
610 between bone marrow and adipose tissue MSCs, it is conceivable that the cognitive
611 improvement observed in STZ-diabetic rats, in this study, is also due to the factors
612 released by MSCs still present in our preparation of IPCs. Apparently, these MSCs
613 survive, migrate and/or release trophic mediators when implanted at the SC site for
614 reasons unclear at this moment. For example, it is possible that the richer blood supply at
615 the SC site (increased after surgery) could explain, in part, the greater cell survival and
616 migration (Carlsson et al., 2001; Jindal et al., 1998).

617 **Conclusions**

618 In the present study, IPCs were implanted at two different sites (SC and SR) in STZ-
619 diabetic rats. The cells implanted in the SC site successfully ameliorated cognitive

620 impairment and modulated hippocampal parameters, such as S100B and GFAP.
621 Peripherally, both implants improved hyperglycemia and caused a reduction in AGEs in
622 diabetic rats, but serum insulin was not observed in the SC group. Using GFP + cell
623 implants, we observed the survival of these cells at the implant sites, as well as their
624 migration to the pancreas and hippocampus. These data suggest the presence of
625 undifferentiated MSCs in our IPC preparation, which could help to explain the peripheral
626 reduction of AGEs (by autophagic depuration) and the recovery of cognitive impairment
627 (by immunomodulation at the hippocampus). Together, these data reinforce the
628 importance of MSCs in neuroprotective strategies, and highlight the logistic importance
629 of the subcutaneous route for administration.

630 **Data Availability**

631 The data used to support the findings of this study are available from the corresponding
632 author upon request.

633 **Acknowledgments**

634 This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
635 Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
636 (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS),
637 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and Instituto Nacional de Ciência e
638 Tecnologia para Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCTEN/CNPq).

639 **Contribution statement**

640 P.S., C.A.G. and K.M.W. designed the study. K.M.W., L.R., L.J.L., B.C.F., N.G.S., A.
641 M., and P.S. performed laboratory experiments and collected data. K.M.W. and P.S.

642 performed statistical analyses. P.S., C.A.G., K.M.W. and L.R. wrote the manuscript. All
643 authors edited and approved the manuscript.

644 **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

645 The authors declare that they have no conflicts of interest.

646

647 **References**

- 648 Aguayo-Mazzucato, C., and Bonner-Weir, S. (2018). Pancreatic β Cell Regeneration as a
649 Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metab.* 27, 57–67.
- 650 Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes.
651 *Neurosci. Lett.* 565, 23–29.
- 652 Baptista, F.I., Pinto, M.J., Elvas, F., Almeida, R.D., and Ambrósio, A.F. (2013). Diabetes alters
653 KIF1A and KIF5B motor proteins in the hippocampus. *PLoS One* 8, e65515.
- 654 Bauduceau, B., Doucet, J., Bordier, L., Garcia, C., Dupuy, O., and Mayaudon, H. (2010).
655 Hypoglycaemia and dementia in diabetic patients. *Diabetes Metab.* 36 Suppl 3, S106-111.
- 656 Baydas, G., Nedzvetskii, V.S., Nerush, P.A., Kirichenko, S.V., and Yoldas, T. (2003). Altered
657 expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in
658 rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life Sci.* 73, 1907–1916.
- 659 van Belle, T.L., Coppieters, K.T., and von Herrath, M.G. (2011). Type 1 diabetes: etiology,
660 immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 91, 79–118.
- 661 Biasibetti, R., Almeida Dos Santos, J.P., Rodrigues, L., Wartchow, K.M., Suardi, L.Z., Nardin, P.,
662 Selistre, N.G., Vázquez, D., and Gonçalves, C.-A. (2017). Hippocampal changes in STZ-model of
663 Alzheimer's disease are dependent on sex. *Behav. Brain Res.* 316, 205–214.
- 664 Bruni, A., Gala-Lopez, B., Pepper, A.R., Abualhassan, N.S., and Shapiro, A.J. (2014). Islet cell
665 transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges.
666 *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 7, 211–223.
- 667 Carlsson, P.O., Palm, F., Andersson, A., and Liss, P. (2001). Markedly decreased oxygen tension
668 in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes* 50, 489–
669 495.
- 670 Chandra, V., Swetha, G., Muthyala, S., Jaiswal, A.K., Bellare, J.R., Nair, P.D., and Bhonde, R.R.
671 (2011). Islet-like cell aggregates generated from human adipose tissue derived stem cells
672 ameliorate experimental diabetes in mice. *PLoS One* 6, e20615.
- 673 Chen, S.-Y., Lin, M.-C., Tsai, J.-S., He, P.-L., Luo, W.-T., Herschman, H., and Li, H.-J. (2019). EP4
674 Antagonist-Elicited Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells Rescue
675 Cognition/Learning Deficiencies by Restoring Brain Cellular Functions. *Stem Cells Transl. Med.*
- 676 Chhabra, P., and Brayman, K.L. (2013). Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to
677 hope. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 328–336.
- 678 Coleman, E.S., Dennis, J.C., Braden, T.D., Judd, R.L., and Posner, P. (2010). Insulin treatment
679 prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats
680 at 4 and 8 weeks of diabetes duration. *Brain Res.* 1306, 131–141.
- 681 Coutinho, W.F., and Silva Júnior, W.S. (2015). Diabetes Care in Brazil. *Ann. Glob. Health* 81,
682 735–741.
- 683 Cui, G.-H., Wu, J., Mou, F.-F., Xie, W.-H., Wang, F.-B., Wang, Q.-L., Fang, J., Xu, Y.-W., Dong, Y.-
684 R., Liu, J.-R., et al. (2018). Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal

685 stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating
686 inflammatory responses in APP/PS1 mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 654–
687 668.

688 Cui, Y., Ma, S., Zhang, C., Cao, W., Liu, M., Li, D., Lv, P., Xing, Q., Qu, R., Yao, N., et al. (2017).
689 Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in
690 Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal
691 neurogenesis. *Behav. Brain Res.* 320, 291–301.

692 Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., and Giambanco, I.
693 (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys.*
694 *Acta* 1793, 1008–1022.

695 Dos Santos, J.P.A., Vizuete, A., Hansen, F., Biasibetti, R., and Gonçalves, C.-A. (2018). Early and
696 Persistent O-GlcNAc Protein Modification in the Streptozotocin Model of Alzheimer's Disease.
697 *J. Alzheimers Dis. JAD* 61, 237–249.

698 Drive, A.D.A. 2451 C., Arlington, S. 900, and Va 22202 1-800-Diabetes Statistics About
699 Diabetes.

700 Faleo, G., Russ, H.A., Wisel, S., Parent, A.V., Nguyen, V., Nair, G.G., Freise, J.E., Villanueva, K.E.,
701 Szot, G.L., Hebrok, M., et al. (2017). Mitigating Ischemic Injury of Stem Cell-Derived Insulin-
702 Producing Cells after Transplant. *Stem Cell Rep.* 9, 807–819.

703 Gray, D.W., Sutton, R., McShane, P., Peters, M., and Morris, P.J. (1988). Exocrine
704 contamination impairs implantation of pancreatic islets transplanted beneath the kidney
705 capsule. *J. Surg. Res.* 45, 432–442.

706 Grillo, C.A., Piroli, G.G., Wood, G.E., Reznikov, L.R., McEwen, B.S., and Reagan, L.P. (2005).
707 Immunocytochemical analysis of synaptic proteins provides new insights into diabetes-
708 mediated plasticity in the rat hippocampus. *Neuroscience* 136, 477–486.

709 Hamisha, K.N., Tfilin, M., Yanai, J., and Turgeman, G. (2015). Mesenchymal stem cells can
710 prevent alterations in behavior and neurogenesis induced by A β 25-35 administration. *J. Mol.*
711 *Neurosci. MN* 55, 1006–1013.

712 Han, Y., Sun, T., Tao, R., Han, Y., and Liu, J. (2017). Clinical application prospect of umbilical
713 cord-derived mesenchymal stem cells on clearance of advanced glycation end products
714 through autophagy on diabetic wound. *Eur. J. Med. Res.* 22, 11.

715 Hernández-Hernández, E.M., Caporal Hernandez, K., Vázquez-Roque, R.A., Díaz, A., de la Cruz,
716 F., Florán, B., and Flores, G. (2018). The neuropeptide-12 improves recognition memory and
717 neuronal plasticity of the limbic system in old rats. *Synap. N. Y. N* 72, e22036.

718 Hu, C., Zhao, L., Wu, D., and Li, L. (2019). Modulating autophagy in mesenchymal stem cells
719 effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 120.

720 Ikeda, K., Higashi, T., Sano, H., Jinnouchi, Y., Yoshida, M., Araki, T., Ueda, S., and Horiuchi, S.
721 (1996). N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in
722 proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry*
723 35, 8075–8083.

- 724 Jindal, R.M., Sidner, R.A., McDaniel, H.B., Johnson, M.S., and Fineberg, S.E. (1998). Intraportal
725 vs kidney subcapsular site for human pancreatic islet transplantation. *Transplant. Proc.* 30,
726 398–399.
- 727 Jing, L., Mai, L., Zhang, J.-Z., Wang, J.-G., Chang, Y., Dong, J.-D., Guo, F.-Y., and Li, P.A. (2013).
728 Diabetes inhibits cerebral ischemia-induced astrocyte activation - an observation in the
729 cingulate cortex. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 980–988.
- 730 Jolival, C.G., Hurford, R., Lee, C.A., Dumaop, W., Rockenstein, E., and Masliah, E. (2010). Type
731 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer’s disease in APP transgenic mice. *Exp. Neurol.*
732 223, 422–431.
- 733 Jung, J., Choi, J.H., Lee, Y., Park, J.-W., Oh, I.-H., Hwang, S.-G., Kim, K.-S., and Kim, G.J. (2013).
734 Human placenta-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration in CCl4 -
735 injured rat liver model via increased autophagic mechanism. *Stem Cells Dayt. Ohio* 31, 1584–
736 1596.
- 737 Kalimuthu, S., Oh, J.M., Gangadaran, P., Zhu, L., Lee, H.W., Rajendran, R.L., Baek, S.H., Jeon,
738 Y.H., Jeong, S.Y., Lee, S.-W., et al. (2017). In Vivo Tracking of Chemokine Receptor CXCR4-
739 Engineered Mesenchymal Stem Cell Migration by Optical Molecular Imaging. *Stem Cells Int.*
740 2017, 8085637.
- 741 Karnieli, O., Izhar-Prato, Y., Bulvik, S., and Efrat, S. (2007). Generation of insulin-producing cells
742 from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells Dayt.*
743 Ohio 25, 2837–2844.
- 744 Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of
745 mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*
746 *Dayt. Ohio* 24, 1294–1301.
- 747 Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V.L., Weil, M.,
748 Andreeff, M., and Marini, F.C. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for
749 tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*
750 *Dayt. Ohio* 27, 2614–2623.
- 751 Klimova, B., Kuca, K., and Maresova, P. (2018). Global View on Alzheimer’s Disease and
752 Diabetes Mellitus: Threats, Risks and Treatment Alzheimer’s Disease and Diabetes Mellitus.
753 *Curr. Alzheimer Res.* 15, 1277–1282.
- 754 Kondo, Y., Toyoda, T., Ito, R., Funato, M., Hosokawa, Y., Matsui, S., Sudo, T., Nakamura, M.,
755 Okada, C., Zhuang, X., et al. (2017). Identification of a small molecule that facilitates the
756 differentiation of human iPSCs/ESCs and mouse embryonic pancreatic explants into pancreatic
757 endocrine cells. *Diabetologia* 60, 1454–1466.
- 758 Kurtz, A. (2008). Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *Int. J. Stem Cells* 1, 1–7.
- 759 Lacy, P.E., Ricordi, C., and Finke, E.H. (1989). Effect of transplantation site and alpha L3T4
760 treatment on survival of rat, hamster, and rabbit islet xenografts in mice. *Transplantation* 47,
761 761–766.
- 762 Lebed, Y.V., Orlovsky, M.A., Nikonenko, A.G., Ushakova, G.A., and Skibo, G.G. (2008). Early
763 reaction of astroglial cells in rat hippocampus to streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci.*
764 *Lett.* 444, 181–185.

- 765 Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V.
766 de, Gottfried, C., and Gonçalves, C.-A. (2008). A simple, sensitive and widely applicable ELISA
767 for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci.*
768 *Methods* 169, 93–99.
- 769 Li, W., Li, K., Gao, J., and Yang, Z. (2018). Autophagy is required for human umbilical cord
770 mesenchymal stem cells to improve spatial working memory in APP/PS1 transgenic mouse
771 model. *Stem Cell Res. Ther.* 9.
- 772 Lin, Y.-C., Harn, H.-J., Lin, P.-C., Chuang, M.-H., Chen, C.-H., Lin, S.-Z., and Chiou, T.-W. (2017).
773 Commercial Production of Autologous Stem Cells and Their Therapeutic Potential for Liver
774 Cirrhosis. *Cell Transplant.* 26, 449–460.
- 775 Mao, X.-Y., Cao, D.-F., Li, X., Yin, J.-Y., Wang, Z.-B., Zhang, Y., Mao, C.-X., Zhou, H.-H., and Liu, Z.-
776 Q. (2014). Huperzine A ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats.
777 *Int. J. Mol. Sci.* 15, 7667–7683.
- 778 Mellgren, A., Schnell Landström, A.H., Petersson, B., and Andersson, A. (1986). The renal
779 subcapsular site offers better growth conditions for transplanted mouse pancreatic islet cells
780 than the liver or spleen. *Diabetologia* 29, 670–672.
- 781 Nakano, M., Nagaishi, K., Konari, N., Saito, Y., Chikenji, T., Mizue, Y., and Fujimiya, M. (2016).
782 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive
783 impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. *Sci. Rep.* 6, 24805.
- 784 Nardin, P., Zanutto, C., Hansen, F., Batassini, C., Gasparin, M.S., Sesterheim, P., and Gonçalves,
785 C.-A. (2016). Peripheral Levels of AGEs and Astrocyte Alterations in the Hippocampus of STZ-
786 Diabetic Rats. *Neurochem. Res.* 41, 2006–2016.
- 787 Nitzsche, F., Müller, C., Lukomska, B., Jolkkonen, J., Deten, A., and Boltze, J. (2017). Concise
788 Review: MSC Adhesion Cascade-Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem*
789 *Cells Dayt. Ohio* 35, 1446–1460.
- 790 Park, H.J., Shin, J.Y., Kim, H.N., Oh, S.H., and Lee, P.H. (2014). Neuroprotective effects of
791 mesenchymal stem cells through autophagy modulation in a parkinsonian model. *Neurobiol.*
792 *Aging* 35, 1920–1928.
- 793 Paul, G., and Anisimov, S.V. (2013). The secretome of mesenchymal stem cells: potential
794 implications for neuroregeneration. *Biochimie* 95, 2246–2256.
- 795 Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is
796 more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- 797 Rackham, C.L., Amisten, S., Persaud, S.J., King, A.J.F., and Jones, P.M. (2018). Mesenchymal
798 stromal cell secretory factors induce sustained improvements in islet function pre- and post-
799 transplantation. *Cytotherapy* 20, 1427–1436.
- 800 Rodrigues, L., Wartchow, K.M., Suardi, L.Z., Federhen, B.C., Selistre, N.G., and Gonçalves, C.-A.
801 (2019). Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins
802 linked to glucose metabolism alterations. *Neurochem. Int.* 128, 85–93.

803 Ruster, B., Göttig, S., Ludwig, R.J., Bistran, R., Müller, S., Seifried, E., Gille, J., and Henschler, R.
804 (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on
805 endothelial cells. *Blood* *108*, 3938–3944.

806 Ruzicka, J., Kulijewicz-Nawrot, M., Rodriguez-Arellano, J.J., Jendelova, P., and Sykova, E. (2016).
807 Mesenchymal Stem Cells Preserve Working Memory in the 3xTg-AD Mouse Model of
808 Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.

809 Sapir, T., Shternhall, K., Meivar-Levy, I., Blumenfeld, T., Cohen, H., Skutelsky, E., Eventov-
810 Friedman, S., Barshack, I., Goldberg, I., Pri-Chen, S., et al. (2005). Cell-replacement therapy for
811 diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc.*
812 *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7964–7969.

813 Schmidt, A., Ladage, D., Steingen, C., Brixius, K., Schinköthe, T., Klinz, F.-J., Schwinger, R.H.G.,
814 Mehlhorn, U., and Bloch, W. (2006). Mesenchymal stem cells transmigrate over the
815 endothelial barrier. *Eur. J. Cell Biol.* *85*, 1179–1188.

816 de Senna, P.N., Ilha, J., Baptista, P.P.A., do Nascimento, P.S., Leite, M.C., Paim, M.F., Gonçalves,
817 C.A., Achaval, M., and Xavier, L.L. (2011). Effects of physical exercise on spatial memory and
818 astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab. Brain Dis.* *26*, 269–279.

819 Sherman, L.S., Romagano, M.P., Williams, S.F., and Rameshwar, P. (2019). Mesenchymal stem
820 cell therapies in brain disease. *Semin. Cell Dev. Biol.*

821 Shin, J.Y., Park, H.J., Kim, H.N., Oh, S.H., Bae, J.-S., Ha, H.-J., and Lee, P.H. (2014). Mesenchymal
822 stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models.
823 *Autophagy* *10*, 32–44.

824 da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside
825 in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* *119*, 2204–2213.

826 Skyler, J.S. (2018). Hope vs hype: where are we in type 1 diabetes? *Diabetologia* *61*, 509–516.

827 Stokes, R.A., Cheng, K., Lalwani, A., Swarbrick, M.M., Thomas, H.E., Loudovaris, T., Kay, T.W.,
828 Hawthorne, W.J., O'Connell, P.J., and Gunton, J.E. (2017). Transplantation sites for human and
829 murine islets. *Diabetologia* *60*, 1961–1971.

830 Sun, Y., Chen, L., Hou, X., Hou, W., Dong, J., Sun, L., Tang, K., Wang, B., Song, J., Li, H., et al.
831 (2007). Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients
832 into insulin-producing cells in vitro. *Chin. Med. J. (Engl.)* *120*, 771–776.

833 Szot, G.L., Koudria, P., and Bluestone, J.A. (2007). Transplantation of pancreatic islets into the
834 kidney capsule of diabetic mice. *J. Vis. Exp. JoVE* *404*.

835 Talavera-Adame, D., Woolcott, O.O., Ignatius-Irundayam, J., Arumugaswami, V., Geller, D.H.,
836 and Dafoe, D.C. (2016). Effective endothelial cell and human pluripotent stem cell interactions
837 generate functional insulin-producing beta cells. *Diabetologia* *59*, 2378–2386.

838 Timper, K., Seboek, D., Eberhardt, M., Linscheid, P., Christ-Crain, M., Keller, U., Müller, B., and
839 Zulewski, H. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into
840 insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *341*,
841 1135–1140.

- 842 Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andrezza,
843 A.C., Gottfried, C., Kapczynski, F., and Gonçalves, C.-A. (2007). Immunoassay for glial fibrillary
844 acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J. Neurosci.*
845 *Methods* *162*, 282–286.
- 846 Ulrich, D., Edwards, S.L., Su, K., Tan, K.S., White, J.F., Ramshaw, J.A.M., Lo, C., Rosamilia, A.,
847 Werkmeister, J.A., and Gargett, C.E. (2014). Human endometrial mesenchymal stem cells
848 modulate the tissue response and mechanical behavior of polyamide mesh implants for pelvic
849 organ prolapse repair. *Tissue Eng. Part A* *20*, 785–798.
- 850 Vanikar, A.V., Trivedi, H.L., and Thakkar, U.G. (2016). Stem cell therapy emerging as the key
851 player in treating type 1 diabetes mellitus. *Cytotherapy* *18*, 1077–1086.
- 852 Vlassara, H., and Uribarri, J. (2014). Advanced glycation end products (AGE) and diabetes:
853 cause, effect, or both? *Curr. Diab. Rep.* *14*, 453.
- 854 Wang, H.-S., Shyu, J.-F., Shen, W.-S., Hsu, H.-C., Chi, T.-C., Chen, C.-P., Huang, S.-W., Shyr, Y.-M.,
855 Tang, K.-T., and Chen, T.-H. (2011). Transplantation of insulin-producing cells derived from
856 umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. *Cell Transplant.* *20*, 455–
857 466.
- 858 Wartchow, K.M., Rodrigues, L., Suardi, L.Z., Federhen, B.C., Selistre, N.G., Gonçalves, C.-A., and
859 Sesterheim, P. (2019). Short-Term Protocols to Obtain Insulin-Producing Cells from Rat Adipose
860 Tissue: Signaling Pathways and In Vivo Effect. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 2458.
- 861 Wu, J., and Yan, L.-J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for
862 studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes Metab. Syndr.*
863 *Obes. Targets Ther.* *8*, 181–188.
- 864 Xin, Y., Jiang, X., Wang, Y., Su, X., Sun, M., Zhang, L., Tan, Y., Wintergerst, K.A., Li, Y., and Li, Y.
865 (2016). Insulin-Producing Cells Differentiated from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem
866 Cells In Vitro Ameliorate Streptozotocin-Induced Diabetic Hyperglycemia. *PLoS One* *11*,
867 e0145838.
- 868 Yang, Z., and Wang, K.K.W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament
869 assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* *38*, 364–374.
- 870 Yang, S.-Y., Yang, K.-C., and Sumi, S. (2019). Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on
871 Xenogeneic Islets in Subcutaneous Transplantation-A Murine Model. *Transplant. Proc.* *51*,
872 1458–1462.
- 873 Zhang, T., Liu, X., Li, Q., Wang, J., Jia, W., and Sun, X. (2010). Exacerbation of ischemia-induced
874 amyloid-beta generation by diabetes is associated with autophagy activation in mice brain.
875 *Neurosci. Lett.* *479*, 215–220.
- 876 Zhang, W.-J., Tan, Y.-F., Yue, J.T.Y., Vranic, M., and Wojtowicz, J.M. (2008). Impairment of
877 hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats. *Acta Neurol. Scand.* *117*,
878 205–210.
- 879 Zhao, K., Hao, H., Liu, J., Tong, C., Cheng, Y., Xie, Z., Zang, L., Mu, Y., and Han, W. (2015). Bone
880 marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic high glucose-induced β -cell injury
881 through modulation of autophagy. *Cell Death Dis.* *6*, e1885.

