

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO**  
**MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO MURINO DE**  
**NEUROPATIA PERIFÉRICA DIABÉTICA**

**AFRÂNIO FERREIRA EVANGELISTA**

**Salvador – Brasil**

**2014**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO**  
**MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO MURINO DE**  
**NEUROPATIA PERIFÉRICA DIABÉTICA**

**AFRÂNIO FERREIRA EVANGELISTA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiane Flora Villarreal

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa para a  
obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Brasil

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

E92a	<p>Evangelista, Afrânio Ferreira</p> <p>Avaliação do efeito do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea em modelo murino de neuropatia periférica diabética / Afrânio Ferreira Evangelista. - 2014.</p> <p>91 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Profª Drª Cristiane Flora Villarreal, <b>Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia</b></p> <p>Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.</p> <p>1. Células-tronco. 2. Dor. 3. Neuropatias Diabéticas. 4. Neuropatias Periféricas. I.Título.</p>
	CDU 57.086.83

"AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO MURINO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA  
DIABÉTICA"

AFRÂNIO FERREIRA EVANGELISTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



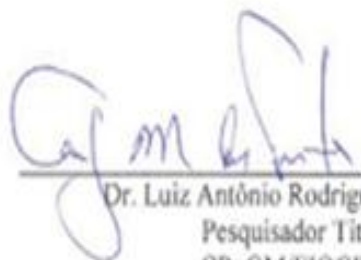
---

Dr. Kyan James Allahdadi  
Pesquisador  
CBTC



---

Dra. Elisalva Teixeira Guimarães  
Professora  
UNEB



---

Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

*“Nada te perturbe,  
Nada te espante.  
Tudo passa,  
A paciência tudo alcança.  
Quem Deus tem nada lhe falta.  
Só Deus basta!”*

***Santa Teresa D’Avila***

*Dedico este trabalho a  
Pedro Henrique Ferreira Lima (in  
memorian).*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre estar presente em minha vida.

À minha família, pelo apoio e força em todos os momentos do desenvolvimento desta importante etapa da minha vida. Agradeço especialmente a meus pais, Aldo Evangelista e Cleia Ferreira Evangelista e meus irmãos Adenilma, Aline e Alex, além dos meus queridos sobrinhos, pessoas inacreditáveis que sempre acreditaram em mim e dedicaram todo amor, admiração, carinho e compreensão durante a minha formação pessoal e profissional.

À professora Dra. Cristiane Flora Villarreal, pela orientação, apoio, compreensão e confiança demonstrada na minha capacidade de desenvolver este trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, pelo apoio acadêmico.

À Dra. Milena Botelho Pereira Soares, pelo apoio e por me aceitar em seu laboratório fornecendo o suporte necessário para a construção desta dissertação.

Ao professor Dr. Marcos André Vannier dos Santos pelo auxílio e colaboração nos estudos de microscopia.

A Dra. Elisalva Guimarães pelo carinho e disposição sempre dedicados em repassar seus conhecimentos e solucionar minhas dúvidas.

À Lucyvera Imbroinise, por sempre me ajudar com carinho e disponibilidade nas minhas dúvidas administrativas.

Aos meus pais soteropolitanos, Sr. Édmo e D. Ruth Ping, por todo amor, atenção e carinho a mim prestados. Vocês foram uma feliz surpresa em minha vida.

Aos amigos do LAFTE, eterno grupo da dor, Anna Lethicia, André Luiz, Dourivaldo Silva Santos, Gisele Graça Leite, Kelly Gama, Renan Fernandes e Marlene Cerqueira. Tenho grande apreço e admiração por todos, vocês são especiais.

Aos amigos do CBTC, especialmente Daniela Nascimento, Dr. Diogo Rodrigo, Lian Paiva e Carine Azevedo pela colaboração e disposição em ajudar sempre que necessário.

À equipe dos biotérios do CBTC e do CPqGM, em especial Sr. Preciano, Silviane e Renato Carvalho.

À espetacular equipe do Serviço de Microscopia Eletrônica do CPqGM, pela atenção e companheirismo dedicados a mim. Muito obrigado por tudo!

À todos do LETI, em especial Cássio Meira, Nanashara Carvalho, Tanira Matutino, Tais Macedo e Tatiana Barbosa, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos que conquistei nesta cidade e vou levar para sempre em minha vida, Anderson Suzart, Clarissa Cunha, Gisele Graça Leite dos Santos, Flávia Evangelista e Wagno Alcântara, sem esquecer de Candace Andrade, Carol da Guarda, Igor Ives, Jaque Gois, Maíra Silva, Marcus Vinicius, Regina Nascimento e Tayane Fernandes (MEIGOS & ABUSADOS, 2013; ORDINÁRIOS et al., 2014). Vocês são a