882 Zheng, X.-Y., Wan, Q.-Q., Zheng, C.-Y., Zhou, H.-L., Dong, X.-Y., Deng, Q.-S., Yao, H., Fu, Q., Gao,
883 M., Yan, Z.-J., et al. (2017). Amniotic Mesenchymal Stem Cells Decrease A β Deposition and
884 Improve Memory in APP/PS1 Transgenic Mice. *Neurochem. Res.* *42*, 2191–2207.

885 Zhou, Z., and You, Z. (2016). Mesenchymal Stem Cells Alleviate LPS-Induced Acute Lung Injury
886 in Mice by MiR-142a-5p-Controlled Pulmonary Endothelial Cell Autophagy. *Cell. Physiol.*
887 *Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *38*, 258–266.

888 Zhou, Y., Luo, Y., and Dai, J. (2013). Axonal and dendritic changes are associated with diabetic
889 encephalopathy in rats: an important risk factor for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD*
890 *34*, 937–947.

891

892

5 CAPÍTULO 3

Estudo da expressão e secreção da S100B em adipócitos derivados de ADSC: *dados preliminares*

Krista Minéia Wartchow^a, Letícia Rodrigues^a, Barbara Carolina Federhen^a, Nicholas Guerini Selistre, Jéssica Brandão, Leo Anderson Martins Meira^a, Carlos-Alberto Gonçalves^{a*} and Patrícia Sesterheim^b.

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Porto Alegre, Brasil.

^b Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Centro Experimental, Porto Alegre, Brasil.

Artigo para Discussão

Capítulo 3 - Estudo da expressão e secreção da S100B em adipócitos derivados de ADSC: dados preliminares

Krista Minéia Wartchow^a, Letícia Rodrigues^a, Barbara Carolina Federhen^a, Nicholas Guerini Selistre, Jéssica Brandão, Leo Anderson Martins Meira^a, Carlos-Alberto Gonçalves^{a*} and Patrícia Sesterheim^b.

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Porto Alegre, Brasil.

^b Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Centro Experimental, Porto Alegre, Brasil.

Artigo para Discussão

Introdução

O tecido adiposo é uma das maiores áreas anatômicas do corpo humano e possui vários papéis fisiológicos, incluindo secreção hormonal e utilização de estoque lipídico (Ahmadian et al., 2010). Contudo, o tecido adiposo não é apenas um tecido de armazenamento de conteúdo lipídico, como se acreditava anteriormente (Kershaw and Flier, 2004). Embora os adipócitos sejam o principal tipo celular presente no tecido adiposo, sua população celular é bastante heterogênea, incluindo células estromais mesenquimais (MSCs) e células imunes.

Altamente regulado pelo sistema nervoso central, o tecido adiposo responde a vários estímulos como hormônios (insulina e catecolaminas), além de fatores parácrinos/autócrinos (adenosina, prostaglandina e outros) (Viswanadha and Londos, 2008). Dos adipócitos derivam algumas proteínas que assumem papel de mensageiras, atuando em receptores específicos em vários tipos celulares, incluindo células endoteliais, musculares e neurônios. Doenças como diabetes e distúrbios cardiovasculares, por exemplo, estão associadas à comunicação inadequada entre essas células e o tecido adiposo (Blüher, 2009; Kershaw and Flier, 2004).

Dentre as proteínas presentes no tecido adiposo, destaca-se a S100B. Tal localização foi relatada pela primeira vez em 1983, por Michetti et al., mostrando que as concentrações de proteínas da família S-100 no tecido adiposo eram comparáveis às encontradas também no cérebro (Michetti et al., 1983). Ou seja, a proteína sérica S100B pode vir tanto das células da glia no SNC quanto de outras fontes como tecido adiposo (Gonçalves et al., 2010).

A S100B é uma proteína de ligação ao cálcio, localizada principalmente em astrócitos no SNC, capaz de atuar como fator neurotrófico ou como uma citocina inflamatória (Donato et al., 2009; Huttunen et al., 2000). Sabe-se, por exemplo, que os níveis de S100B aumentam durante doenças neurológicas e traumas (Kleindienst et al., 2013; Rothermundt et al., 2003), porém a relação com S100B secretada pelo tecido adiposo com essas doenças ainda não está clara. Evidências adicionais sobre o papel da S100B como citocina derivada do tecido adiposo, ou também chamada de adipocina, vêm de dados que mostram que os níveis circulantes de S100B estão positivamente correlacionados com o índice de massa corporal em humanos (Gross et al., 2010; Steiner et al., 2010).

A S100B pode participar da fisiopatologia da obesidade, atuando como um sinal extracelular, sendo o RAGE o seu principal ligante (Donato et al., 2009; Riuzzi et al., 2019; Sorci et al., 2013) que está envolvido na fisiopatologia de várias doenças, incluindo a obesidade (Gaens et al., 2013; Zhang et al., 2017). Os níveis séricos de S100B mostraram se correlacionar com o IMC corporal (Steiner et al., 2010), com a obesidade abdominal e com os níveis séricos de triglicerídeos (Kheirouri et al., 2018). A expressão aumentada e a regulação negativa do receptor RAGE nos pré-adipócitos levaram a uma hipertrofia adipocitária aprimorada e reduzida, respectivamente, e o grupo de animais *knockdown* para o receptor TLR2 suprimiu a hipertrofia adipocitária induzida por RAGE (Monden et al., 2013). A S100B foi proposta como uma adipocina na interação entre adipócitos e os macrófagos, com base na observação de que a S100B regula positivamente o TNF- α e os marcadores pró-inflamatórios nos macrófagos, e que há uma secreção de S100B aumentada pelo TNF- α dos pré-adipócitos. Além disso, o silenciamento de S100B

em pré-adipócitos ou a neutralização do receptor RAGE reduziu significativamente a secreção de TNF- α pelos macrófagos (Fujiya et al., 2014).

Os protocolos mais utilizados para o estudo do tecido adiposo *in vitro*, apresentando benefícios e limitações, são a cultura primária de adipócitos, linhagens celulares de pré-adipócitos, células estromais mesenquimais diferenciadas, cultura de órgãos de tecido adiposo e microdiálise (Ghorbani and Abedinzade, 2013). Contudo, a utilização de células estromais mesenquimais adipo-diferenciadas possui a vantagem de ser uma cultura em que a diferenciação pode ser controlada, podendo gerar uma população heterogênea, composta por células parecidas com a linhagem adipocitária e indiferenciadas, mimetizando condições *in vivo* de complexidade do tecido adiposo (Poulos et al., 2010).

O cultivo de MSCs no meio de diferenciação de adipócitos dá origem ao acúmulo de gotículas lipídicas (Ghorbani et al., 2014). Uma vantagem desse método *in vitro* é a geração de células aderentes em uma cultura de monocamada, o que permite o estudo da regulação a longo prazo das funções dos adipócitos (Adler-Wailes et al., 2010). Obviamente, também existem algumas desvantagens, como a duração do protocolo, onde as células podem não se diferenciar completamente em adipócitos e que a capacidade de diferenciação diminui com o aumento do número de passagens celulares (Ghorbani and Abedinzade, 2013).

Apesar da existência de vários métodos para o estudo do tecido adiposo *in vitro*, ainda existem muitos aspectos a serem elucidados. Considerando nosso campo de interesse, nosso objetivo original foi padronizar um processo de “ontogenia” da S100B *in vitro* e estudar a relação da secreção com o metabolismo da glicose e a presença de

outros importantes mensageiros no tecido adiposo – como por exemplo a insulina e a leptina.

Uma vez que as nossas culturas adipo-diferenciadas expressam e secretam S100B, e que também são moduladas por vias clássicas relacionadas ao metabolismo, este trabalho tem como perspectiva a investigação do proposto eixo S100B/RAGE na inflamação induzida pela obesidade, e a influência do receptor TLR-2 na obesidade e sua relação as infecções virais. Nossa hipótese de trabalho é que a S100B, via RAGE e TLR, possa contribuir para o entendimento da inflamação associada à obesidade e mesmo com a epidemia de obesidade observada no mundo.

Assim, a ideia de submeter este tópico nesta forma é propiciar uma excelente oportunidade para o nosso grupo discutir com uma banca altamente qualificada, visando compreender melhor os resultados preliminares obtidos e, fundamental, discutir perspectivas para novas abordagens, almejando promissoras interações. Reafirmo que a ideia básica da forma escolhida de apresentar este capítulo é propiciar uma intensa discussão.

Materiais e Métodos

Animais

As ADSCs foram isoladas do adiposo epididimal obtidos de ratos machos Wistar Kyoto criados e mantidos no Centro de Cardiologia Experimental (Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil). Os animais foram mantidos em condições controladas de luz e ambiente (ciclo de 12h claro/12h escuro, a uma temperatura constante de 22 ± 2 °C), com livre acesso a comida e água comerciais. Todos os experimentos com os animais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em

Uso de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (processo número 30626).

Isolamento e expansão de células estromais derivadas de tecido adiposo de rato (ADSCs)

A gordura epididimal foi coletada assepticamente dos animais e fragmentada para digestão em 1,5 mg/mL de colagenase tipo I (Sigma) diluída em meio DMEM sem soro por 20 min. A atividade enzimática foi interrompida com DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Brasil), estreptomicina 0,1 mg/mL e penicilina 100 U/mL. Após centrifugação a 300×g, o sedimento foi ressuspensão em um meio suplementado e incubado em uma câmara umidificada a 37°C e 5% de CO₂. As células foram removidas usando uma solução de tripsina-EDTA a 0,05% quando a confluência foi alcançada, para os experimentos foram utilizadas as células na quarta passagem (Wartchow et al., 2019).

Caracterização das ADSCs

A análise dos marcadores de superfície das ADSCs isoladas foi realizada por incubação com anticorpos conjugados com feryeritrina contra CD29, CD44, CD90, CD45, CD31 e MHC II de murino por 30 min a 4°C. As células foram analisadas usando um citômetro FACS Aria III (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipado com um laser de 488 nm de argônio, e os gráficos foram gerados no software WinMDI 9.2. A diferenciação adipogênica e osteogênica das ADSCs foi realizada de acordo com protocolos publicados anteriormente (da Silva Meirelles et al., 2006). Após fixação com paraformaldeído a 4%, a deposição de cálcio e as gotas lipídicas foram coradas com solução de Alizarin Red S e Oil Red O, respectivamente (Wartchow et al., 2019).

Protocolo para diferenciação adipogênica e respectivos tratamentos

Para induzir a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas por 28 dias em placas de 12 poços em meio completo com dexametasona 10^{-8} M, insulina de pâncreas bovina 2,5 µg/ml, indometacina 100 mM e rosiglitazona 5 mM. O fenótipo de adipócito foi confirmado pela coloração com Oil Red, evidenciando os vacúolos de lipídeos (da Silva Meirelles et al., 2006).

Para avaliar o conteúdo/secreção de S100B e a captação de glicose, as células foram tratadas com diferentes concentrações de glicose (17,5 mM, 5 e 0 mM), insulina (10µM), S100B (0,1ng/mL) (Wartchow et al., 2016), leptina (10ng/mL), lactato (20mM), adrenalina (10µM) e forskolina (10µM), na presença de glicose 17,5mM (concentração basal de glicose). Todos os tratamentos ocorrem durante 1h.

Análise da expressão de S100B

- ELISA

O conteúdo e a secreção de S100B foram medidos por ELISA (Leite et al., 2008). Resumidamente, 50µL de amostra mais 50µL de tampão Tris foram incubados por 2 horas em uma placa previamente revestida com anti-S100B monoclonal (SH-B1). O anti-S100B policlonal foi incubado por 30 min e, em seguida, o anticorpo anti-rabbit conjugado com peroxidase foi adicionado por mais 30 min. Uma reação colorimétrica com openilenodiamina foi medida a 492 nm. A curva S100B padrão variou de 0,020 a 10 ng/mL.

- Citometria de fluxo

Para marcação por imunocitoquímica, as células foram tripsinizadas, fixadas com paraformaldeído a 2% e 4% diluído em PBS por 10 minutos a cada etapa, respectivamente. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% em PBS

por 10 min e incubado durante a noite em uma solução de PBS com albumina a 5% e o anticorpo primário para S100B (1:50, Santa Cruz). Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-goat específico conjugado com Alexa Fluor® 647 (1:1000) por 2 horas. Para todos os controles negativos para a imunomarcação, as reações foram realizadas pela omissão do anticorpo primário ou secundário. Nenhuma reatividade foi observada quando o anticorpo primário ou secundário foi excluído. Astrócitos foram utilizados como controle positivo. Um total de 10.000 eventos para cada amostra foram adquiridos pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), medindo a fluorescência vermelha (canal FL-4). A porcentagem de células positivas para S100B foi estabelecida através da análise de dados com o software FCS Express 4 (De Novo, Software, Ontário, Canadá).

- Imunofluorescência

As células foram cultivadas em lamínulas circulares de vidro. Após o tratamento (e controle), as células foram fixadas por 20 min com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PBS, mM): 2,9 KH_2PO_4 ; 38 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 130 NaCl; 1,2 KCl, lavado com PBS e permeabilizado por 20 min em PBS contendo 0,2% de Triton X-100. As células fixadas foram então bloqueadas por 60 min com PBS contendo albumina de soro bovino a 5% e incubadas durante a noite com anticorpo monoclonal anti-S100B (clone H-86) 1:200. Após incubação durante a noite com anticorpos primários, as culturas foram lavadas em PBS/triton a 0,2% (3x5 min) e incubadas por 2 h com o respectivo anticorpo secundário na diluição de 1:1000: Alexa Fluor 528 (cabra anti-rabbit -IgG fluorescência vermelha). Em seguida, as lâminas com as células foram montadas com Fluor Save® e as imagens foram visualizadas com um microscópio confocal Olympus e transferidas para

um computador com câmera digital e o software Fluoviewer 3.1 FV1000 (Wartchow et al., 2019).

Captação de glicose

A captação de glicose foi realizada conforme descrito anteriormente (Wartchow et al., 2016). Resumidamente, as células foram incubadas com DMEM sem glicose durante 1 hora a 37°C. O meio foi removido e as células foram incubadas a 35 ° C em uma solução salina balanceada de Hank (HBSS). O ensaio foi iniciado pela adição de 0,1µCi/poço de D- [2,3-³H] deoxi-glicose. A incubação foi interrompida após 15 minutos, removendo o meio e lavando as fatias duas vezes com HBSS gelado. As células foram então lisadas em uma solução de NaOH 0,5M. A captação de glicose foi calculada subtraindo a captação inespecífica, obtida usando o inibidor do transportador de glicose, citocalasina B (25 µM - inibidor inespecífico do transportador de glicose), da captação total. A radioatividade foi medida usando um contador de cintilação. Os resultados são expressos em nmol/mg de proteína/min.

Determinação proteica

O conteúdo de proteínas foi medido pelo método de Lowry com algumas modificações, usando albumina de soro bovino como padrão (Peterson, 1977).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos seis experimentos independentes e os dados representam médias ± S.E.M. As comparações estatísticas entre os diferentes grupos foram testadas pelo teste t de Student ou ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, quando aplicado. Valores de P <0,05 foram

considerados significativos. Todas as análises foram realizadas no software Graphpad Prism versão 6 (La Jolla, CA, EUA).

Resultados

Expressão de S100B em cultura de ADSCs diferenciada para células adipogênicas

Após atingir 80% de confluência, as ADSCs do tecido adiposo foram submetidas ao protocolo de diferenciação adipogênica. Para avaliar se as células ADSCs diferenciaram para células de adipócitos e se poderiam expressar a proteína S100B, algumas técnicas foram realizadas. O conteúdo de S100B foi avaliado por ELISA aos quatro, sete e vinte e oito dias de diferenciação. Um aumento significativo no conteúdo de S100B foi observado ao longo do tempo, como esperado (Fig.1A) ($p = 0,0006$ e $f_{(2,24)} = 10,28$). Quando comparamos a quantidade de S100B expressa (por ELISA) na cultura adipogênica, ADSCs e tecido adiposo, podemos observar que as células diferenciadas expressam a proteína, enquanto o ELISA não detectou nenhum traço de S100B nas células ADSCs. No entanto, o conteúdo observado não atinge os níveis do tecido adiposo (Fig.1B) ($p < 0,0001$ e $f_{(2,27)} = 49,03$). Para confirmar e observar a expressão de S100B, decidimos também avaliar a proteína por citometria de fluxo (Fig.1F). Como podemos ver, a maioria das células diferenciadas expressam S100B (área vermelha), mas algumas células ainda permanecem negativas para essa proteína (Fig.1G) ($p = 0,0107$).

O fenótipo para adipócito foi observado através da presença de gotas lipídicas citoplasmáticas, que podem ser vistas sob contraste de fase (Fig.1I) ou coradas com Oil Red, um marcador específico para gotas lipídicas (Fig.1J). As imagens de imunofluorescência para anti-S100B mostraram que as células expostas ao protocolo de diferenciação apresentaram maior intensidade de fluorescência (vermelha), e a expressão

de S100B foi observada citosolicamente e amplamente distribuída (Fig. 1L). As células não diferenciadas mostraram-se negativas para o Oil Red e para anti-S100B (Fig. H e K).

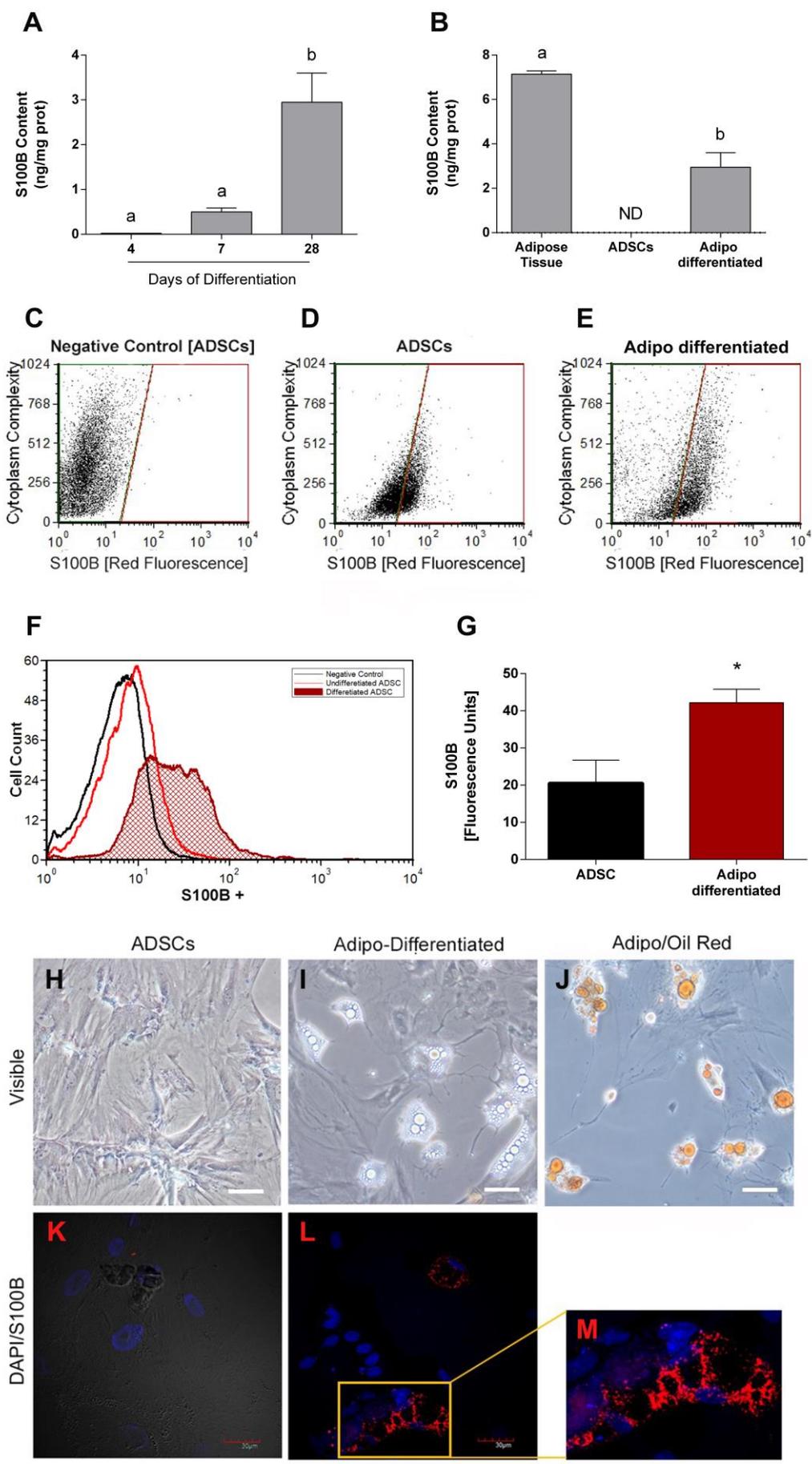


Figura 1. Expressão de S100B em cultura de ADSCs diferenciada para células adipogênicas. O conteúdo de S100B foi avaliado ao longo do tempo, quatro, sete e vinte e oito dias de diferenciação (A) e o conteúdo de S100B foi avaliado em tecido adiposo, ADSCs indiferenciadas e células adipo-diferenciadas (B). Todos os plots da citometria de fluxo são exemplos representativos de pelo menos sete experimentos independentes realizados em triplicata, expressos como unidades fluorescentes de células positivas em relação a 1×10^4 células por amostra. A dispersão lateral (eixo y) representa a complexidade celular e a fluorescência vermelha (eixo x) representa células positivas para a proteína S100B: (C) controle negativo para as ADSCs, (D) ADSCs, (E) células adipo diferenciadas, (F) curva para a contagem celular total e (G) representação gráfica para as células marcadas para S100B. O contraste de fase da cultura de ADSCs (H), as células adipo diferenciadas mostraram uma morfologia típica com gotículas lipídicas no citoplasma celular (I) e coloração com Oil Red para gotas lipídicas (J). Imunofluorescência para S100B (vermelha) e DAPI (azul), com ampliação de 40X por microscopia confocal (K-L), ampliação de zoom mostrando as gotas lipídicas citoplasmática em preto (M). Todas as imagens são campos representativos de pelo menos três experimentos realizados em duplicata. Barra de escala = 30 μm . Os dados são expressos como médias \pm SE de 6-8 experimentos independentes realizados em triplicata. Letras e * indicam diferença estatística entre grupos pelo teste t- Student ou ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, assumindo $p < 0,05$.

Células adipo-diferenciadas secretam S100B em resposta a diferentes estímulos

Após observarmos que as células adipo-diferenciadas foram capazes de expressar a proteína S100B, nossa segunda pergunta foi se elas também eram capazes de secretar essa proteína. Para elucidar esse ponto, tratamos as células com diferentes substâncias conhecidas que influenciam o metabolismo do tecido adiposo e a sinalização celular. Primeiro, avaliamos a influência da concentração de glicose nos adipócitos e observamos que a secreção de S100B diminuiu com a retirada de glicose do meio, com uma diferença significativa na ausência de glicose (Fig.2A) ($p = 0,0466$ e $f_{(2, 30)} = 3,402$). Na presença

de lactato, outro substrato energético, as células apresentaram aumento na secreção de S100B (Fig.2B) ($p = 0,0240$).

Também avaliamos a resposta celular na presença de forskolina (FSK), um ativador da adenilato ciclase (AMPC), e observamos um aumento da secreção de S100B (Fig.2C) ($p < 0,0001$).

Alterações hormonais, como condições normais e/ou estressantes, induzem comportamentos diferentes no tecido adiposo. Quando expomos os adipócitos à adrenalina (Fig.2D) ($p = 0,0235$) e à insulina (Fig.2E) ($p = 0,0080$) aumentamos a secreção de S100B, enquanto que com a presença de leptina, não foi observada alteração na secreção (Fig. .2F) ($p = 0,3843$).

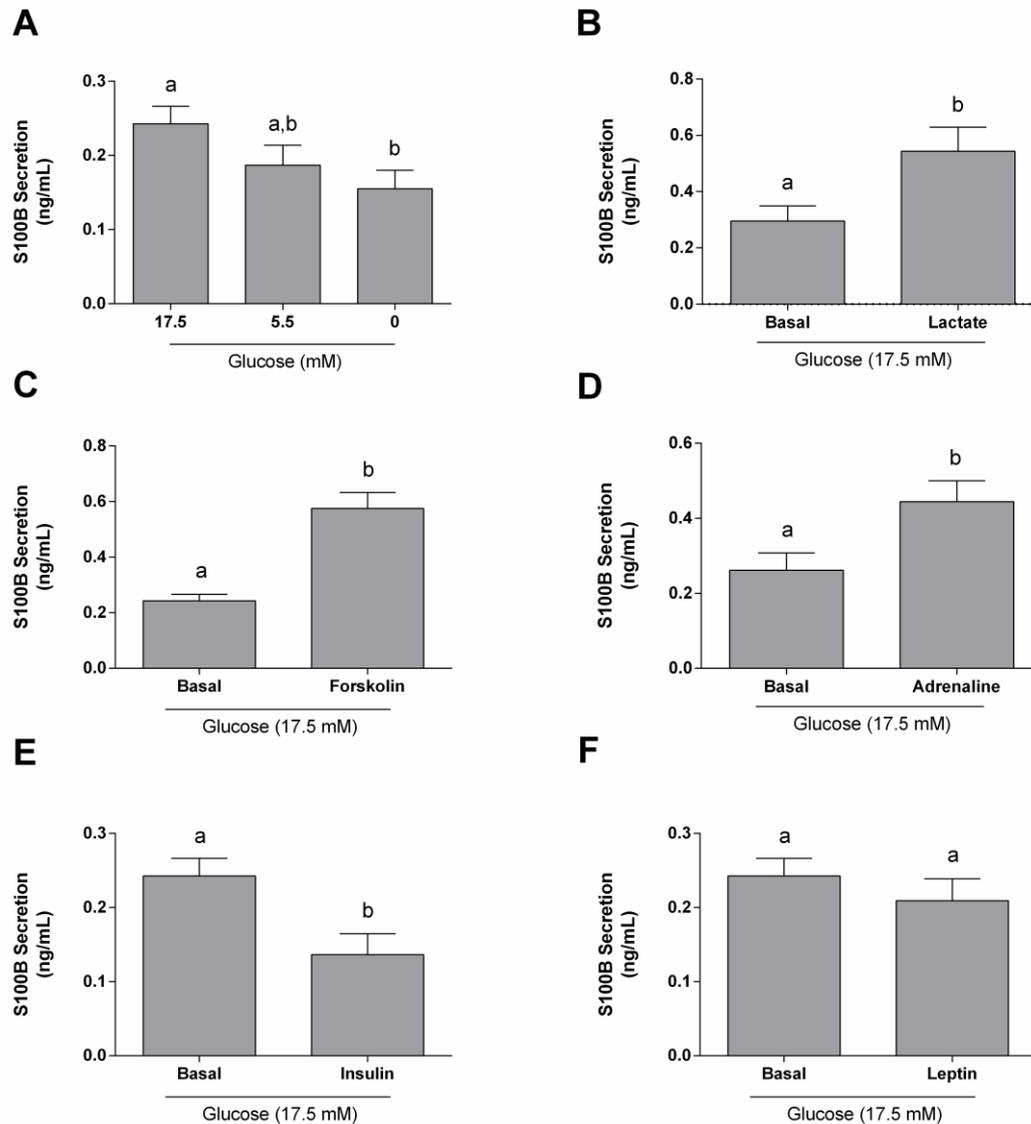


Figura 2. Células adipo-diferenciadas secretam S100B em resposta a diferentes estímulos. Após uma hora de tratamento com: 17,5, 5,5 e 0 mM de glicose (A); Lactato 10 μ M (B); Forskolín 10 μ M (C); Adrenalina 10 μ M (D); Insulina 10 μ M (E) e 10 ng/mL de leptina (F), a secreção de S100B foi avaliada por ELISA. Os dados são expressos como média \pm SE de 8 experimentos independentes realizadas em duplicata. As letras indicam diferença estatística entre os grupos avaliados pelo teste t-Student ou pela ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, assumindo $p < 0,05$.

Diferentes condições alteram a captação de glicose nos adipócitos

Os adipócitos têm um intenso metabolismo glicolítico. A captação de glicose nas células diferenciadas foi observada na presença de altos níveis de glicose, condições basais do meio de diferenciação. Observamos que na presença de insulina (Fig.3B) ($p = 0,0296$), S100B (Fig.3A) ($p = 0,0104$) e adrenalina (Fig.3D) ($p = 0,0045$) ocorreu aumento na captação de glicose, enquanto na presença de lactato não foi observada diferença (Fig.3C) ($p = 0,1472$).

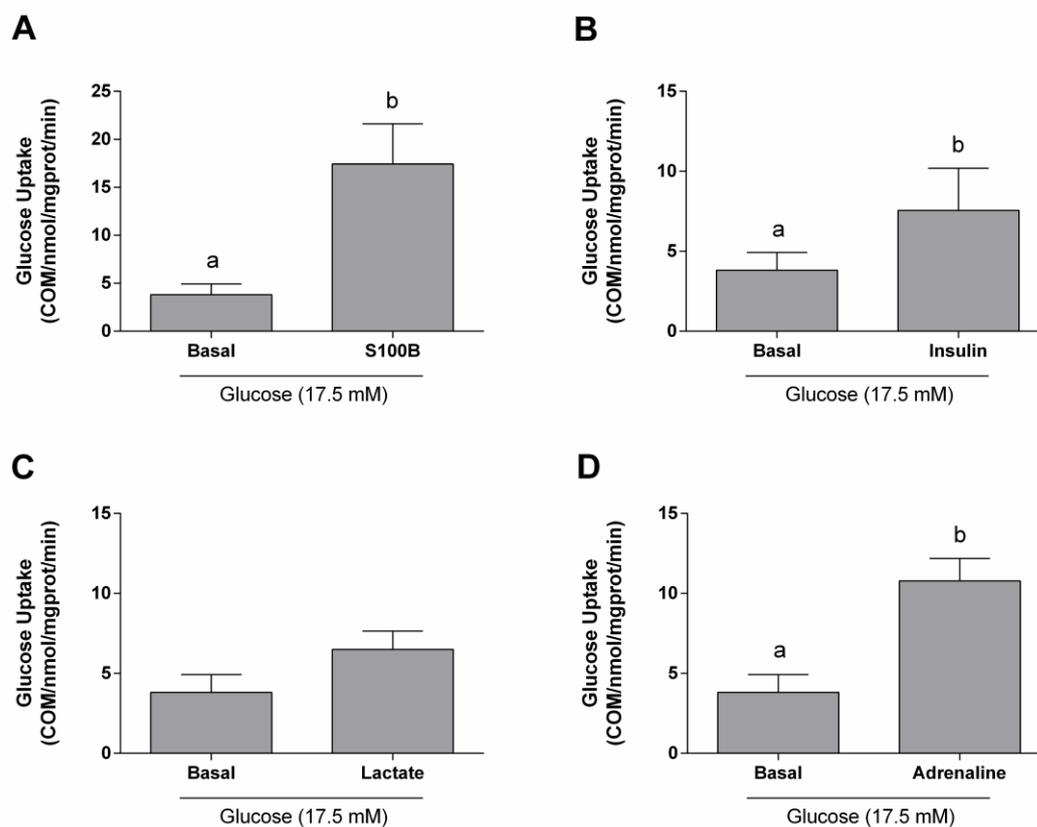


Figura 3. Diferentes condições alteram a captação de glicose nos adipócitos. Após uma hora de tratamento com: 0,1 ng/mL de S100B (A), 10 μ M de insulina (B), 10 μ M de lactato (C) e 10 μ M de adrenalina (D), os meios das células adipo-diferenciadas foram substituídos por HBSS contendo 0,1 μ Ci / poço D- [$3\text{-}^3\text{H}$] glicose e incubados por 15 min.

Os dados são expressos como média \pm SE de 8 experimentos independentes realizados em duplicata. As letras indicam diferença estatística entre grupos avaliados pelo teste t-Student, assumindo $p < 0,05$.

O modelo de diabetes tipo 1 reduziu o peso corporal e, conseqüentemente, reduziu os níveis séricos de S100B

O modelo DM 1 foi induzido por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (60 mg / kg), o peso corporal foi avaliado semanalmente e após 8 semanas do modelo ocorreu a eutanásia dos animais. Uma representação esquemática do protocolo experimental é mostrada na Fig. 4A. Como esperávamos, houve uma redução no peso corporal dos animais DM1 ao longo do tempo (Fig.4B) ($p = 0,0051$ e $f_{(8,81)} = 3.020$), e uma redução nos níveis séricos de S100B foi observada na última semana (Fig.4C) ($p = 0,0155$).

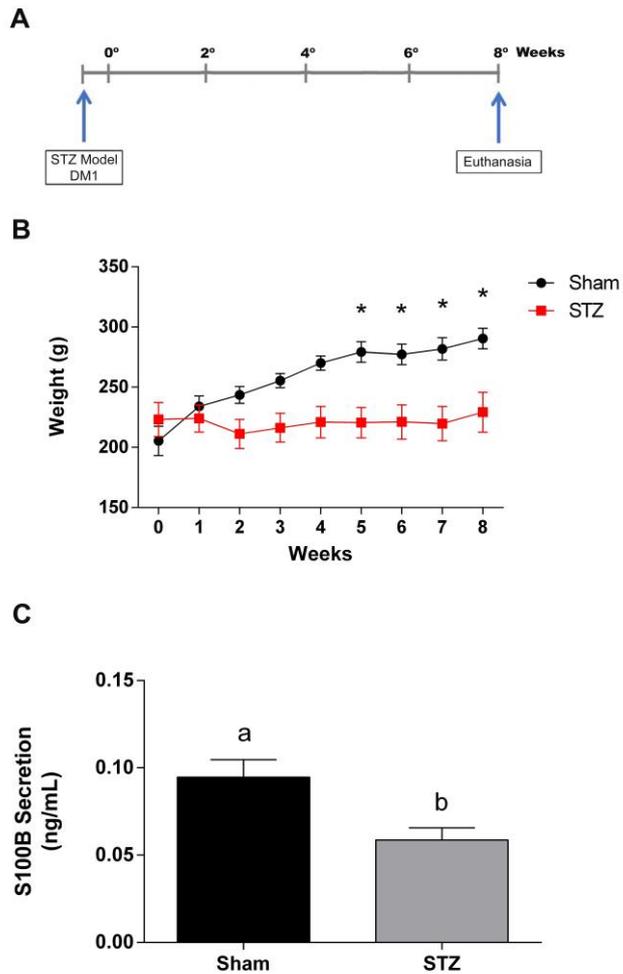


Figura 4. O modelo de diabetes tipo 1 reduziu o peso corporal e, conseqüentemente, reduziu os níveis séricos de S100B. Ratos Kyoto-Wistar machos DM1 induzidos por STZ. Linha do tempo do experimento *in vivo* (A). Peso corporal avaliado semanalmente (B). S100B no soro avaliado por ELISA (C). Os dados são expressos como média \pm SE (n = 8). Letras e * indicam diferença estatística entre grupos avaliados pelo teste t-Student, assumindo $p < 0,05$.

Discussão

Nos últimos anos tem sido dada cada vez mais atenção ao estudo do tecido adiposo e sua implicação no metabolismo. Os dados da literatura mostram várias técnicas

experimentais para adipócitos *in vitro* e cultura adiposa. Para rastrear as atividades de substâncias lipolíticas ou antilipolíticas, o uso de linhagens celulares de pré-adipócitos, MSCs diferenciadas ou adipócitos isolados recentemente fornece um suprimento adequado abundante de células adiposas. Portanto, esses métodos são preferidos quando uma substância é testada pela primeira vez. No entanto, como desvantagem, a capacidade de resposta e as características metabólicas do tecido adiposo podem não ser exatamente representadas por linhagens celulares ou células isoladas (Ghorbani and Abedinzade, 2013).

Em nosso estudo, as ADSCs permaneceram aderentes e com aspecto adipocitário após 28 dias de diferenciação, conforme o esperado. Vacúolos de gordura foram observados intracelularmente, os quais foram confirmados com coloração de Oil Red. Assim, podemos dizer que adquirimos com sucesso uma cultura semelhante a adipócitos.

Como o significado biológico da S100B do tecido adiposo ainda não está claro, ainda é necessário um método *in vitro* que reproduza o comportamento do tecido adiposo para uma melhor compreensão da secreção de S100B periférica. Em nosso estudo, a expressão da proteína S100B foi avaliada por diferentes métodos. A cultura adiposa diferenciada foi capaz de expressar S100B, vista por métodos quantitativos como ELISA e citometria de fluxo, bem como por imunofluorescência.

Após esses resultados, decidimos avaliar também a funcionalidade dessa cultura através da secreção de S100B e captação de glicose, ambas atribuições de tecido adiposo já conhecidas. Aqui, foi observada uma regulação positiva da secreção de S100B nos adipócitos em resposta à forskolina e a adrenalina, provavelmente desencadeada por uma via mediada por AMPc, como ocorre nos astrócitos (Pinto et al., 2000). A insulina, que

atenua a via do AMPc nos adipócitos, causou uma diminuição na liberação de S100B, o que é consistente com a literatura (Suzuki and Kato, 1985).

O grupo de Steiner et al. correlacionou o índice de massa corporal (IMC) em indivíduos sem histórico prévio de distúrbios neurológicos ou psiquiátricos, com níveis séricos de S100B e duas proteínas derivadas do tecido adiposo: leptina e a proteína de ligação a ácidos graxos (A-FABP). Eles observaram que os níveis de S100B estavam intimamente correlacionados com o IMC, bem como com os níveis de leptina e A-FABP (Steiner et al., 2010). A leptina desempenha um papel importante na regulação da homeostase energética e é a principal adipocina secretada pelo tecido adiposo (Blüher and Mantzoros, 2015). No entanto, não observamos alteração da secreção de S100B na presença de leptina, o que poderia ter ocorrido devido à curta duração do tratamento (1 hora) ou à baixa concentração de leptina.

A proteína S100B foi identificada pela primeira vez há quase trinta e cinco anos, com o suposto papel de transportadora de ácidos graxos (Suzuki and Kato, 1985). Como vimos em nosso estudo, a ativação do AMPc pela forskolina e pela adrenalina aumentou a secreção de S100B. Esse resultado provavelmente está ligado ao mecanismo de lipólise no tecido adiposo. Talvez o oposto também seja verdadeiro: a redução da secreção de S100B pode estar ligada à lipogênese, uma vez que a insulina estimula a captação de glicose nos adipócitos, ativando enzimas glicolíticas e lipogênicas e reduzindo a secreção de S100B.

Enquanto isso, removendo a glicose do meio de incubação, podemos observar uma redução na secreção de S100B. Em um organismo, a diminuição dos níveis de glicose no sangue estimula a lipólise e, conseqüentemente, um aumento da secreção de S100B com a liberação de ácidos graxos livres (Suzuki and Kato, 1985). Outro estudo

também revelou uma relação entre S100B sérica, altos níveis de glicose no sangue e concentração de insulina em pacientes saudáveis, mostrando uma diminuição na S100B sérica durante um teste oral de tolerância à glicose que está inversamente correlacionado com a resposta à insulina (Steiner et al., 2014). Em nosso ambiente *in vitro*, as células diferenciadas em adipócitos se comportam como se não tivesse entrada de substrato energético e, portanto, diminuíram a secreção de S100B como uma maneira de se proteger e não ter gasto de energia.

A incubação com lactato provocou um aumento na secreção de S100B, que pode estar relacionada a altos níveis de lactato após o exercício físico e a estimulação da lipólise (Dietrich et al., 2003; Stocchero et al., 2014). Lembrando que a S100B é secretada ao longo da liberação dos FFA, como mencionado anteriormente. Só podemos especular sobre a exclusão da ação do lactato através do receptor HCA1, uma vez que o receptor esteja acoplado à proteína Gi e essa interação resultaria em uma diminuição de S100B (Gonçalves et al., 2018).

Esse eixo regulador S100B-insulina é diferente no tecido adiposo e no SNC, onde há um aumento na secreção de S100B na presença de insulina e uma diminuição na captação de glicose na presença de S100B (Wartchow et al., 2016). A S100B extracelular no tecido adiposo não causou uma diminuição na captação de glicose, como ocorre nos astrócitos. Nesse ponto, é possível especular que, em um ambiente rico em glicose, o eixo insulina-S100B aciona os adipócitos para armazenar glicose, uma vez que tanto a S100B quanto a insulina causaram um aumento na captação de glicose. Enquanto que no SNC, a secreção de S100B estimulada por insulina atua como freio ou feedback negativo para a própria ação da insulina, no tecido adiposo, tanto a S100B quanto a insulina atuam

estimulando a captação de glicose e possivelmente resultando em lipogênese (Wartchow et al., 2016).

Com o aumento dos níveis sanguíneos de adrenalina, a ligação aos receptores α -adrenérgicos estimula a glicogenólise dos músculos hepáticos e esqueléticos e a glicólise dos músculos esqueléticos. A ligação ao receptor β -adrenérgico estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrópico da glândula pituitária e da hipófise, isto é, estimula a lipólise (Berlin et al., 1990). Aqui observamos que a adrenalina teve um comportamento diferente, causando aumento da secreção de S100B e da captação de glicose. Esses eventos podem ter alguma relação uma vez que, como vimos no resultado anterior, na presença de S100B houve um aumento na captação de glicose, o mesmo evento observado com adrenalina. Talvez o que vimos aqui não seja um efeito direto da adrenalina na captação de glicose e mais um efeito da S100B secretada em consequência do tratamento com adrenalina. Outra explicação possível é o fato de o ambiente *in vitro* ter apenas adipócitos e, em um organismo as células musculares aumentariam a captação de glicose. Na ausência de células musculares *in vitro*, os adipócitos aumentaram a captação de glicose por si mesmos.

Em pacientes ou modelos animais com DM1, uma das principais consequências da doença é a hiperglicemia e a baixa secreção ou ausência de insulina (Klimova et al., 2018). Com esses dois eventos em mente, em relação aos nossos resultados *in vitro*, a S100B sérica provavelmente deve ser aumentado no DM1, pois altas concentrações de glicose estimulariam a secreção de S100B para aumentar a captação de glicose, pois não teriam a insulina para obter um feedback negativo. No entanto, este resultado não foi observado: a S100B sérica se mostrou diminuída após o modelo de DM1 não tratado. Acreditamos que essa redução na S100B sérica possa estar relacionada com a perda de

peso do animal, como observado anteriormente por Steiner et al, que relaciona o IMC à concentração sérica de S100B (Steiner et al., 2010).

Conclusão

Altos níveis de S100B estão presentes nos adipócitos e nossos ensaios *in vitro* indicam que a secreção de S100B pode ser modulada por hormônios envolvidos no metabolismo da glicose, provavelmente regulando a lipólise e a lipogênese, como adrenalina e insulina. Embora não esteja claro o significado biológico da S100B extracelular, é provável que o tecido adiposo possa ser uma fonte importante de S100B sérica e estar relacionado a obesidade.

Portanto, este estudo é uma alternativa para uma melhor compreensão da relação entre tecido adiposo e várias doenças como DM1 e a obesidade, provando ser uma boa alternativa para o estudo *in vitro* de S100B. As razões para todos os efeitos aqui observados exigem experimentos adicionais, pois qualquer interpretação destes dados é, até o presente momento, meramente especulativa.

Referências

- Adler-Wailes, D.C., Guiney, E.L., Wolins, N.E., and Yanovski, J.A. (2010). Long-term ritonavir exposure increases fatty acid and glycerol recycling in 3T3-L1 adipocytes as compensatory mechanisms for increased triacylglycerol hydrolysis. *Endocrinology* *151*, 2097–2105.
- Ahmadian, M., Wang, Y., and Sul, H.S. (2010). Lipolysis in adipocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 555–559.
- Berlin, I., Berlan, M., Crespo-Laumonier, B., Landault, C., Payan, C., Puech, A.J., and Turpin, G. (1990). Alterations in beta-adrenergic sensitivity and platelet alpha 2-adrenoceptors in obese women: effect of exercise and caloric restriction. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *78*, 81–87.
- Blüher, M. (2009). Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* *117*, 241–250.
- Blüher, M., and Mantzoros, C.S. (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism.* *64*, 131–145.
- Dietrich, M.O., Tort, A.B., Schaf, D.V., Farina, M., Gonçalves, C.A., Souza, D.O., and Portela, L.V. (2003). Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Can. J. Appl. Physiol. Rev. Can. Physiol. Appl.* *28*, 710–716.
- Donato, R., Sorci, G., Riuizi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., and Giambanco, I. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 1008–1022.
- Fujiya, A., Nagasaki, H., Seino, Y., Okawa, T., Kato, J., Fukami, A., Himeno, T., Uenishi, E., Tsunekawa, S., Kamiya, H., et al. (2014). The role of S100B in the interaction between adipocytes and macrophages. *Obes. Silver Spring Md* *22*, 371–379.
- Gaens, K.H.J., Stehouwer, C.D.A., and Schalkwijk, C.G. (2013). Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. *Curr. Opin. Lipidol.* *24*, 4–11.
- Ghorbani, A., and Abedinzade, M. (2013). Comparison of in vitro and in situ methods for studying lipolysis. *ISRN Endocrinol.* *2013*, 205385.
- Gonçalves, C.A., Leite, M.C., and Guerra, M.C. (2010). Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* *2010*, 790431.
- Gonçalves, C.-A., Rodrigues, L., Bobermin, L.D., Zanotto, C., Vizuete, A., Quincozes-Santos, A., Souza, D.O., and Leite, M.C. (2018). Glycolysis-Derived Compounds From Astrocytes That Modulate Synaptic Communication. *Front. Neurosci.* *12*, 1035.
- Gross, S., Homan van der Heide, J.J.J., van Son, W.J., Gans, R.O.B., Foell, D., Navis, G., and Bakker, S.J.L. (2010). Body mass index and creatinine clearance are associated with steady-state serum concentrations of the cell damage marker S100B in renal transplant recipients. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *16*, CR318-324.
- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., and Rauvala, H. (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* *275*, 40096–40105.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 2548–2556.
- Kheirouri, S., Ebrahimi, E., and Alizadeh, M. (2018). Association of S100B Serum Levels with Metabolic Syndrome and its Components. *Acta Med. Port.* *31*, 201–206.

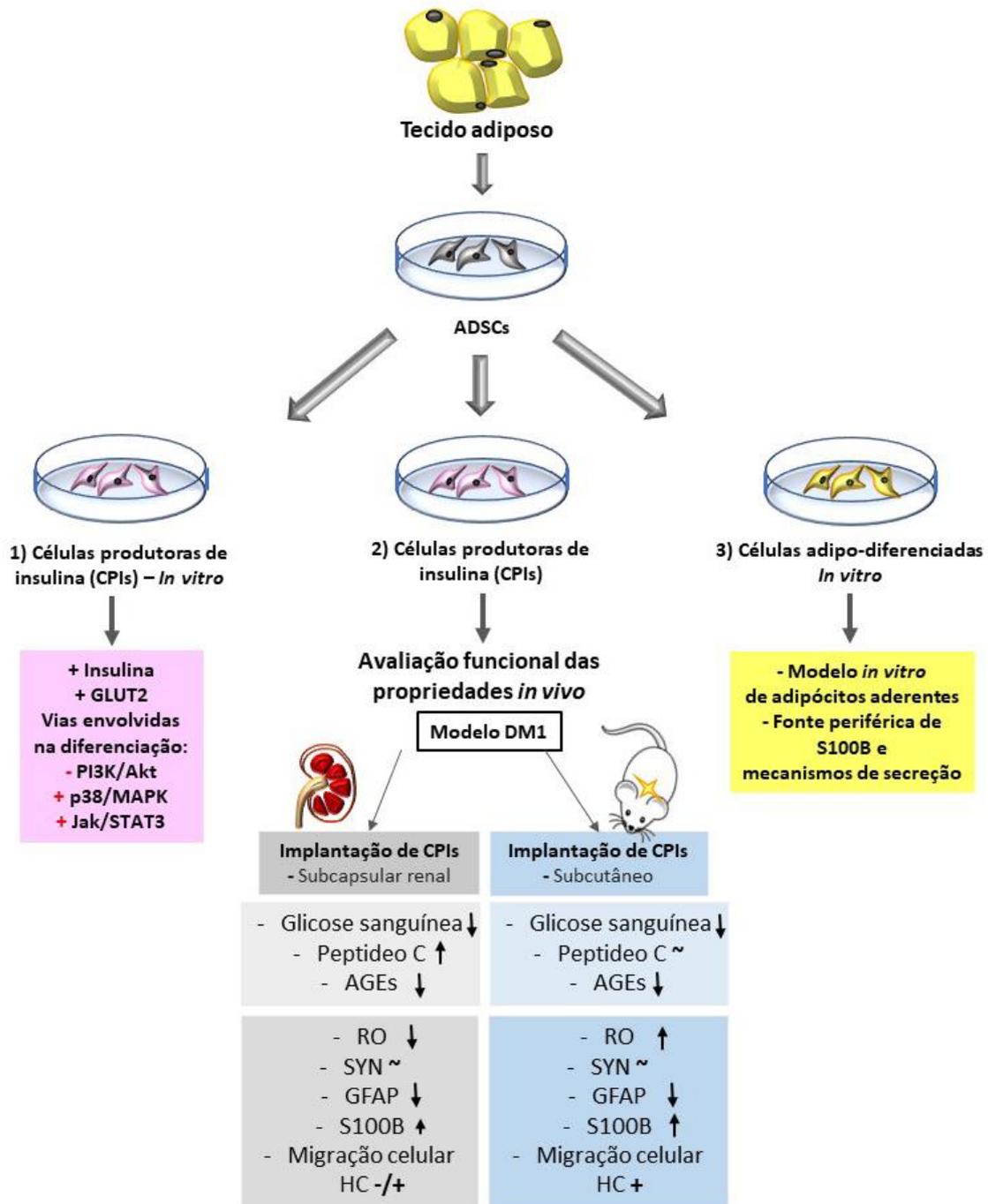
- Kleindienst, A., Grünbeck, F., Buslei, R., Emtmann, I., and Buchfelder, M. (2013). Intraperitoneal treatment with S100B enhances hippocampal neurogenesis in juvenile mice and after experimental brain injury. *Acta Neurochir. (Wien)* *155*, 1351–1360.
- Klimova, B., Kuca, K., and Maresova, P. (2018). Global View on Alzheimer's Disease and Diabetes Mellitus: Threats, Risks and Treatment Alzheimer's Disease and Diabetes Mellitus. *Curr. Alzheimer Res.* *15*, 1277–1282.
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V. de, Gottfried, C., and Gonçalves, C.-A. (2008). A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* *169*, 93–99.
- Michetti, F., Dell'Anna, E., Tiberio, G., and Cocchia, D. (1983). Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res.* *262*, 352–356.
- Monden, M., Koyama, H., Otsuka, Y., Morioka, T., Mori, K., Shoji, T., Mima, Y., Motoyama, K., Fukumoto, S., Shioi, A., et al. (2013). Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: involvement of Toll-like receptor 2. *Diabetes* *62*, 478–489.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* *83*, 346–356.
- Pinto, S.S., Gottfried, C., Mendez, A., Gonçalves, D., Karl, J., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S., and Rodnigh, R. (2000). Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett.* *486*, 203–207.
- Poulos, S.P., Dodson, M.V., and Hausman, G.J. (2010). Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ *235*, 1185–1193.
- Riuzzi, F., Chiappalupi, S., Arcuri, C., Giambanco, I., Sorci, G., and Donato, R. (2019). S100 proteins in obesity: liaisons dangereuses. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.*
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J.H.M., and Arolt, V. (2003). S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* *60*, 614–632.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* *119*, 2204–2213.
- Sorci, G., Riuzzi, F., Giambanco, I., and Donato, R. (2013). RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 101–109.
- Steiner, J., Schiltz, K., Walter, M., Wunderlich, M.T., Keilhoff, G., Brisch, R., Bielau, H., Bernstein, H.-G., Bogerts, B., Schroeter, M.L., et al. (2010). S100B serum levels are closely correlated with body mass index: an important caveat in neuropsychiatric research. *Psychoneuroendocrinology* *35*, 321–324.
- Steiner, J., Bernstein, H.-G., Schiltz, K., Haase, T., Meyer-Lotz, G., Dobrowolny, H., Müller, U.J., Martins-de-Souza, D., Borucki, K., Schroeter, M.L., et al. (2014). Decrease of serum S100B during an oral glucose tolerance test correlates inversely with the insulin response. *Psychoneuroendocrinology* *39*, 33–38.
- Stocchero, C.M.A., Oses, J.P., Cunha, G.S., Martins, J.B., Brum, L.M., Zimmer, E.R., Souza, D.O., Portela, L.V., and Reischak-Oliveira, A. (2014). Serum S100B level increases after running but not cycling exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab.* *39*, 340–344.
- Suzuki, F., and Kato, K. (1985). Inhibition of adipose S-100 protein release by insulin. *Biochim. Biophys. Acta* *845*, 311–316.
- Viswanadha, S., and Londos, C. (2008). Determination of lipolysis in isolated primary adipocytes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *456*, 299–306.
- Wartchow, K.M., Tramontina, A.C., de Souza, D.F., Biasibetti, R., Bobermin, L.D., and Gonçalves, C.-A. (2016). Insulin Stimulates S100B Secretion and These Proteins

- Antagonistically Modulate Brain Glucose Metabolism. *Neurochem. Res.* *41*, 1420–1429.
- Wartchow, K.M., Rodrigues, L., Suardi, L.Z., Federhen, B.C., Selistre, N.G., Gonçalves, C.-A., and Sesterheim, P. (2019). Short-Term Protocols to Obtain Insulin-Producing Cells from Rat Adipose Tissue: Signaling Pathways and In Vivo Effect. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 2458.
- Zhang, J., Zhang, L., Zhang, S., Yu, Q., Xiong, F., Huang, K., Wang, C.-Y., and Yang, P. (2017). HMGB1, an innate alarmin, plays a critical role in chronic inflammation of adipose tissue in obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* *454*, 103–111.

PARTE III

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, as MSCs derivadas de diferentes tecidos, em especial as derivadas de tecido adiposo, têm atraído atenção principalmente pela facilidade de sua obtenção (Chandra et al., 2011; Khorsandi et al., 2016). As MSCs são conhecidas por promoverem a regeneração celular e por proteger as células da apoptose. Além disso, podem ser induzidas a se diferenciar em CPIs funcionais e fornecer uma fonte alternativa para o tratamento do DM (Chen et al., 2008; Gao et al., 2014). Assim, explorar a potencialidade plástica das células-estromais mesenquimais derivadas de múltiplos órgãos e tecidos, incluindo adiposo, tem sido alvo de estudo de vários grupos de pesquisa.



Esquema 1. Desenho esquemático dos resultados descritos nesta tese. Dividida em três capítulos, aqui representados da esquerda para a direita do leitor.

Isolamento e caracterização de células-estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo epididimal (ADSCs)

No presente trabalho, isolou-se e caracterizou-se cultura de células-estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo epididimal de ratos Wistar Kyoto quanto à proliferação de células aderentes ao plástico, perfil fenotípico e capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos e adipócitos, conforme preconizado pela *International Society for Cellular Therapy* (Dominici et al., 2006).

De acordo com os nossos resultados, o isolamento das ADSCs foi satisfatório. Obteve-se culturas homogêneas, com morfologia fibroblastóide e com alta taxa proliferativa. As culturas celulares apresentaram reatividade negativa aos antígenos CD31, CD45 e MHC II e positivas para CD29, CD44 e CD90. Assim, o perfil imunofenotípico das populações celulares utilizadas neste estudo, bem como a capacidade de formar adipócitos e osteócitos, quando submetidas aos protocolos de diferenciação, foram critérios funcionais compatíveis à identificação de células-estromais mesenquimais genuínas.

Buscando mais uma evidência de que o isolamento realizado ocorreu de forma satisfatória e que as ADSCs se apresentavam homogêneas e indiferenciadas, avaliou-se o conteúdo da proteína S100B. Proteína expressa e secretada por adipócitos em concentrações similares às encontradas no tecido nervoso, a S100B foi evidenciada no tecido adiposo primeiramente por Hidaka e colaboradores, no Japão, (Hidaka et al., 1983) e por Michetti e colaboradores, na Itália (Michetti et al., 1983b). No tecido adiposo epididimal de ratos, foi encontrado um conteúdo elevado da proteína S100B, em torno de 1,5 ng/ μ g (Feoli et al., 2008; Gonçalves et al., 2010b). No entanto, ao avaliarmos o conteúdo de S100B nas células estromais mesenquimais derivadas do referido tecido, não

houve expressão desta proteína, evidenciando pureza e homogeneidade da população celular.

Otimização e avaliação de protocolos de diferenciação de ADSCs em células produtoras de insulina (CPIs)

Apesar do fato de existirem vários protocolos de diferenciação em CPIs *in vitro*, ainda há a necessidade de mais estudos e modificações nas estratégias de indução, devido a protocolos longos, complicados e com baixa taxa de eficiência (Karnieli et al., 2007b; Xie et al., 2009; Xin et al., 2016b). Durante este estudo, priorizamos a utilização de protocolos de diferenciação que fossem rápidos e práticos, com a tentativa de utilizar um número reduzido de indutores.

Em meio de cultivo DMEM-F12 (17,5 mM de glicose), as ADSCs foram submetidas a três diferentes protocolos de diferenciação em CPIs: protocolo I (IPC/PI) - durante sete dias, suplementado com 10 nM de nicotinamida; protocolo II (IPC/PII) - durante três dias, suplementado com 10nM de nicotinamida, 10ng/mL de Activina-A e 10 nM de exendina-4 (Khorsandi et al., 2016; Xin et al., 2016b); e protocolo III (IPC/PIII) - durante três dias, suplementado com 10nM de nicotinamida e 25 µM de Resveratrol (Caldarelli et al., 2015).

Embora os mecanismos que levam à diferenciação de MSCs em células produtoras de insulina ainda não são bem compreendidos, os indutores utilizados neste estudo são reconhecidamente importantes neste processo. A nicotinamida, uma vitamina hidrossolúvel do grupo B, inibe a síntese da poli ADP-ribose e possui efeito estimulatório das células progenitoras do pâncreas em células produtoras de insulina, além de efeito protetor da dessensibilização dos receptores de glicose (Tang et al., 2004; Vaca et al., 2008).

Já a exendina-4 (EX-4) é um peptídeo agonista do receptor GLP-1 de ação prolongada (peptídeo semelhante à glucagon 1) que atua diretamente nas células β pancreáticas aumentando a secreção de insulina (Xu et al., 1999), apresentando efeitos benéficos, a longo prazo, sobre os níveis de glicose no sangue (Greig et al., 1999) e sobre o déficit cognitivo em ratos diabéticos (Zanotto et al., 2017). Estudos anteriores revelaram que a EX-4 atua na diferenciação das MSCs em CPIs (Khorsandi et al., 2016; Nejad-Dehbashi et al., 2014; Xin et al., 2016b). Associada à EX4, na necessidade de recriar *in vitro* um ambiente similar à fase embriogênica, as células mesenquimais foram induzidas a formar a endoderme pancreática enriquecendo-se o meio com activina-A, uma proteína da família do TGF- β (do inglês, transforming growth factor β) (D'Amour et al., 2005).

O resveratrol (RSV) é um composto polifenólico natural encontrado em várias frutas e plantas, como na casca de uvas vermelhas, romãs e nozes (Das and Das, 2007). Estudos mostraram que o RSV atua na proteção neural e cardíaca, possui efeitos anti-inflamatórios e também desempenha um papel importante no aumento da expectativa de vida (Das and Das, 2007; Liu et al., 2012; Valenzano et al., 2006). Além disso, o RSV facilita a diferenciação cardiomiocítica e osteogênica de células-tronco embrionárias e células-tronco pluripotentes induzidas, além de ser capaz de prevenir a apoptose celular através da diminuição dos níveis das espécies reativas de oxigênio (Kao et al., 2010; Liu et al., 2016). O RSV é capaz de aumentar a proliferação e diferenciação de células-estromais mesenquimais humanas (Dai et al., 2007). Chen e colaboradores avaliaram a viabilidade das ADSCs pré-condicionadas com resveratrol submetidas a altas concentrações de glicose, observando um efeito protetor (S.-Y. Chen et al., 2019). No entanto, o mecanismo de RSV na regulação de células pluripotentes continua a ser elucidado.

De acordo com os nossos resultados, utilizando estes fatores de indução de diferenciação em CPIs, pode-se observar que nos protocolos IPC/PII, suplementado com EX-4, e IPC/PIII, suplementado com RSV, as células apresentaram maior reatividade à coloração com ditizona (DTZ), um agente quelante de íons de zinco (Zn^{2+}) os quais estão presentes nos grânulos de insulina. Corroborando com esta marcação indireta, a expressão de pró-insulina também foi observada por *western blot*. No entanto, a avaliação da expressão de insulina pelo método de ELISA, um método mais sensível de detecção proteica, o protocolo IPC/PII se mostrou mais eficiente quando comparado aos outros. O mesmo pode ser observado pela imunofluorescência. Dessa maneira, mostramos que tanto IPC/PII quanto o IPC/PIII expressaram pró-insulina, ou seja, tanto a EX-4 quanto o RSV atuam positivamente na diferenciação celular, no entanto a EX-4 possuiu um efeito mais pronunciado, observado pelo aumento de insulina.

Li et al. relataram que a presença de EX-4 aumentou a secreção de insulina diante do estímulo de glicose em células β diferenciadas (H. Li et al., 2010). Como mostrado em nossos resultados, a expressão de insulina foi significativamente aumentada na presença de EX-4 e as células IPC/PII foram responsivas ao estímulo de glicose, além de interromperem a secreção de insulina quando retirado o estímulo, ou seja, quando a concentração de glicose era zero. As células do CPI/PIII tiveram um comportamento semelhante. No entanto, ao se retirar o estímulo de glicose, a secreção de insulina não foi interrompida tendo um aumento superior. Tal ocorrência indica que a EX-4 gera células mais maduras comparadas às células induzidas na presença de RSV.

GLUT-2 é o transportador de glicose expresso predominantemente em hepatócitos e nas células β pancreáticas. Esta isoforma do transportador está envolvida na detecção de glicose em células β pancreáticas e com o mecanismo de secreção de insulina (Kellett

et al., 2008; Olson and Pessin, 1996). Sabe-se que a expressão de insulina e de GLUT-2 confirmam a diferenciação e a funcionalidade das CPIs. Ao se avaliar a expressão do GLUT-2 por *western blot* e por imunofluorescência, tanto o protocolo IPC/PII quanto o IPC/PIII tiveram um aumento da sua expressão. A captação de glicose se mostrou aumentada em todos os protocolos avaliados, isto provavelmente se deve ao aumento da expressão do GLUT-2, mas também pelo aumento de outros transportadores aqui não avaliados, já que o protocolo IPC/PI também teve um aumento significativo da captação de glicose, mas o mesmo não foi observado com a expressão de GLUT-2.

Os protocolos de diferenciação não alteraram a taxa de multiplicação e nem o número de células ao final da indução, provavelmente pelo curto período de tratamento (3-7 dias). Caso prolongássemos o tempo de indução, provavelmente encontraríamos uma redução significativa no número de células em comparação às ADSCs (Guihai, 2017).

Avaliação das vias de sinalização envolvidas nos protocolos de diferenciação de ADSCs em CPIs

É bem definido que modificações de vias de sinalização podem influenciar no processo final de diferenciação celular das MSCs, e que muitos estímulos são utilizados para direcionar a um tipo celular específico. No entanto, ainda não está claro como essas vias afetam as MSCs e como a manipulação de diferentes indutores pode levar a protocolos de diferenciação mais eficientes. Em nosso trabalho, primamos pela obtenção de um protocolo funcional, de aplicação simples, atingindo populações celulares capazes de mostrar sinais de transdiferenciação em um período curto de tempo. Para tanto, avaliamos três diferentes protocolos e suas vias de diferenciação envolvidas nesta fase inicial.

As MAPKs são proteínas cinases ativadas por mitógeno que desempenham um papel central na transmissão de sinais dos receptores de superfície celular. São proteínas serina-treonina específicas expressas em todos os tipos celulares, sendo componentes essenciais da maquinaria de transdução de sinal na regulação da sobrevivência celular, motilidade, apoptose, proliferação e diferenciação celular (Garrington and Johnson, 1999; Gehart et al., 2010). Essa via de sinalização está envolvida no crescimento e diferenciação celular (Sosa et al., 2011), desempenhando papéis cruciais na condrogênese e osteogênese nas MSCs (Li et al., 2010; Stanton et al., 2003). Zhang e colaboradores mostraram que estas proteínas são importantes na proliferação e diferenciação de células-estromais mesenquimais derivadas de polpa dentária (DPSCs) (Zhang et al., 2012). Quanto à diferenciação em CPIs, o conhecimento é ainda muito reduzido, e poucos trabalhos avaliam por quais vias de sinalização ocorre a diferenciação e como elas estão relacionadas com os diferentes indutores e os diferentes períodos de diferenciação.

As MAPKs incluem as proteínas cinases reguladas por sinal extracelular (Erks), as proteínas cinases N-terminais p38 e JNK. Em nossos resultados, podemos observar um aumento da fosforilação da MAPK/p38 no protocolo IPC/PII avaliada por *western blot*, enquanto que fosforilação do IRS-1, STAT3 e o PI3K não foi alterada. A EX-4 é um agonista GLP-1 e atua se ligando no receptor GLP-1 ativando a via de sinalização AMPc/PKA/ MAPK p38 (Roussel et al., 2016; Yang et al., 2016). Na presença do inibidor SB203580 10 μ M (inibidor da p38), não foi observado o aumento do conteúdo de insulina no IPC/PII, permanecendo com valores basais. Este resultado revela que a via da MAPK/p38 atua positivamente na diferenciação celular em CPIs sendo essencial no processo, pois quando a via estava inibida o aumento da expressão insulina não foi mais observado.

O RSV também foi escolhido como possível indutor de diferenciação, pois como já foi mostrado em trabalhos anteriores, possui capacidade de promover a diferenciação osteogênica, como também é capaz de estimular a diferenciação de ESCs em cardiomiócitos (Ding et al., 2016; Liu et al., 2016). Caldarelli et al mostraram o efeito do RSV na diferenciação de células estromais mesenquimais, em que 25 μ M de RSV induziu adipogênese. Além disso, observaram que o RSV pode atuar como agonista de insulina ativando o receptor de insulina (Caldarelli et al., 2015). Com o objetivo de avaliar a possível via de diferenciação celular nas CPIs, avaliou-se por *western blot* a fosforilação da STAT3 e do IRS-1, ambas as vias relacionadas com a diferenciação celular e o RSV. A sinalização Jak/STAT3 tem importância na manutenção da pluripotência ESCs de roedores (Chen et al., 2015). Nossos resultados mostraram que o protocolo IPC/PIII, suplementado com RSV, ativou STAT3 e inibiu IRS-1. Provavelmente, o RSV ativa a via da Jak/ STAT3/ SOCS1/3, e o aumento de SOCS3 regula negativamente a sinalização da insulina, inibindo o IRS-1 (Fan et al., 2014; Galic et al., 2014). Conseqüentemente, não apresenta aumento na fosforilação da PI3K e nem da via da MAPK/p38. A ativação da via da Jak/STAT3 se mostrou importante, já que promoveu um aumento razoável na expressão de insulina pelo protocolo IPC/PIII.

A via de sinalização da PI3K/AKT é muito importante na sinalização da insulina (Kozma and Thomas, 2002). A AKT tem um dos principais papéis nas células produtoras de insulina, uma vez que é necessária para induzir o transporte de glicose (Kohn et al., 1996). A via da PI3K regula indiretamente a diferenciação de células endócrinas via inativação do fator de transcrição Forkhead box O1, que bloqueia a expressão do PDX-1 e estimula a expressão de neurogênicos diferenciação 1 (Kitamura and Ido Kitamura, 2007). Todos estes três fatores de transcrição participam na diferenciação de células endócrinas e na expressão do gene de insulina nas células beta pancreáticas (Docherty et

al., 2005). Portanto, a ativação da PI3K pode ser um dos eventos importantes na diferenciação de células endócrinas pancreáticas.

No entanto, a literatura é controversa. Hori et al utilizou o LY294002, um inibidor não seletivo da via da PI3K, e observou que células-tronco embrionárias de ratos se diferenciaram em células produtoras de insulina, com maior semelhança as β pancreáticas (Hori et al., 2002). Corroborando com esses resultados Mao *et al* sugeriram que o inibidor PI3K não-seletivo LY294002 e o inibidor da subunidade PI3K β o TGX-221 contribuem para a diferenciação das células-tronco embrionárias em células β (Mao et al., 2017).

Este mesmo efeito foi observado em nosso estudo, na presença do inibidor LY94002, as células não diferenciadas aumentaram a expressão de insulina, e revelaram um efeito *per se* do inibidor. Quando o inibidor foi adicionado junto com os protocolos de indução, se observou um aumento da expressão de insulina comparado com o efeito individual da EX-4 no grupo IPC/PII. Assim, ambos, LY94002 e EX-4 tiveram um efeito aditivo, praticamente duplicando o conteúdo de insulina. Pode-se também observar que o mesmo efeito aditivo observado no grupo IPC/PII ocorreu também no grupo IPC/PIII suplementado com resveratrol. Isso nos leva a acreditar que as vias da p38 (ativada pela presença da exendina-4) e da STAT3 (ativada pela presença do resveratrol) participam positivamente na diferenciação em CPIs enquanto que a via da PI3K participa negativamente.

Este foi o primeiro trabalho a relacionar a via da PI3K, STAT3 e p38 na diferenciação das MSCs em CPIs. Estudos futuros devem considerar a influência das vias de sinalização envolvidas na diferenciação da MSCs em CPIs, além de considerar os diferentes estímulos químicos e físicos, origem celular, métodos de cultura e indutores. A diferença entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* das vias de sinalização da PI3K e da p38

sobre a diferenciação de MSCs também devem ser levadas em consideração. Dessa maneira, o objetivo é que esses resultados ajudem a compreender melhor os mecanismos subjacentes que controlam o processo de diferenciação, na busca da regeneração de tecidos e por terapias baseadas em células-estromais mesenquimais.

Avaliação da recuperação metabólica de animais diabéticos após implante subcapsular renal de CPIs

Nas últimas décadas, o diabetes mellitus (DM) tornou-se um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo (Shaw et al., 2010) e contribuiu significativamente para o aumento de casos de cardiopatia isquêmica e acidente vascular cerebral que, coletivamente, representam altas taxas de morbidade e mortalidade entre os pacientes adultos (Lozano et al., 2012). Assim, a identificação de células-estromais mesenquimais, que possuem o potencial de se diferenciar em CPIs, se apresentava como uma boa alternativa como terapia celular. Embora o transplante de CPIs seja considerado um tratamento mais promissor para o DM1, ainda existem conflitos em relação aos protocolos, à sua imunogenicidade e tumorigenicidade (Choi et al., 2003; Hess et al., 2003).

Na primeira fase *in vitro* do nosso estudo, podemos observar que se obteve com o protocolo IPC/PII células mais maduras, e com um perfil secretório de insulina satisfatório. A partir destes resultados, se decidiu observar a funcionalidade celular das CPIs em animais diabéticos induzidos com STZ (DM1). Em nosso estudo podemos observar que as CPIs implantadas na região subcapsular renal (SR) foram capazes de secretar insulina funcional, confirmada pela presença de peptídeo C sérico e pela redução da hiperglicemia nos animais com DM1. O espaço SR foi escolhido como opção para o implante das CPIs, por ser um local comumente utilizado no implante de células

experimentais (Gabr et al., 2013; Paz et al., 2011; Xin et al., 2016b), sendo uma abordagem com potencial para uma futura aplicação clínica. Nossos achados indicam que as CPIs derivadas de gordura, obtidas com um protocolo simples e rápido, foram capazes de reduzir (embora parcialmente) a hiperglicemia no DM1. De acordo com a literatura, outros trabalhos também obtiveram efeito similar sobre o controle da glicemia, mesmo utilizando protocolos mais longos de diferenciação e na presença mais indutores (por exemplo, (Kondo et al., 2017)). Este resultado indica que as CPIs geradas a partir do protocolo IPC/II foi capaz de melhorar a hiperglicemia dos animais DM1, e que a região SR se mostrou promissora para terapia celular.

Avaliação da neuroproteção hipocampal de animais diabéticos após implante subcapsular renal ou subcutâneo de CPIs

Numerosos locais foram propostos e testados para a implantação celular, tanto experimentalmente como em alguns casos clinicamente, incluindo o fígado, subcapsula renal, baço, pâncreas, parede gastrointestinal e espaços subcutâneos. Embora alguns locais alternativos possam ser vantajosos em modelos experimentais, sua viabilidade e tradução para ambientes clínicos ainda são limitados (Cantarelli and Piemonti, 2011).

A partir dos nossos resultados satisfatórios com o implante das células CPIs na região SR em animais diabéticos, decidiu-se então comparar também com a implantação no tecido subcutâneo (SC) da região cervical dorsal do rato. Dos locais de transplantes alternativos estudados até hoje, o espaço SC pode ser considerado atraente por várias razões. O local SC oferece potencial para acesso à biópsia, além de ser cirurgicamente fácil para a implantação celular. No entanto, uma de suas limitações é seu baixo fluxo sanguíneo, o que pode comprometer consideravelmente a função do enxerto (Rajab, 2010).

A terapia celular é um campo dinâmico e se bem sucedido pode levar a uma melhora do controle glicêmico no DM1. Embora muitos estudos tenham investigado o local ideal de implantação de CPIs para reverter a hiperglicemia, nenhum deles comparou os locais de implantação com o objetivo de reduzir os efeitos deletérios no SNC causados pelo DM1. Para tanto, modelos animais têm contribuído imensamente para a compreensão das alterações bioquímicas e funcionais, incluindo alterações neuroquímicas particularmente relacionadas com o comprometimento cognitivo e, até mesmo, demência no DM1 (Duarte et al., 2012; Nardin et al., 2016; Wang et al., 2012; Zanotto et al., 2017).

Para avaliar os efeitos com a implantação das CPIs na cognição dos animais com DM1, fizemos uso de um teste comportamental amplamente utilizado para acessar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar num contexto conhecido, o teste de reconhecimento de objetos (RO) (Clark et al., 2000). A maior parte dos estudos realizados para a avaliação da cognição em roedores têm como alvo o hipocampo, por se tratar de uma estrutura-chave para a memória e cuja integridade e função é muito afetada no DM1 (Nardin et al., 2016).

Alterações gliais específicas frequentemente precedem os sinais histopatológicos das demências e estas alterações são mantidas com a progressão da doença (Nagayach et al., 2014; Nardin et al., 2016; Orre et al., 2014). A GFAP é um marcador conhecido da reatividade dos astrócitos, e seu conteúdo traz indícios de como estão os astrócitos em relação a doença. Outra proteína astrocitária estudada neste trabalho é a S100B. Esta proteína é secretada por astrócitos e tem sido proposta como moduladora da

neuroinflamação em doenças neurodegenerativas, incluindo a DA e também o DM1 (Biasibetti et al., 2017; Donato et al., 2009; Wilcock and Griffin, 2013).

Marcadores bioquímicos no SNC mostraram que o modelo DM1 não afetou estruturalmente as sinapses, uma vez que não foi observada diferença no conteúdo de sinaptofisina (proteína na sinapse neuronal). Provavelmente, o déficit cognitivo observado se deve a um déficit na sinalização neuronal, que deve ser mais investigado. Ao mesmo tempo, os implantes de CPIs melhoraram uma aparente hipofunção astrogliar em consequência do DM1, uma vez que encontramos um aumento no conteúdo hipocampal de S100B, especialmente no grupo SC. Por outro lado, apesar do diabetes, por si só, não ter efeito sobre a GFAP, ambos os locais do implante causaram uma redução na GFAP avaliada no hipocampo. O fato de implantes de CPIs terem causado redução da GFAP pode indicar um rearranjo astrocítico para adaptar os sinais das células migradas, o que precisa de uma investigação mais profunda.

A hiperglicemia desregulada ou prolongada pode levar à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), produzidos a partir de processos não-enzimáticos de glicação e glicoxidação, criando um ambiente pró-oxidante (Vlassara and Uribarri, 2014). A glicotoxicidade é uma das causas de quase todas as complicações do DM1 não tratado, tanto periférica quanto centralmente (Wu and Yan, 2015). Nossos resultados mostraram que, como esperado, os ratos diabéticos apresentaram aumento nos níveis séricos de AGEs e, curiosamente, após a implantação das CPIs em ambos os sítios, os AGEs séricos retornaram aos níveis do controle. Esse efeito pode ser resultado provavelmente devido à presença de ADSCs remanescentes na diferenciação das CPIs, que podem ter o comportamento de depuração autofágica (Hu et al., 2019). As ADSCs são capazes de remover proteínas anormais ou aminoácidos glicosados, promovendo o reparo celular *in*

vivo (Park et al., 2014). Embora os mecanismos das ADSCs nessa atividade de autofagia e capacidade de eliminação de AGEs no DM1 ainda não sejam claros, a capacidade de autofagia foi observada na remoção de AGEs em feridas diabéticas (Han et al., 2017), removendo o β -amilóide intracelular no SNC (Shin et al., 2014), remoção de células epiteliais pulmonares anormais (Jung et al., 2013; Zhou and You, 2016) e alívio de danos às células beta (Zhao et al., 2015).

Considerando o fato de que os resultados benéficos no SNC não vieram da melhora da hiperglicemia, hipotetizamos um efeito putativo das ADSCs presentes nos enxertos celulares. Os benefícios do uso das ADSCs no tratamento de distúrbios cognitivos foram bem documentados. Tratamentos com MSCs em modelos animais da doença de Alzheimer (Cui et al., 2017; Zheng et al., 2017), bem como o efeito de exossomos derivados de MCSs (T.-S. Chen et al., 2019; Cui et al., 2018), também em déficits cognitivos em consequência do DM (Nakano et al., 2016).

Em nosso estudo, as células implantadas no SC melhoraram com sucesso o comprometimento cognitivo e os parâmetros bioquímicos no hipocampo, como S100B e GFAP. Quando os parâmetros periféricos foram observados, ambos os locais de implantação causaram melhora da hiperglicemia e possivelmente uma depuração autofágica do AGEs séricos. Interessantemente, apesar de não termos observado uma completa reversão da hiperglicemia, como desejado, foi possível ter um efeito benéfico nos danos causados no SNC.

Avaliação da presença de células ADSCs obtidas de ratos transgênicos para proteína fluorescente verde em tecidos remotos, particularmente pâncreas e hipocampo

Como observamos que mesmo quando os locais de implantação apresentavam comportamentos periféricos diferentes, como por exemplo os níveis séricos de peptídeo C, os parâmetros bioquímicos no SNC e principalmente a memória de reconhecimento de objetos (RO) tiveram curiosamente um padrão inverso. O grupo com CPIs implantados na região SC tiveram uma melhora na memória de curto e longo prazo avaliados pelo teste de RO, além de uma melhora nos parâmetros bioquímicos. Acreditamos que em nossa preparação de CPIs ainda hajam ADSCs indiferenciadas, estas capazes de migrar para sítios remotos (Kurtz, 2008; Schmidt et al., 2006). É sabido que nenhum dos diferentes protocolos de diferenciação resulta em 100% de células diferenciadas (por exemplo, (Gabr et al., 2014; Xin et al., 2016b)). Portanto, nossa estratégia de implante (4×10^6 células diferenciadas / rato) pode não possuir as CPIs suficientes para uma reversão completa do DM1, mas contribuíram para uma reversão total do comprometimento cognitivo observado com o implante das CPIs na região SC. Uma vez que foi observada esta melhora da cognição dos animais diabéticos, decidiu-se avaliar a possível presença de células CPIs-GFP⁺ em tecidos remotos, como no hipocampo, pulmão e pâncreas e observar a composição celular do enxerto no local do implante ao longo do tempo, dois e quatorze dias após o implante celular.

Uma habilidade das MSCs particularmente interessante é a sua capacidade de *homing*, permitindo que as células naveguem para sítios com lesão e inflamação. Acredita-se que as MSCs exerçam comportamento migratório semelhante ao dos leucócitos em relação à capacidade de resposta a citocinas e a capacidade de migração transendotelial (Majumdar et al., 2003; Rüster et al., 2006). Esse recurso distinto de migração e *homing* permite a aplicação de estratégias minimamente invasivas para a prática clínica, facilitando uma ampla implementação de novos protocolos de tratamento baseados na terapia celular. Por outro lado, a administração sistêmica de MSCs, por

exemplo intravenosa (IV), pode levar a eventos adversos como embolia pulmonar (Boltze et al., 2015) ou microembolismo cerebral (Cui et al., 2015). Enquanto o comportamento de *homing* tem sido bem descrito em vários cenários, a clareza sobre mecanismos definidos e a regulação da migração de MSCs ainda não está clara (Nitzsche et al., 2017). Ambos os sítios de implantação escolhidos neste estudo tiveram o intuito de eliminar possíveis efeitos deletérios, sendo as regiões de implante SR e SC melhores opções.

Observando órgãos remotos após o implante de células GFP⁺, observamos que a migração celular ocorreu a partir dos dois locais de implantação, mas com diferentes perfis de distribuição. Após dois dias da implantação, as células na região SC foram capazes de migrar não apenas para os pulmões, mas também para outros órgãos, como pâncreas e o cérebro. Acreditamos que no implante de SR as células permaneceram *in situ* devido ao espaço mais restrito da cápsula. As células GFP⁺ também foram encontradas no hipocampo após o implante nos dois locais, SC e SR, mas apenas em um pequeno número ao redor dos vasos sanguíneos. Supomos que esse resultado seja coerente, uma vez que dois dias é um período relativamente curto para ocorrer uma migração celular completa (Kalimuthu et al., 2017).

O cenário observado duas semanas depois foi notavelmente diferente. Nos locais de implante de SR e SC, encontramos um grande número de células GFP⁺. Observou-se uma população celular diversa, células tipo adipócitos/GFP⁺ e CPIs que mantiveram sua morfologia comparada a dois dias após o implante. No entanto, houve claramente uma redução do enxerto de CPIs nos dois locais de implantação, o que pode ser explicado por estudos anteriores que mostraram que a hipóxia no enxerto pode induzir a diferenciação celular e que aproximadamente 50% dos CPIs da massa do enxerto pode ser perdida dentro de uma semana após o implante (Faleo et al., 2017). Curiosamente, essa ideia de

migração foi confirmada quando encontramos várias células GFP⁺ no hipocampo dorsal, nas regiões CA1 e DG, o que está de acordo com a melhora na cognição e dos parâmetros astrocitários no SNC após o implante na região SC. Após o implante da região SR, foram encontradas apenas algumas células GFP⁺ ao redor dos vasos sanguíneos e em quantidade reduzida quando comparadas ao implante SC.

De fato, os resultados aqui apresentados, examinando o destino das CPIs/GPF⁺, revelaram que as células foram capazes de trafegar para o SNC, encontradas principalmente na região do hipocampo. No entanto, no nosso estudo não exploramos a expressão de moléculas e receptores de *homing* envolvidos na quimiotaxia e na migração celular das CPIs, e dessa maneira não podemos explicar como de fato ocorreu essa migração.

Podemos, sim, inferir que a melhora cognitiva observada pelo teste RO possivelmente está relacionada com as CPIs/GFP⁺ encontradas no SNC. Outro fato que corrobora, é de que mesmo com a melhora da hiperglicemia dos animais, o diabetes não foi revertido, o que nos leva a crer que o efeito benéfico se deve às ADSCs e não a um efeito periférico relacionado à secreção de insulina. Portanto, investigações sobre os efeitos regulatórios e das citocinas relacionadas à migração das ADSCs/CPIs são necessárias para o entendimento completo do efeito benéfico observado no SNC.

Diferenciação de ADSCs para adipócitos com a finalidade de estudar da expressão e secreção de S100B

O tecido adiposo é um dos maiores compartimentos corporais com vários papéis fisiológicos, incluindo manuseio de lipídios e secreção hormonal. É responsável pelo armazenamento de gordura como triglicérides (via lipogênese) durante períodos de excesso de energia, e pela mobilização de triglicérido (via lipólise) durante períodos de

déficit calórico (Ahmadian et al., 2010). A lipólise é um processo altamente regulado e é disciplinado pelo sistema nervoso, hormônios (por exemplo, insulina e catecolaminas) e fatores parácrinos/autócrinos (por exemplo, adenosina, prostaglandinas, óxido nítrico e TNF- α) (Viswanadha and Londos, 2008). A cultura de células estromais mesenquimais em um meio de diferenciação de adipócitos, dá origem ao acúmulo de gotículas de lipídeos em pré-adipócitos (Ghorbani et al., 2014). O uso de células adipo-diferenciadas a partir de MSCs, em geral, apresenta vantagens e limitações semelhantes em comparação com estudos sobre linhagens celulares de pré-adipócitos. Como a fração de MSCs contém vários tipos celulares, esse modelo pode imitar condições *in vivo* de complexidade do tecido adiposo mais próximas do que o método de cultura de linhagem celular de pré-adipócitos (Poulos et al., 2010).

A S100B é uma proteína de ligação ao cálcio encontrada em altos níveis no SNC, majoritariamente em astrócitos (Boyes et al., 1986) e periféricamente no tecido adiposo (Haimoto et al., 1987; Michetti et al., 1983). No SNC, a S100B está localizada em grande parte nas células da glia e pode atuar como fator neurotrófico ou como uma citocina inflamatória por meio de sua atividade no receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) (Donato et al., 2009; Huttunen et al., 2000). Os níveis cerebrais de S100B aumentam durante doenças neurológicas e traumas em humanos e em modelos animais (Kleindienst et al., 2013; Rothermundt et al., 2003). Evidências adicionais sobre o papel da S100B como citocina derivada do tecido adiposo, ou como adipocina, vêm de dados que demonstram que os níveis circulantes de S100B estão positivamente correlacionados com o índice de massa corporal em indivíduos humanos (Gross et al., 2010; O'Connell et al., 2013; Steiner et al., 2010). Mas o entendimento sobre a distribuição e regulação fisiológica da S100B no tecido adiposo ainda é desconhecida. O atual conhecimento sobre a S100B não exclui o uso dessa proteína no soro como

marcador de lesão cerebral ou atividade astrogliar, mas recomenda-se cautela ao discutir o significado de alterações nos níveis séricos, onde a S100B poderia funcionar como um adipocina, uma citocina neurotrófica ou uma alarmina.

Para um melhor entendimento da importância da S100B sérica ainda há a necessidade de um método *in vitro* que reproduza o comportamento do tecido adiposo, e assim se possa avaliar a sua resposta a diferentes estímulos a longo prazo. Nosso estudo teve como objetivo avaliar a expressão da proteína S100B e a funcionalidade das células adipo-diferenciadas frente a diferentes estímulos. Até este momento podemos especular possíveis mecanismos de regulação no tecido adiposo. Como descrito no capítulo 3, nossos resultados preliminares podem ser resumidos abaixo, organizados em forma de tabela para uma melhor compreensão.

	S100B	Captação Glicose	Relação/ Metabolismo	Discussão	Ref.
↓ [Glicose]	↓	na	?	Ambiente <i>in vitro</i> , comportamento para economizar energia.	(Steiner et al., 2014)
Lactato	↑	~	Lipólise	↑ Exercício ↑ Lactato ↑ S100B	(Dietrich et al., 2003; Stocchero et al., 2014)
Forskolina	↑	na	Lipólise	↑ AMPc	(Pinto et al., 2000)
Adrenalina	↑	↑	Lipólise	↑ AMPc A S100B liberada aumenta a captação de glicose.	(Berlin et al., 1990; Suzuki et al., 1983)
Insulina	↓	↑	Lipogênese	↓ AMPc	(Suzuki and Kato, 1985)
Leptina	~	na	?	Correlação positiva: IMC/S100B/Leptina	(Steiner et al., 2010)
S100B	na	↑	Lipogênese	No SNC, a S100B estimulada por insulina atua como feedback negativo, no tecido adiposo, tanto a S100B quanto a insulina agem estimulando a captação de glicose.	(Wartchow et al., 2016)

na: não avaliado.

A S100B foi encontrada expressa em adipócitos (Michetti et al., 1983a) e secretada por adipócitos tratados com noradrenalina e adrenocorticotropina (ACTH) (Suzuki et al., 1984). A insulina reduziu a secreção de S100B induzida por isoproterenol e ACTH a partir de adipócitos isolados, e a liberação de S100B diminuiu 50% na camada de gordura obtida de ratos tratados com insulina (Suzuki and Kato, 1985), o que corrobora com os nossos achados. O conteúdo de S100B no tecido adiposo de ratos diabéticos ou em jejum a longo prazo foi significativamente menor do que o de ratos controle (Suzuki and Kato, 1985), sugerindo que a insulina pode promover o acúmulo de S100B nos adipócitos. No entanto, o soro de ratos em jejum continha duas vezes mais S100B do que os ratos de controle (Netto et al., 2006), provavelmente resultantes da secreção sob a ação dos hormônios lipolíticos. No entanto, o jejum de longo prazo em meninas com anorexia nervosa demonstrou levar à diminuição dos níveis séricos de S100B (Holtkamp et al., 2008) por um mecanismo que ainda precisa ser elucidado.

Os adipócitos contêm altos níveis de S100B e ensaios *in vitro* indicam uma secreção modulada deste por hormônios que regulam o metabolismo da glicose. Embora o significado biológico da S100B extracelular do tecido adiposo ainda não está claro, é provável que este tecido possa ser uma fonte importante de S100B no soro em situações relacionadas, ou não, a danos cerebrais. Portanto, este estudo abre portas para um melhor entendimento da relação do tecido adiposo com diversas doenças como o DM1 e a DA, e mostra ser uma boa alternativa de estudo *in vitro* da S100B. As razões para todos os efeitos aqui observados exigem experimentos adicionais, pois qualquer interpretação destes dados é, até o presente momento, especulativa.

7 CONCLUSÕES

O DM1 é uma doença complexa devido ao seu caráter autoimune e, portanto, a abordagem terapêutica necessita ser multifacetada. O uso de CPIs mostra ser uma promissora alternativa para se alcançar efeitos duradouros, e assim o uso cada vez menor de insulina exógena. Contudo, ainda existem muitas questões a serem resolvidas e há a necessidade de mais investigação.

Com o nosso estudo podemos observar que é possível gerar células CPIs funcionais, tanto *in vitro* como *in vivo* com um protocolo rápido e de fácil execução. Este desafio foi pensado em entender melhor o processo de diferenciação, indutores e vias, e assim gerar implantes mais eficazes para o tratamento do DM1.

Quando se fala sobre implante, outra questão importante e que pode definir o sucesso do tratamento é o sítio de implantação. Nós observamos que o local do SC tem uma vantagem logística significativa, além de ser minimamente invasivo, podendo ser considerado uma poderosa via terapêutica para a terapia celular. Portanto, os nossos dados contribuem para o entendimento da geração de CPIs a partir de tecido adiposo autólogo e a preparação de implantes eficazes dessas células, reforçando o uso de ADSCs na medicina regenerativa para complicações tanto periféricas quanto centrais no DM1.

Por fim, alterações do tecido adiposo particularmente a resistência à insulina, parece estar envolvida em muitas doenças incluindo o DM1. Contudo, a relação do conteúdo e da secreção de S100B no tecido adiposo até agora não foi investigada. Logo, o nosso estudo contribui para um entendimento futuro das alterações séricas de S100B, e a sua possível relação com o DM1.

8 PERSPECTIVAS

Terapia celular com a implantação de CPIs e ADSCs

Complementar o estudo de migração celular com as CPI/GFP⁺ e com ADSCs/GFP⁺ na melhora cognitiva dos animais DM1. Avaliar assim a possível diferenciação celular local e a secreção de fatores tróficos, principalmente na região no hipocampo.

Estudo *in vitro* da secreção de S100B com cultura adipo-diferenciada

Investigação do proposto eixo S100B/RAGE na inflamação induzida pela obesidade, e a influência do receptor TLR-2 na obesidade e sua relação as infecções virais.

9 REFERÊNCIAS

- Adler-Wailes, D.C., Guiney, E.L., Wolins, N.E., Yanovski, J.A., 2010. Long-term ritonavir exposure increases fatty acid and glycerol recycling in 3T3-L1 adipocytes as compensatory mechanisms for increased triacylglycerol hydrolysis. *Endocrinology* 151, 2097–2105. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1364>
- Aghazadeh, Y., Nostro, M.C., 2017. Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Current and Future Strategies. *Curr. Diab. Rep.* 17, 37. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0863-6>
- Ahmadian, M., Wang, Y., Sul, H.S., 2010. Lipolysis in adipocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 555–559. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.009>
- Aye, M.M., Atkin, S.L., 2014. Patient safety and minimizing risk with insulin administration - role of insulin degludec. *Drug Healthc. Patient Saf.* 6, 55–67. <https://doi.org/10.2147/DHPS.S59566>
- Balda, C.A., Pacheco-Silva, A., 1999. [Immunologic aspects of type 1 diabetes mellitus]. *Rev. Assoc. Médica Bras.* 1992 45, 175–180.
- Baquer, N.Z., Taha, A., Kumar, P., McLean, P., Cowsik, S.M., Kale, R.K., Singh, R., Sharma, D., 2009. A metabolic and functional overview of brain aging linked to neurological disorders. *Biogerontology* 10, 377–413. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9226-2>
- Bauduceau, B., Doucet, J., Bordier, L., Garcia, C., Dupuy, O., Mayaudon, H., 2010. Hypoglycaemia and dementia in diabetic patients. *Diabetes Metab.* 36 Suppl 3, S106-111. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(10\)70476-6](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(10)70476-6)
- Baydas, G., Nedzvetskii, V.S., Nerush, P.A., Kirichenko, S.V., Yoldas, T., 2003. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life Sci.* 73, 1907–1916. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00561-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00561-7)
- Beauquis, J., Roig, P., De Nicola, A.F., Saravia, F., 2010. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS One* 5, e13993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013993>
- Berlin, I., Berlan, M., Crespo-Laumonnier, B., Landault, C., Payan, C., Puech, A.J., Turpin, G., 1990. Alterations in beta-adrenergic sensitivity and platelet alpha 2-adrenoceptors in obese women: effect of exercise and caloric restriction. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 78, 81–87. <https://doi.org/10.1042/cs0780081>
- Biarnés, M., Montolio, M., Nacher, V., Raurell, M., Soler, J., Montanya, E., 2002. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 51, 66–72. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.1.66>
- Biasibetti, R., Almeida Dos Santos, J.P., Rodrigues, L., Wartchow, K.M., Suardi, L.Z., Nardin, P., Selistre, N.G., Vázquez, D., Gonçalves, C.-A., 2017. Hippocampal changes in STZ-model of Alzheimer's disease are dependent on sex. *Behav. Brain Res.* 316, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.057>
- Blüher, M., 2009. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 117, 241–250. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1192044>
- Blüher, M., Mantzoros, C.S., 2015. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism.* 64, 131–145. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.016>
- Bobis, S., Jarocha, D., Majka, M., 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.* 44, 215–230.

- Boltze, J., Arnold, A., Walczak, P., Jolkkonen, J., Cui, L., Wagner, D.-C., 2015. The Dark Side of the Force - Constraints and Complications of Cell Therapies for Stroke. *Front. Neurol.* 6, 155. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00155>
- Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B., Ripoll, C., 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods San Diego Calif* 45, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.03.006>
- Calabrese, V., Cornelius, C., Leso, V., Trovato-Salinaro, A., Ventimiglia, B., Cavallaro, M., Scuto, M., Rizza, S., Zanolli, L., Neri, S., Castellino, P., 2012. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 729–736. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.003>
- Caldarelli, I., Speranza, M.C., Bencivenga, D., Tramontano, A., Borgia, A., Pirozzi, A.V.A., Perrotta, S., Oliva, A., Della Ragione, F., Borriello, A., 2015. Resveratrol mimics insulin activity in the adipogenic commitment of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 60, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.12.011>
- Cantarelli, E., Piemonti, L., 2011. Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts. *Curr. Diab. Rep.* 11, 364–374. <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0216-9>
- Caplan, A.I., 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J. Pathol.* 217, 318–324. <https://doi.org/10.1002/path.2469>
- Chandra, V., Swetha, G., Muthyala, S., Jaiswal, A.K., Bellare, J.R., Nair, P.D., Bhonde, R.R., 2011. Islet-like cell aggregates generated from human adipose tissue derived stem cells ameliorate experimental diabetes in mice. *PLoS One* 6, e20615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020615>
- Chao, K.C., Chao, K.F., Fu, Y.S., Liu, S.H., 2008. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One* 3, e1451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001451>
- Chapel, A., Bertho, J.M., Bensidhoum, M., Fouillard, L., Young, R.G., Frick, J., Demarquay, C., Cuvelier, F., Mathieu, E., Trompier, F., Dudoignon, N., Germain, C., Mazurier, C., Aigueperse, J., Borneman, J., Gorin, N.C., Gourmelon, P., Thierry, D., 2003. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J. Gene Med.* 5, 1028–1038. <https://doi.org/10.1002/jgm.452>
- Chen, H., Aksoy, I., Gonnot, F., Osteil, P., Aubry, M., Hamela, C., Rognard, C., Hochard, A., Voisin, S., Fontaine, E., Mure, M., Afanassieff, M., Cleroux, E., Guibert, S., Chen, J., Vallot, C., Acloque, H., Genthon, C., Donnadieu, C., De Vos, J., Sanlaville, D., Guérin, J.-F., Weber, M., Stanton, L.W., Rougeulle, C., Pain, B., Bourillot, P.-Y., Savatier, P., 2015. Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency. *Nat. Commun.* 6, 7095. <https://doi.org/10.1038/ncomms8095>
- Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P.Y.G., Wu, Y., 2008. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3, e1886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001886>
- Chen, L.-B., Jiang, X.-B., Yang, L., 2004. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J. Gastroenterol.* WJG 10, 3016–3020.
- Chen, S.-Y., Lin, M.-C., Tsai, J.-S., He, P.-L., Luo, W.-T., Herschman, H., Li, H.-J., 2019. EP4 Antagonist-Elicited Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells Rescue Cognition/Learning Deficiencies by Restoring Brain Cellular Functions. *Stem Cells Transl. Med.* <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0284>
- Chen, T.-S., Ju, D.-T., Day, C.-H., Yeh, Y.-L., Chen, R.-J., Viswanadha, V.P., Chang, R.-L., Lin, Y.-C., Yao, C.-H., Huang, C.-Y., 2019. Protective effect of autologous transplantation of resveratrol preconditioned adipose-derived stem cells in the treatment of diabetic

- liver dysfunction in rat model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 13, 1629–1640.
<https://doi.org/10.1002/term.2917>
- Chhabra, P., Brayman, K.L., 2013a. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 328–336. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0116>
- Chhabra, P., Brayman, K.L., 2013b. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 328–336. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0116>
- Chilelli, N.C., Burlina, S., Lapolla, A., 2013. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a “glycoxidation-centric” point of view. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 23, 913–919.
<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.04.004>
- Choi, J.B., Uchino, H., Azuma, K., Iwashita, N., Tanaka, Y., Mochizuki, H., Migita, M., Shimada, T., Kawamori, R., Watada, H., 2003. Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1366–1374.
<https://doi.org/10.1007/s00125-003-1182-9>
- Cholerton, B., Baker, L.D., Craft, S., 2011. Insulin resistance and pathological brain ageing. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 28, 1463–1475. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03464.x>
- Clark, R.E., Zola, S.M., Squire, L.R., 2000. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 8853–8860.
- Coleman, E.S., Dennis, J.C., Braden, T.D., Judd, R.L., Posner, P., 2010. Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration. *Brain Res.* 1306, 131–141.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.005>
- Cui, G.-H., Wu, J., Mou, F.-F., Xie, W.-H., Wang, F.-B., Wang, Q.-L., Fang, J., Xu, Y.-W., Dong, Y.-R., Liu, J.-R., Guo, H.-D., 2018. Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 654–668. <https://doi.org/10.1096/fj.201700600R>
- Cui, L., Kerkelä, E., Bakreen, A., Nitzsche, F., Andrzejewska, A., Nowakowski, A., Janowski, M., Walczak, P., Boltze, J., Lukomska, B., Jolkkonen, J., 2015. The cerebral embolism evoked by intra-arterial delivery of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in rats is related to cell dose and infusion velocity. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 11.
<https://doi.org/10.1186/scrt544>
- Cui, Y., Ma, S., Zhang, C., Cao, W., Liu, M., Li, D., Lv, P., Xing, Q., Qu, R., Yao, N., Yang, B., Guan, F., 2017. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer’s disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. *Behav. Brain Res.* 320, 291–301.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.021>
- Cunnane, S., Nugent, S., Roy, M., Courchesne-Loyer, A., Croteau, E., Tremblay, S., Castellano, A., Pifferi, F., Bocti, C., Paquet, N., Begdouri, H., Bentourkia, M. 'hamed, Turcotte, E., Allard, M., Barberger-Gateau, P., Fulop, T., Rapoport, S.I., 2011. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer’s disease. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 27, 3–20.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.07.021>
- da Silva Meirelles, L., Caplan, A.I., Nardi, N.B., 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 2287–2299.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1122>
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B., 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119, 2204–2213.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02932>

- Dai, Z., Li, Y., Quarles, L.D., Song, T., Pan, W., Zhou, H., Xiao, Z., 2007. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 14, 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.04.003>
- D'Amour, K.A., Agulnick, A.D., Eliazer, S., Kelly, O.G., Kroon, E., Baetge, E.E., 2005. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* 23, 1534–1541. <https://doi.org/10.1038/nbt1163>
- Das, S., Das, D.K., 2007. Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 6, 168–173.
- Dietrich, M.O., Tort, A.B., Schaf, D.V., Farina, M., Gonçalves, C.A., Souza, D.O., Portela, L.V., 2003. Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Can. J. Appl. Physiol. Rev. Can. Physiol. Appl.* 28, 710–716.
- Ding, H., Xu, X., Qin, X., Yang, C., Feng, Q., 2016. Resveratrol promotes differentiation of mouse embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Cardiovasc. Ther.* 34, 283–289. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12200>
- Docherty, H.M., Hay, C.W., Ferguson, L.A., Barrow, J., Durward, E., Docherty, K., 2005. Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem. J.* 389, 813–820. <https://doi.org/10.1042/BJ20041891>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donato, R., Sorci, G., Riuizi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., Giambanco, I., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1008–1022. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.009>
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., Melton, D.A., 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41–46. <https://doi.org/10.1038/nature02520>
- Duarte, J.M.N., Agostinho, P.M., Carvalho, R.A., Cunha, R.A., 2012. Caffeine consumption prevents diabetes-induced memory impairment and synaptotoxicity in the hippocampus of NONcZNO10/LTJ mice. *PloS One* 7, e21899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021899>
- Ezquer, F.E., Ezquer, M.E., Parrau, D.B., Carpio, D., Yañez, A.J., Conget, P.A., 2008. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 14, 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.01.006>
- Faleo, G., Russ, H.A., Wisel, S., Parent, A.V., Nguyen, V., Nair, G.G., Freise, J.E., Villanueva, K.E., Szot, G.L., Hebrok, M., Tang, Q., 2017. Mitigating Ischemic Injury of Stem Cell-Derived Insulin-Producing Cells after Transplant. *Stem Cell Rep.* 9, 807–819. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.012>
- Fan, N., Sun, H., Wang, Y., Zhang, L., Xia, Z., Peng, L., Hou, Y., Shen, W., Liu, R., Peng, Y., 2014. Midkine, a Potential Link between Obesity and Insulin Resistance. *PLOS ONE* 9, e88299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088299>
- Feoli, A.M., Leite, M.C., Tramontina, A.C., Tramontina, F., Posser, T., Rodrigues, L., Swarowsky, A., Quincozes-Santos, A., Leal, R.B., Gottfried, C., Perry, M.L., Gonçalves, C.-A., 2008. Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. *Brain Res.* 1187, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.035>
- Fujiya, A., Nagasaki, H., Seino, Y., Okawa, T., Kato, J., Fukami, A., Himeno, T., Uenishi, E., Tsunekawa, S., Kamiya, H., Nakamura, J., Oiso, Y., Hamada, Y., 2014. The role of S100B

- in the interaction between adipocytes and macrophages. *Obes.* Silver Spring Md 22, 371–379. <https://doi.org/10.1002/oby.20532>
- Gabr, M.M., Zakaria, M.M., Refaie, A.F., Ismail, A.M., Abou-El-Mahasen, M.A., Ashamallah, S.A., Khater, S.M., El-Halawani, S.M., Ibrahim, R.Y., Uin, G.S., Kloc, M., Calne, R.Y., Ghoneim, M.A., 2013. Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant.* 22, 133–145. <https://doi.org/10.3727/096368912X647162>
- Gabr, M.M., Zakaria, M.M., Refaie, A.F., Khater, S.M., Ashamallah, S.A., Ismail, A.M., El-Badri, N., Ghoneim, M.A., 2014. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: comparison of three differentiation protocols. *BioMed Res. Int.* 2014, 832736. <https://doi.org/10.1155/2014/832736>
- Gaens, K.H.J., Stehouwer, C.D.A., Schalkwijk, C.G., 2013. Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. *Curr. Opin. Lipidol.* 24, 4–11. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32835aea13>
- Galic, S., Sachithanandan, N., Kay, T.W., Steinberg, G.R., 2014. Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity. *Biochem. J.* 461, 177–188. <https://doi.org/10.1042/BJ20140143>
- Gao, X., Song, L., Shen, K., Wang, H., Qian, M., Niu, W., Qin, X., 2014. Bone marrow mesenchymal stem cells promote the repair of islets from diabetic mice through paracrine actions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 388, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.03.004>
- Garrington, T.P., Johnson, G.L., 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 211–218. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)80028-3](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)80028-3)
- Gehart, H., Kumpf, S., Ittner, A., Ricci, R., 2010. MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO Rep.* 11, 834–840. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.160>
- Ghorbani, A., Abedinzade, M., 2013. Comparison of in vitro and in situ methods for studying lipolysis. *ISRN Endocrinol.* 2013, 205385. <https://doi.org/10.1155/2013/205385>
- Ghorbani, A., Hadjzadeh, M.-A.-R., Rajaei, Z., Zendeabad, S.B., 2014. Effects of fenugreek seeds on adipogenesis and lipolysis in normal and diabetic rats. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* 17, 523–528.
- Gispén, W.H., Biessels, G.J., 2000a. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23, 542–549.
- Gispén, W.H., Biessels, G.J., 2000b. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23, 542–549.
- Gonçalves, C.A., Leite, M.C., Guerra, M.C., 2010a. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010, 790431. <https://doi.org/10.1155/2010/790431>
- Gonçalves, C.A., Leite, M.C., Guerra, M.C., 2010b. Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010, 790431. <https://doi.org/10.1155/2010/790431>
- Gonçalves, C.-A., Leite, M.C., Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin. Biochem.* 41, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003>
- Gonçalves, C.-A., Rodrigues, L., Bobermin, L.D., Zanotto, C., Vizuete, A., Quincozes-Santos, A., Souza, D.O., Leite, M.C., 2018. Glycolysis-Derived Compounds From Astrocytes That Modulate Synaptic Communication. *Front. Neurosci.* 12, 1035. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01035>

- Götz, J., Ittner, L.M., Lim, Y.-A., 2009. Common features between diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 1321–1325. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-9070-1>
- Greig, N.H., Holloway, H.W., De Ore, K.A., Jani, D., Wang, Y., Zhou, J., Garant, M.J., Egan, J.M., 1999. Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42, 45–50. <https://doi.org/10.1007/s001250051111>
- Gross, S., Homan van der Heide, J.J.J., van Son, W.J., Gans, R.O.B., Foell, D., Navis, G., Bakker, S.J.L., 2010. Body mass index and creatinine clearance are associated with steady-state serum concentrations of the cell damage marker S100B in renal transplant recipients. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 16, CR318-324.
- Gruessner, A.C., Gruessner, R.W.G., 2016. Pancreas Transplantation of US and Non-US Cases from 2005 to 2014 as Reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev. Diabet. Stud. RDS* 13, 35–58. <https://doi.org/10.1900/RDS.2016.13.35>
- Han, Yanfu, Sun, T., Tao, R., Han, Yanqing, Liu, J., 2017. Clinical application prospect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on clearance of advanced glycation end products through autophagy on diabetic wound. *Eur. J. Med. Res.* 22, 11. <https://doi.org/10.1186/s40001-017-0253-1>
- Hess, D., Li, L., Martin, M., Sakano, S., Hill, D., Strutt, B., Thyssen, S., Gray, D.A., Bhatia, M., 2003. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat. Biotechnol.* 21, 763–770. <https://doi.org/10.1038/nbt841>
- Hidaka, H., Endo, T., Kawamoto, S., Yamada, E., Umekawa, H., Tanabe, K., Hara, K., 1983. Purification and characterization of adipose tissue S-100b protein. *J. Biol. Chem.* 258, 2705–2709.
- Ho, A.J., Raji, C.A., Becker, J.T., Lopez, O.L., Kuller, L.H., Hua, X., Dinov, I.D., Stein, J.L., Rosano, C., Toga, A.W., Thompson, P.M., 2011. The effects of physical activity, education, and body mass index on the aging brain. *Hum. Brain Mapp.* 32, 1371–1382. <https://doi.org/10.1002/hbm.21113>
- Holtkamp, K., Bühren, K., Ponath, G., von Eiff, C., Herpertz-Dahlmann, B., Hebebrand, J., Rothermundt, M., 2008. Serum levels of S100B are decreased in chronic starvation and normalize with weight gain. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 115, 937–940. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0041-8>
- Hori, Y., Rulifson, I.C., Tsai, B.C., Heit, J.J., Cahoy, J.D., Kim, S.K., 2002. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16105–16110. <https://doi.org/10.1073/pnas.252618999>
- Hu, C., Zhao, L., Wu, D., Li, L., 2019. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 120. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1225-x>
- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., Rauvala, H., 2000. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J. Biol. Chem.* 275, 40096–40105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006993200>
- International Diabetes Federation - Type 1 diabetes [WWW Document], n.d. URL <https://www.idf.org/aboutdiabetes/type-1-diabetes.html> (accessed 9.10.19).
- Jung, J., Choi, J.H., Lee, Y., Park, J.-W., Oh, I.-H., Hwang, S.-G., Kim, K.-S., Kim, G.J., 2013. Human placenta-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration in CCl4 - injured rat liver model via increased autophagic mechanism. *Stem Cells Dayt. Ohio* 31, 1584–1596. <https://doi.org/10.1002/stem.1396>

- Kalimuthu, S., Oh, J.M., Gangadaran, P., Zhu, L., Lee, H.W., Rajendran, R.L., Baek, S.H., Jeon, Y.H., Jeong, S.Y., Lee, S.-W., Lee, J., Ahn, B.-C., 2017. In Vivo Tracking of Chemokine Receptor CXCR4-Engineered Mesenchymal Stem Cell Migration by Optical Molecular Imaging. *Stem Cells Int.* 2017, 8085637. <https://doi.org/10.1155/2017/8085637>
- Kao, C.-L., Tai, L.-K., Chiou, S.-H., Chen, Y.-J., Lee, K.-H., Chou, S.-J., Chang, Y.-L., Chang, C.-M., Chen, S.-J., Ku, H.-H., Li, H.-Y., 2010. Resveratrol promotes osteogenic differentiation and protects against dexamethasone damage in murine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 19, 247–258. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0186>
- Karnieli, O., Izhar-Prato, Y., Bulvik, S., Efrat, S., 2007a. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2837–2844. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0164>
- Karnieli, O., Izhar-Prato, Y., Bulvik, S., Efrat, S., 2007b. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2837–2844. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0164>
- Karunanayake, E.H., Baker, J.R., Christian, R.A., Hearse, D.J., Mellows, G., 1976. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (¹⁴C) - streptozotocin in the rat. *Diabetologia* 12, 123–128. <https://doi.org/10.1007/bf00428976>
- Kellett, G.L., Brot-Laroche, E., Mace, O.J., Leturque, A., 2008. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 35–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155518>
- Kershaw, E.E., Flier, J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0395>
- Kheirouri, S., Ebrahimi, E., Alizadeh, M., 2018. Association of S100B Serum Levels with Metabolic Syndrome and its Components. *Acta Med. Port.* 31, 201–206. <https://doi.org/10.20344/amp.9073>
- Khorsandi, L., Saremy, S., Khodadadi, A., Dehbashi, F., 2016. Effects of Exendine-4 on The Differentiation of Insulin Producing Cells from Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell J.* 17, 720–729.
- Kitada, M., Ogura, Y., Koya, D., 2016. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int. J. Nephrol. Renov. Dis.* 9, 279–290. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S103784>
- Kitamura, T., Ido Kitamura, Y., 2007. Role of FoxO Proteins in Pancreatic beta Cells. *Endocr. J.* 54, 507–515.
- Kleindienst, A., Grünbeck, F., Buslei, R., Emtmann, I., Buchfelder, M., 2013. Intraperitoneal treatment with S100B enhances hippocampal neurogenesis in juvenile mice and after experimental brain injury. *Acta Neurochir. (Wien)* 155, 1351–1360. <https://doi.org/10.1007/s00701-013-1720-2>
- Kleindienst, A., Hesse, F., Bullock, M.R., Buchfelder, M., 2007. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implications. *Prog. Brain Res.* 161, 317–325. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)61022-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)61022-4)
- Klimova, B., Kuca, K., Maresova, P., 2018. Global View on Alzheimer’s Disease and Diabetes Mellitus: Threats, Risks and Treatment Alzheimer’s Disease and Diabetes Mellitus. *Curr. Alzheimer Res.* 15, 1277–1282. <https://doi.org/10.2174/1567205015666180925110222>
- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., Roth, R.A., 1996. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271, 31372–31378.
- Kondo, Y., Toyoda, T., Ito, R., Funato, M., Hosokawa, Y., Matsui, S., Sudo, T., Nakamura, M., Okada, C., Zhuang, X., Watanabe, A., Ohta, A., Inagaki, N., Osafune, K., 2017. Identification of a small molecule that facilitates the differentiation of human

- iPSCs/ESCs and mouse embryonic pancreatic explants into pancreatic endocrine cells. *Diabetologia* 60, 1454–1466. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4302-7>
- Kozma, S.C., Thomas, G., 2002. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 24, 65–71. <https://doi.org/10.1002/bies.10031>
- Kurtz, A., 2008. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *Int. J. Stem Cells* 1, 1–7.
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V. de, Gottfried, C., Gonçalves, C.-A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.11.021>
- Li, J., Zhao, Z., Liu, J., Huang, N., Long, D., Wang, J., Li, X., Liu, Y., 2010. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF-beta1/Smads pathway. *Cell Prolif.* 43, 333–343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2010.00682.x>
- Li, Y., Zhang, R., Qiao, H., Zhang, H., Wang, Y., Yuan, H., Liu, Q., Liu, D., Chen, L., Pei, X., 2007. Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 211, 36–44. <https://doi.org/10.1002/jcp.20897>
- Liu, B., Ghosh, S., Yang, X., Zheng, H., Liu, X., Wang, Z., Jin, G., Zheng, B., Kennedy, B.K., Suh, Y., Kaeberlein, M., Tryggvason, K., Zhou, Z., 2012. Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria. *Cell Metab.* 16, 738–750. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.007>
- Liu, B., Teschemacher, A.G., Kasparov, S., 2017. Astroglia as a cellular target for neuroprotection and treatment of neuro-psychiatric disorders. *Glia* 65, 1205–1226. <https://doi.org/10.1002/glia.23136>
- Liu, H., Zhang, S., Zhao, L., Zhang, Yan, Li, Q., Chai, X., Zhang, Yongchun, 2016. Resveratrol Enhances Cardiomyocyte Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells through Inhibiting Canonical WNT Signal Pathway and Enhancing Serum Response Factor-miR-1 Axis. *Stem Cells Int.* 2016, 2524092. <https://doi.org/10.1155/2016/2524092>
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., Alvarado, M., Anderson, H.R., Anderson, L.M., Andrews, K.G., Atkinson, C., Baddour, L.M., Barker-Collo, S., Bartels, D.H., Bell, M.L., Benjamin, E.J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Bin Abdulhak, A., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S.S., Coffeng, L.E., Colan, S.D., Colquhoun, S., Colson, K.E., Condon, J., Connor, M.D., Cooper, L.T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K.C., Couser, W., Cowie, B.C., Criqui, M.H., Cross, M., Dabhadkar, K.C., Dahodwala, N., De Leo, D., Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D.C., Dharmaratne, S.D., Dorsey, E.R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P.J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A.D., Forouzanfar, M.H., Fowkes, F.G.R., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M.K., Gabriel, S.E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R.F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y.A., Haring, D., Harrison, J.E., Havmoeller, R., Hay, R.J., Hoen, B., Hotez, P.J., Hoy, D., Jacobsen, K.H., James, S.L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J.-P., Knowlton, L.M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick, M., Lipshultz, S.E., Ohno, S.L., Mabweijano, J., MacIntyre, M.F., Mallinger, L., March, L., Marks, G.B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B.M., McAnulty, J.H., McDermott, M.M., McGrath, J., Mensah, G.A., Merriman, T.R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T.R., Mock, C., Mocumbi, A.O., Mokdad, A.A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M.N., Naldi, L., Narayan, K.M.V., Nasseri, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S.B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz,

- D., Pahari, B., Pandian, J.D., Rivero, A.P., Padilla, R.P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C.A., Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J.T., Rein, D.B., Remuzzi, G., Rivara, F.P., Roberts, T., De León, F.R., Rosenfeld, L.C., Rushton, L., Sacco, R.L., Salomon, J.A., Sampson, U., Sanman, E., Schwebel, D.C., Segui-Gomez, M., Shepard, D.S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J.A., Thomas, B., Tleyjeh, I.M., Towbin, J.A., Truelsen, T., Undurraga, E.A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G.R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M.A., Weintraub, R., Wilkinson, J.D., Woolf, A.D., Wulf, S., Yeh, P.-H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z.-J., Lopez, A.D., Murray, C.J.L., AlMazroa, M.A., Memish, Z.A., 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* 380, 2095–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., Wang, Y., 2014. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 21, 216–225. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.158>
- Majumdar, M.K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W.B., Moorman, M.A., McIntosh, K.R., Mosca, J.D., 2003. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 10, 228–241. <https://doi.org/10.1007/bf02256058>
- Mambelli, L.I., Santos, E.J.C., Frazão, P.J.R., Chaparro, M.B., Kerkis, A., Zoppa, A.L.V., Kerkis, I., 2009. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng. Part C Methods* 15, 87–94. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0186>
- Mao, G.-H., Lu, P., Wang, Y.-N., Tian, C.-G., Huang, X.-H., Feng, Z.-G., Zhang, J.-L., Chang, H.-Y., 2017. Role of PI3K p110 β in the differentiation of human embryonic stem cells into islet-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.018>
- Meirelles, L. da S., Nardi, N.B., 2003. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br. J. Haematol.* 123, 702–711.
- Michetti, F., Dell’Anna, E., Tiberio, G., Cocchia, D., 1983a. Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res.* 262, 352–356. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91032-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91032-6)
- Michetti, F., Dell’Anna, E., Tiberio, G., Cocchia, D., 1983b. Immunochemical and immunocytochemical study of S-100 protein in rat adipocytes. *Brain Res.* 262, 352–356.
- Monden, M., Koyama, H., Otsuka, Y., Morioka, T., Mori, K., Shoji, T., Mima, Y., Motoyama, K., Fukumoto, S., Shioi, A., Emoto, M., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Nishizawa, Y., Kurajoh, M., Yamamoto, T., Inaba, M., 2013. Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: involvement of Toll-like receptor 2. *Diabetes* 62, 478–489. <https://doi.org/10.2337/db11-1116>
- Morsi, M., Maher, A., Aboelmagd, O., Johar, D., Bernstein, L., 2018. A shared comparison of diabetes mellitus and neurodegenerative disorders. *J. Cell. Biochem.* 119, 1249–1256. <https://doi.org/10.1002/jcb.26261>
- Nagayach, A., Patro, N., Patro, I., 2014. Astrocytic and microglial response in experimentally induced diabetic rat brain. *Metab. Brain Dis.* 29, 747–761. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9562-z>
- Nakano, M., Nagaishi, K., Konari, N., Saito, Y., Chikenji, T., Mizue, Y., Fujimiya, M., 2016. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. *Sci. Rep.* 6, 24805. <https://doi.org/10.1038/srep24805>

- Nardin, P., Zanotto, C., Hansen, F., Batassini, C., Gasparin, M.S., Sesterheim, P., Gonçalves, C.-A., 2016. Peripheral Levels of AGEs and Astrocyte Alterations in the Hippocampus of STZ-Diabetic Rats. *Neurochem. Res.* 41, 2006–2016. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1912-2>
- Nathan, D.M., Kuenen, J., Borg, R., Zheng, H., Schoenfeld, D., Heine, R.J., A1c-Derived Average Glucose Study Group, 2008. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 31, 1473–1478. <https://doi.org/10.2337/dc08-0545>
- Nejad-Dehbashi, F., Hashemitabar, M., Orazizadeh, M., Bahramzadeh, S., Shahhosseini Pourshoushtary, E., Khorsandi, L., 2014. The effects of exendine-4 on insulin producing cell differentiation from rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell J.* 16, 187–194.
- Netto, C.B.O., Conte, S., Leite, M.C., Pires, C., Martins, T.L., Vidal, P., Benfato, M.S., Giugliani, R., Gonçalves, C.-A., 2006. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch. Med. Res.* 37, 683–686. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.11.005>
- Nitzsche, F., Müller, C., Lukomska, B., Jolkkonen, J., Deten, A., Boltze, J., 2017. Concise Review: MSC Adhesion Cascade-Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells Dayt. Ohio* 35, 1446–1460. <https://doi.org/10.1002/stem.2614>
- O’Connell, K., Thakore, J., Dev, K.K., 2013. Levels of S100B are raised in female patients with schizophrenia. *BMC Psychiatry* 13, 146. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-13-146>
- Oh, S.-H., Muzzonigro, T.M., Bae, S.-H., LaPlante, J.M., Hatch, H.M., Petersen, B.E., 2004. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 84, 607–617. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700074>
- Olson, A.L., Pessin, J.E., 1996. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 235–256. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.001315>
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L.M., Jansen, A.H.P., Kooijman, L., Bossers, K., Hol, E.M., 2014. Isolation of glia from Alzheimer’s mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol. Aging* 35, 2746–2760. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>
- Park, H.J., Shin, J.Y., Kim, H.N., Oh, S.H., Lee, P.H., 2014. Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells through autophagy modulation in a parkinsonian model. *Neurobiol. Aging* 35, 1920–1928. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.028>
- Parpura, V., Heneka, M.T., Montana, V., Oliet, S.H.R., Schousboe, A., Haydon, P.G., Stout, R.F., Spray, D.C., Reichenbach, A., Pannicke, T., Pekny, M., Pekna, M., Zorec, R., Verkhratsky, A., 2012. Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* 121, 4–27. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x>
- Parvizi, M.R., Parviz, M., Tavangar, S.M., Soltani, N., Kadkhodae, M., Seifi, B., Azizi, Y., Keshavarz, M., 2014. Protective effect of magnesium on renal function in STZ-induced diabetic rats. *J. Diabetes Metab. Disord.* 13, 84. <https://doi.org/10.1186/s40200-014-0084-3>
- Paz, A.H., Salton, G.D., Ayala-Lugo, A., Gomes, C., Terraciano, P., Scalco, R., Laurino, C.C.F.C., Passos, E.P., Schneider, M.R., Meurer, L., Cirne-Lima, E., 2011. Betacellulin overexpression in mesenchymal stem cells induces insulin secretion in vitro and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Stem Cells Dev.* 20, 223–232. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0490>
- Pekny, M., Pekna, M., 2014. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol. Rev.* 94, 1077–1098. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013>

- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Phinney, D.G., Prockop, D.J., 2007. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2896–2902. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0637>
- Pinto, S.S., Gottfried, C., Mendez, A., Gonçalves, D., Karl, J., Gonçalves, C.A., Wofchuk, S., Rodnight, R., 2000. Immunocontent and secretion of S100B in astrocyte cultures from different brain regions in relation to morphology. *FEBS Lett.* 486, 203–207. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02301-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02301-2)
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
- Poulos, S.P., Dodson, M.V., Hausman, G.J., 2010. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 235, 1185–1193. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010063>
- Rajab, A., 2010. Islet transplantation: alternative sites. *Curr. Diab. Rep.* 10, 332–337. <https://doi.org/10.1007/s11892-010-0130-6>
- Rathmann, W., Giani, G., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 2568–2569; author reply 2569.
- Riuzzi, F., Chiappalupi, S., Arcuri, C., Giambanco, I., Sorci, G., Donato, R., 2019. S100 proteins in obesity: liaisons dangereuses. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03257-4>
- Roche, E., Sepulcre, M.P., Enseñat-Waser, R., Maestre, I., Reig, J.A., Soria, B., 2003. Bio-engineering insulin-secreting cells from embryonic stem cells: a review of progress. *Med. Biol. Eng. Comput.* 41, 384–391.
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J.H.M., Arolt, V., 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60, 614–632. <https://doi.org/10.1002/jemt.10303>
- Roussel, M., Mathieu, J., Dalle, S., 2016. Molecular mechanisms redirecting the GLP-1 receptor signalling profile in pancreatic β -cells during type 2 diabetes. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 26, 87–95. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0071>
- Rüster, B., Göttig, S., Ludwig, R.J., Bistrrian, R., Müller, S., Seifried, E., Gille, J., Henschler, R., 2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 108, 3938–3944. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-025098>
- Sackstein, R., 2005. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Curr. Opin. Hematol.* 12, 444–450.
- Schmidt, A., Ladage, D., Steingen, C., Brixius, K., Schinköthe, T., Klinz, F.-J., Schwinger, R.H.G., Mehlhorn, U., Bloch, W., 2006. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.05.015>
- Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Rajotte, R.V., 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343, 230–238. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007273430401>
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87, 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>

- Shin, J.Y., Park, H.J., Kim, H.N., Oh, S.H., Bae, J.-S., Ha, H.-J., Lee, P.H., 2014. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy* 10, 32–44. <https://doi.org/10.4161/auto.26508>
- Sorci, G., Riuzzi, F., Giambanco, I., Donato, R., 2013. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.021>
- Sordi, V., Malosio, M.L., Marchesi, F., Mercalli, A., Melzi, R., Giordano, T., Belmonte, N., Ferrari, G., Leone, B.E., Bertuzzi, F., Zerbini, G., Allavena, P., Bonifacio, E., Piemonti, L., 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 106, 419–427. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3507>
- Sosa, M.S., Avivar-Valderas, A., Bragado, P., Wen, H.-C., Aguirre-Ghiso, J.A., 2011. ERK1/2 and p38 α / β signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 5850–5857. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2574>
- Squillaro, T., Peluso, G., Galderisi, U., 2016. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* 25, 829–848. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
- Stanton, L.-A., Underhill, T.M., Beier, F., 2003. MAP kinases in chondrocyte differentiation. *Dev. Biol.* 263, 165–175.
- Steiner, J., Bernstein, H.-G., Schiltz, K., Haase, T., Meyer-Lotz, G., Dobrowolny, H., Müller, U.J., Martins-de-Souza, D., Borucki, K., Schroeter, M.L., Isermann, B., Bogerts, B., Westphal, S., 2014. Decrease of serum S100B during an oral glucose tolerance test correlates inversely with the insulin response. *Psychoneuroendocrinology* 39, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.10.001>
- Steiner, J., Schiltz, K., Walter, M., Wunderlich, M.T., Keilhoff, G., Brisch, R., Bielau, H., Bernstein, H.-G., Bogerts, B., Schroeter, M.L., Westphal, S., 2010. S100B serum levels are closely correlated with body mass index: an important caveat in neuropsychiatric research. *Psychoneuroendocrinology* 35, 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.07.012>
- Stocchero, C.M.A., Osés, J.P., Cunha, G.S., Martins, J.B., Brum, L.M., Zimmer, E.R., Souza, D.O., Portela, L.V., Reischak-Oliveira, A., 2014. Serum S100B level increases after running but not cycling exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab.* 39, 340–344. <https://doi.org/10.1139/apnm-2013-0308>
- Suzuki, F., Kato, K., 1985. Inhibition of adipose S-100 protein release by insulin. *Biochim. Biophys. Acta* 845, 311–316. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(85\)90193-4](https://doi.org/10.1016/0167-4889(85)90193-4)
- Suzuki, F., Kato, K., Nakajima, T., 1984. Hormonal regulation of adipose S-100 protein release. *J. Neurochem.* 43, 1336–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb05391.x>
- Suzuki, F., Kato, K., Nakajima, T., 1983. Enhancement of adipose S-100 protein release by catecholamines. *J. Biochem. (Tokyo)* 94, 1707–1710.
- Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–546.
- Takemitsu, H., Zhao, D., Ishikawa, S., Michishita, M., Arai, T., Yamamoto, I., 2013. Mechanism of insulin production in canine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 189, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.04.009>
- Tang, D.-Q., Cao, L.-Z., Burkhardt, B.R., Xia, C.-Q., Litherland, S.A., Atkinson, M.A., Yang, L.-J., 2004. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 53, 1721–1732.
- Thakkar, U.G., Vanikar, A.V., Trivedi, H.L., 2017. Stem cells: An emerging novel therapeutic for type-1 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 130, 130–132. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.04.014>

- Tjälve, H., Wilander, E., Johansson, E.B., 1976. Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J. Endocrinol.* 69, 455–456. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0690455>
- Uchigata, Y., Yamamoto, H., Kawamura, A., Okamoto, H., 1982. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J. Biol. Chem.* 257, 6084–6088.
- Ullah, M., Liu, D.D., Thakor, A.S., 2019. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience* 15, 421–438. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.004>
- Vaca, P., Berná, G., Araujo, R., Carneiro, E.M., Bedoya, F.J., Soria, B., Martín, F., 2008. Nicotinamide induces differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells. *Exp. Cell Res.* 314, 969–974. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.11.019>
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L., Cellerino, A., 2006. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr. Biol. CB* 16, 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.12.038>
- van Belle, T.L., Coppieters, K.T., von Herrath, M.G., 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 91, 79–118. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2010>
- Viswanadha, S., Londos, C., 2008. Determination of lipolysis in isolated primary adipocytes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 456, 299–306. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-245-8_22
- Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., Nolta, J., Phinney, D.G., Sensebe, L., 2019. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* 21, 1019–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.08.002>
- Vlassara, H., Uribarri, J., 2014. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr. Diab. Rep.* 14, 453. <https://doi.org/10.1007/s11892-013-0453-1>
- Wang, J.-Q., Yin, J., Song, Y.-F., Zhang, L., Ren, Y.-X., Wang, D.-G., Gao, L.-P., Jing, Y.-H., 2014. Brain aging and AD-like pathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Diabetes Res.* 2014, 796840. <https://doi.org/10.1155/2014/796840>
- Wang, W.-T., Lee, P., Yeh, H.-W., Smirnova, I.V., Choi, I.-Y., 2012. Effects of acute and chronic hyperglycemia on the neurochemical profiles in the rat brain with streptozotocin-induced diabetes detected using in vivo ¹H MR spectroscopy at 9.4 T. *J. Neurochem.* 121, 407–417. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07698.x>
- Warnock, G.L., Ellis, D., Rajotte, R.V., Dawidson, I., Baekkeskov, S., Egebjerg, J., 1988. Studies of the isolation and viability of human islets of Langerhans. *Transplantation* 45, 957–963. <https://doi.org/10.1097/00007890-198805000-00024>
- Wartchow, K.M., Rodrigues, L., Suardi, L.Z., Federhen, B.C., Selistre, N.G., Gonçalves, C.-A., Sesterheim, P., 2019. Short-Term Protocols to Obtain Insulin-Producing Cells from Rat Adipose Tissue: Signaling Pathways and In Vivo Effect. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2458. <https://doi.org/10.3390/ijms20102458>
- Wartchow, K.M., Tramontina, A.C., de Souza, D.F., Biasibetti, R., Bobermin, L.D., Gonçalves, C.-A., 2016. Insulin Stimulates S100B Secretion and These Proteins Antagonistically Modulate Brain Glucose Metabolism. *Neurochem. Res.* 41, 1420–1429. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1851-y>
- Watson, G.S., Bernhardt, T., Reger, M.A., Cholerton, B.A., Baker, L.D., Peskind, E.R., Asthana, S., Plymate, S.R., Frölich, L., Craft, S., 2006. Insulin effects on CSF norepinephrine and

- cognition in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27, 38–41.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.11.011>
- Wilcock, D.M., Griffin, W.S.T., 2013. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J. Neuroinflammation* 10, 84. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-84>
- Wu, J., Yan, L.-J., 2015. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 8, 181–188. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S82272>
- Xie, Q.-P., Huang, H., Xu, B., Dong, X., Gao, S.-L., Zhang, B., Wu, Y.-L., 2009. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro. *Differ. Res. Biol. Divers.* 77, 483–491. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2009.01.001>
- Xin, Y., Jiang, X., Wang, Y., Su, X., Sun, M., Zhang, L., Tan, Y., Wintergerst, K.A., Li, Yan, Li, Yulin, 2016a. Insulin-Producing Cells Differentiated from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro Ameliorate Streptozotocin-Induced Diabetic Hyperglycemia. *PLoS One* 11, e0145838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145838>
- Xin, Y., Jiang, X., Wang, Y., Su, X., Sun, M., Zhang, L., Tan, Y., Wintergerst, K.A., Li, Yan, Li, Yulin, 2016b. Insulin-Producing Cells Differentiated from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In Vitro Ameliorate Streptozotocin-Induced Diabetic Hyperglycemia. *PLoS One* 11, e0145838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145838>
- Xu, G., Stoffers, D.A., Habener, J.F., Bonner-Weir, S., 1999. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48, 2270–2276.
- Yang, J.-L., Chen, W.-Y., Chen, Y.-P., Kuo, C.-Y., Chen, S.-D., 2016. Activation of GLP-1 Receptor Enhances Neuronal Base Excision Repair via PI3K-AKT-Induced Expression of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1. *Theranostics* 6, 2015–2027. <https://doi.org/10.7150/thno.15993>
- Yoshimura, K., Suga, H., Eto, H., 2009. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen. Med.* 4, 265–273. <https://doi.org/10.2217/17460751.4.2.265>
- Zanotto, C., Simão, F., Gasparin, M.S., Biasibetti, R., Tortorelli, L.S., Nardin, P., Gonçalves, C.-A., 2017. Exendin-4 Reverses Biochemical and Functional Alterations in the Blood-Brain and Blood-CSF Barriers in Diabetic Rats. *Mol. Neurobiol.* 54, 2154–2166. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9798-1>
- Zhang, J., Zhang, L., Zhang, S., Yu, Q., Xiong, F., Huang, K., Wang, C.-Y., Yang, P., 2017. HMGB1, an innate alarmin, plays a critical role in chronic inflammation of adipose tissue in obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 454, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.012>
- Zhang, S., Wang, D., Estrov, Z., Raj, S., Willerson, J.T., Yeh, E.T.H., 2004. Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation* 110, 3803–3807. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000150796.18473.8E>
- Zhang, W.-J., Tan, Y.-F., Yue, J.T.Y., Vranic, M., Wojtowicz, J.M., 2008. Impairment of hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats. *Acta Neurol. Scand.* 117, 205–210. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00928.x>
- Zhao, K., Hao, H., Liu, J., Tong, C., Cheng, Y., Xie, Z., Zang, L., Mu, Y., Han, W., 2015. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic high glucose-induced β -cell injury through modulation of autophagy. *Cell Death Dis.* 6, e1885. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.230>

- Zheng, X.-Y., Wan, Q.-Q., Zheng, C.-Y., Zhou, H.-L., Dong, X.-Y., Deng, Q.-S., Yao, H., Fu, Q., Gao, M., Yan, Z.-J., Wang, S.-S., You, Y., Lv, J., Wang, X.-Y., Chen, K.-E., Zhang, M.-Y., Xu, R.-X., 2017. Amniotic Mesenchymal Stem Cells Decrease A β Deposition and Improve Memory in APP/PS1 Transgenic Mice. *Neurochem. Res.* 42, 2191–2207.
<https://doi.org/10.1007/s11064-017-2226-8>
- Zhou, Y., Luo, Y., Dai, J., 2013. Axonal and dendritic changes are associated with diabetic encephalopathy in rats: an important risk factor for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 34, 937–947. <https://doi.org/10.3233/JAD-121762>
- Zhou, Z., You, Z., 2016. Mesenchymal Stem Cells Alleviate LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice by MiR-142a-5p-Controlled Pulmonary Endothelial Cell Autophagy. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 38, 258–266.
<https://doi.org/10.1159/000438627>
- Ziegler, D.R., Innocente, C.E., Leal, R.B., Rodnight, R., Gonçalves, C.A., 1998. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem. Res.* 23, 1259–1263.
<https://doi.org/10.1023/a:1020740115790>

10. ANEXO

Figuras em melhor qualidade

Capítulo 1.

Figura 1.

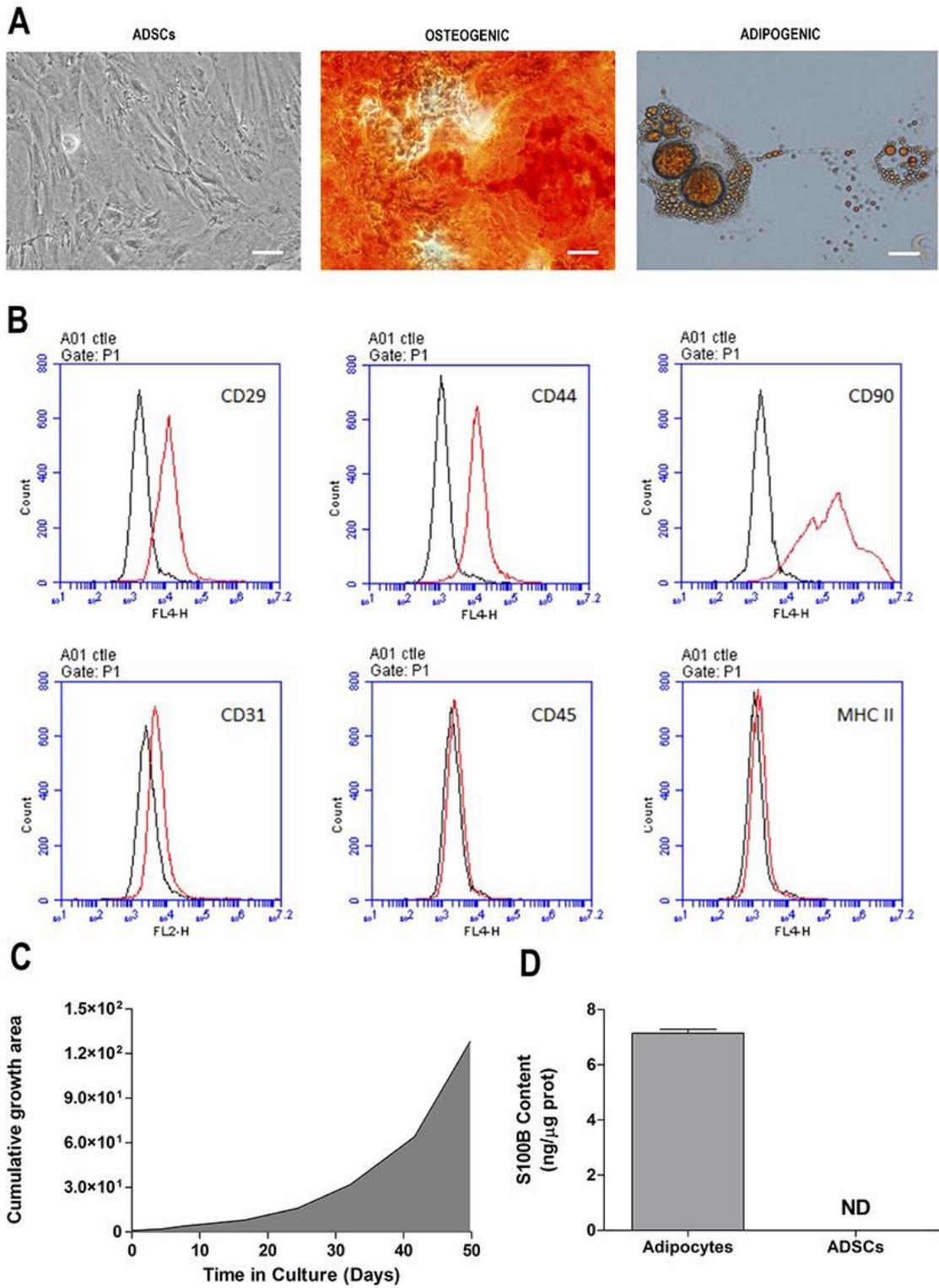


Figura 2.

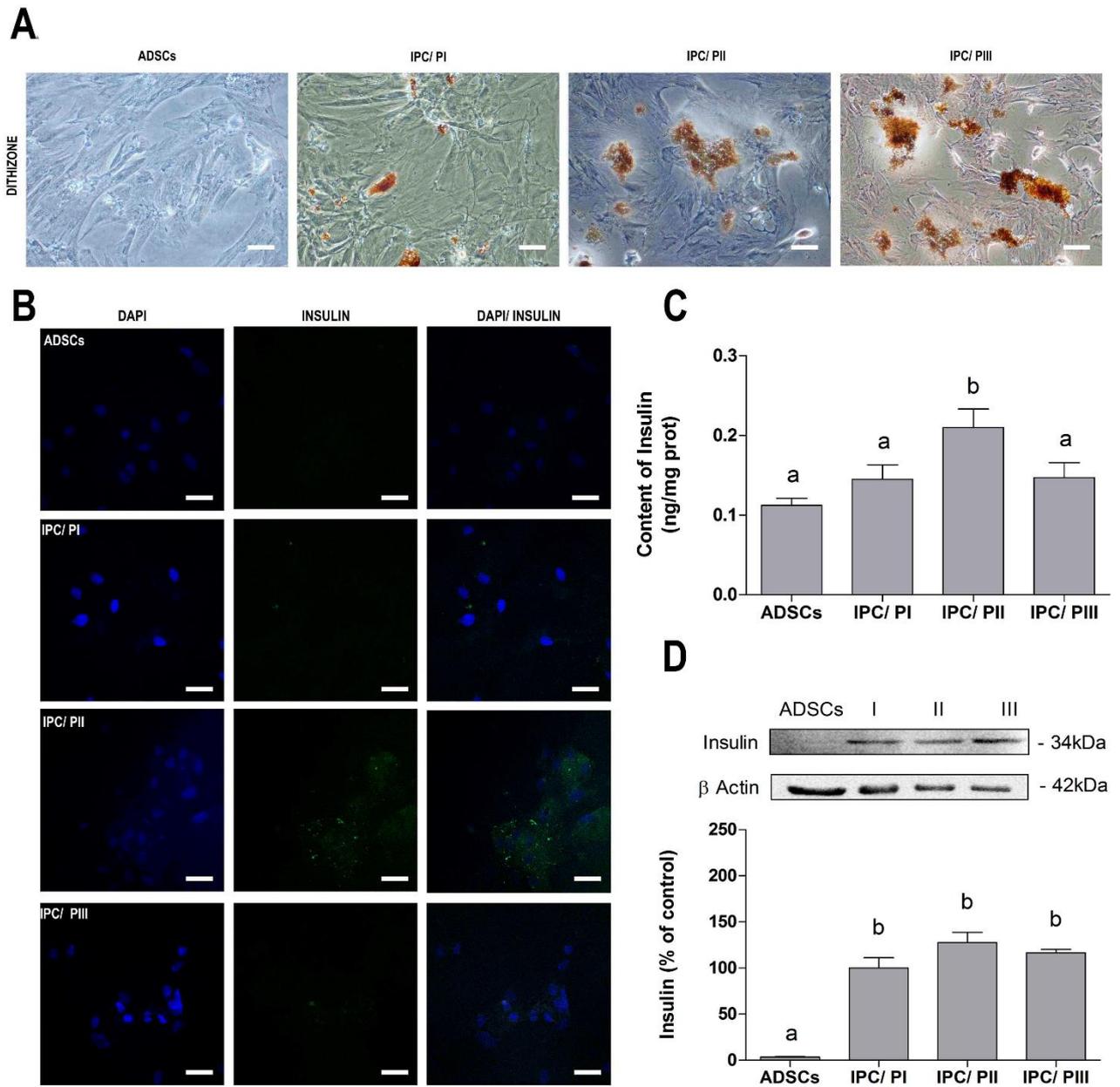
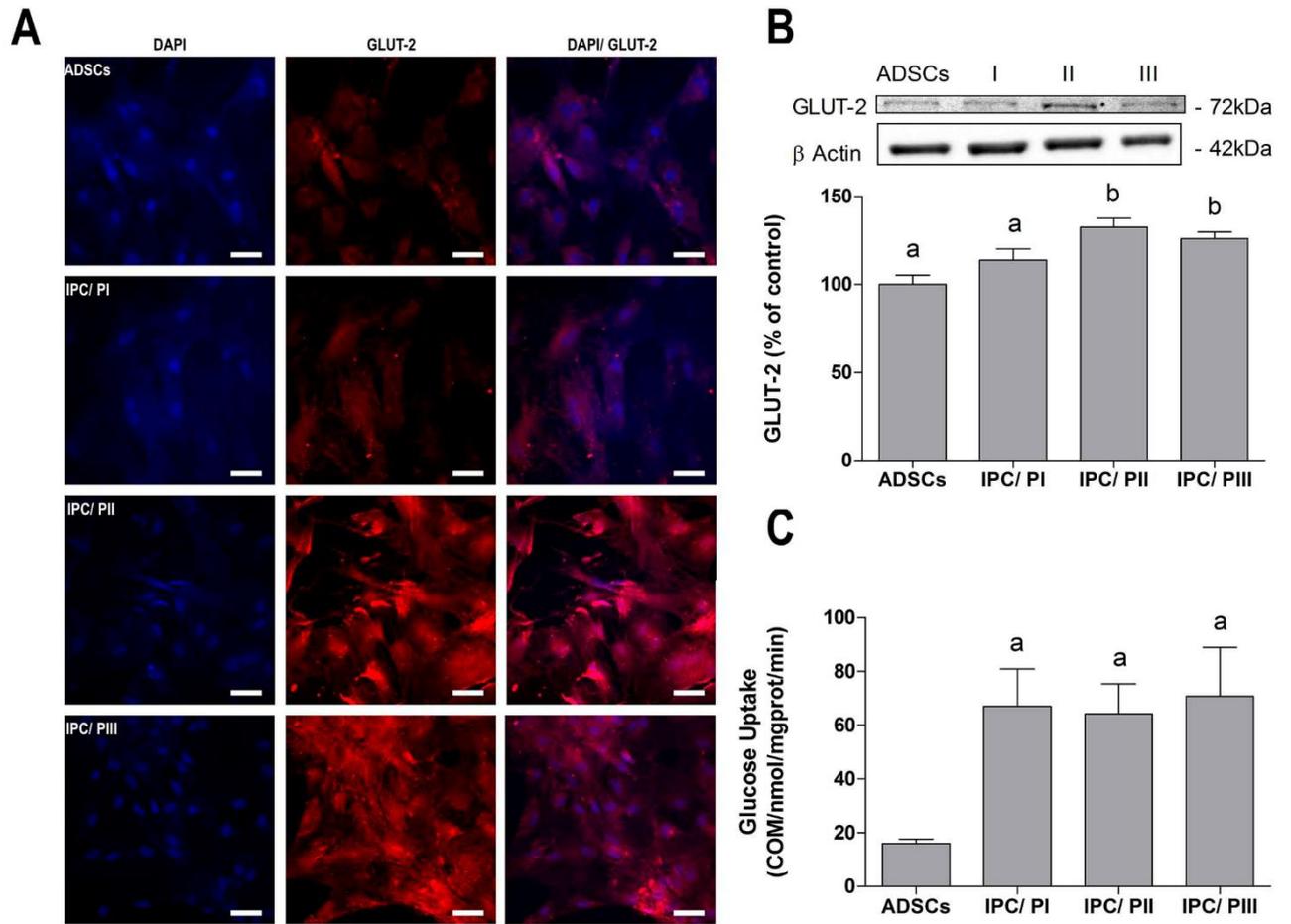


Figura 3.



Capítulo 2.

Figura 5.

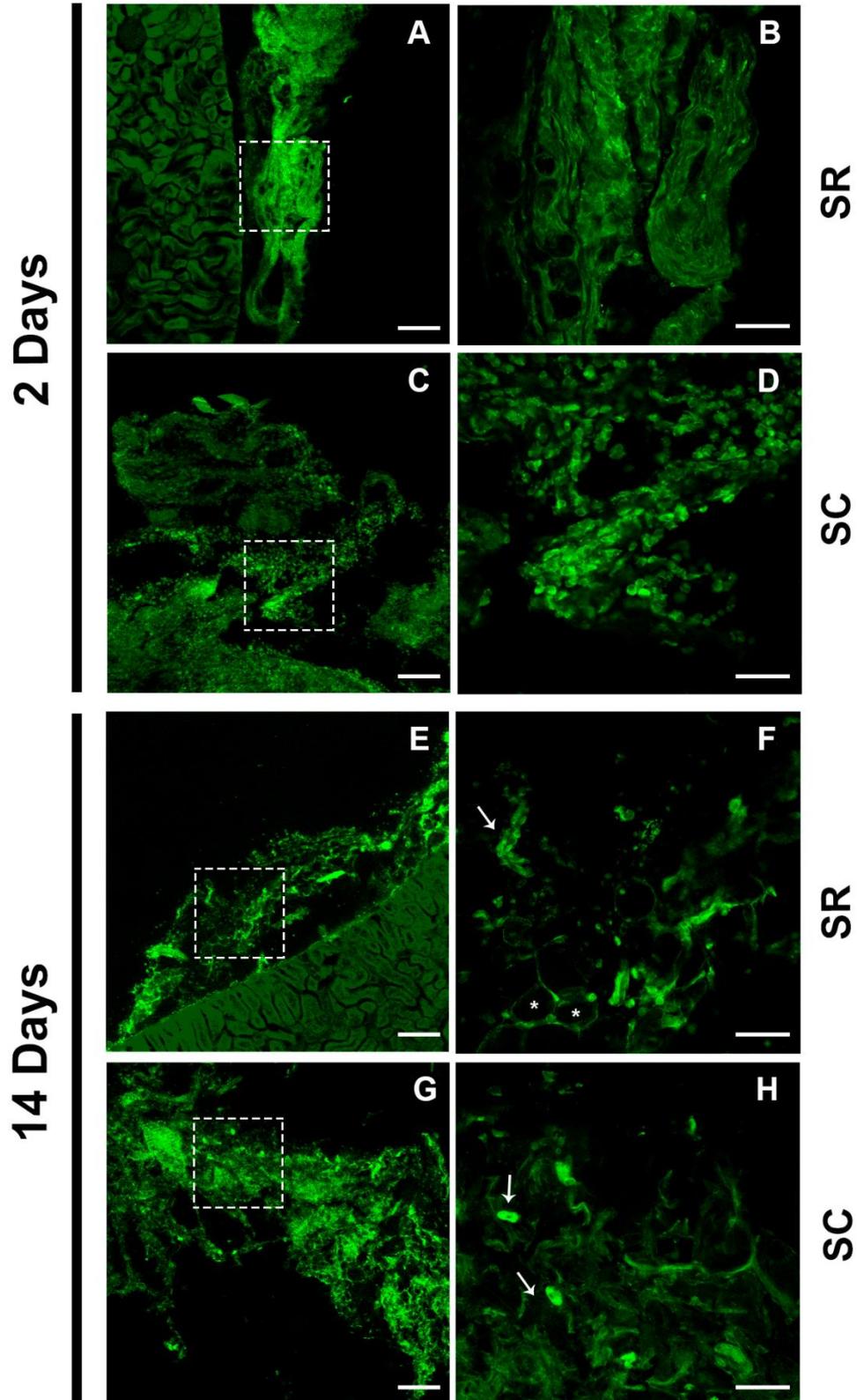


Figura 6.

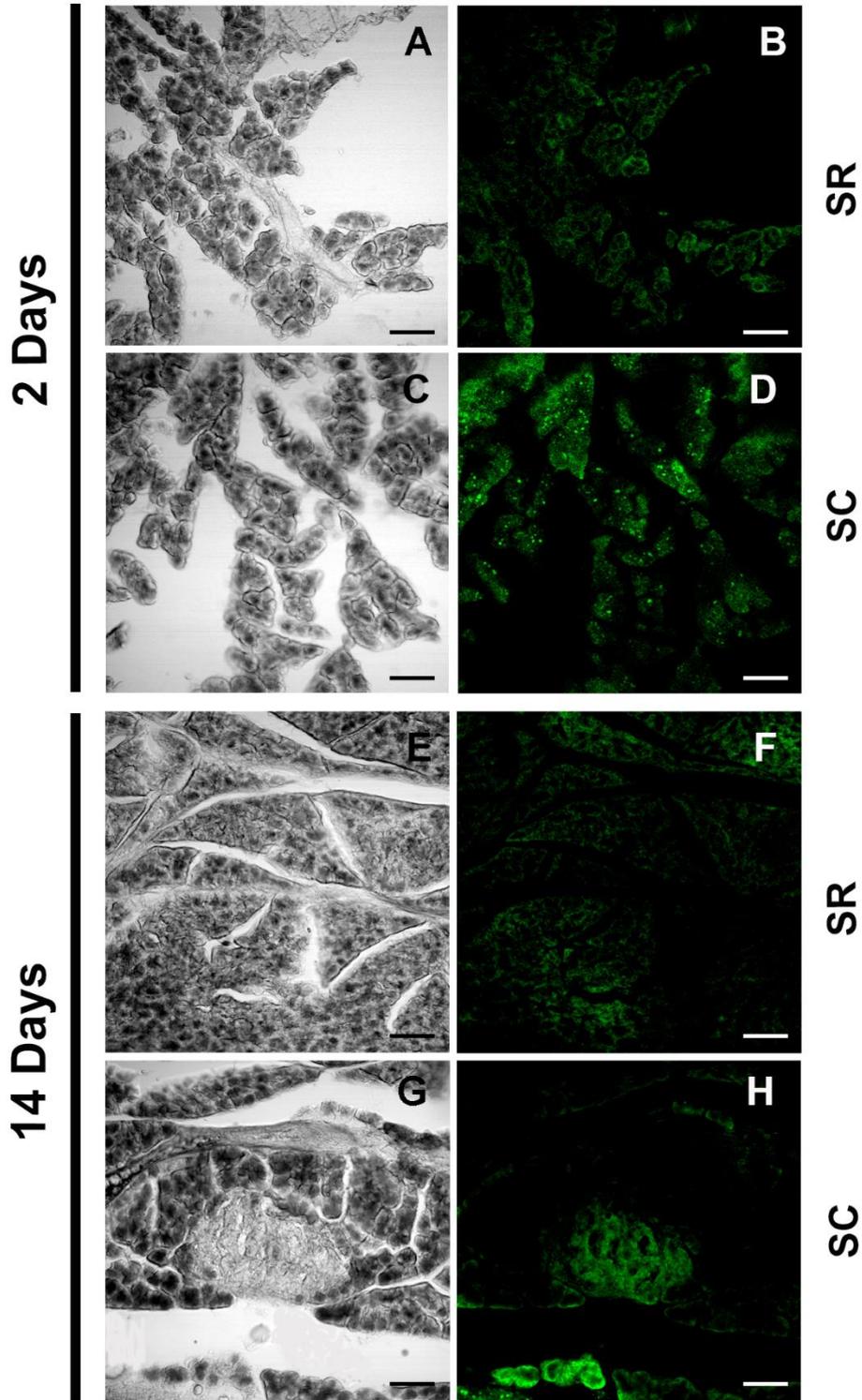


Figura 7.

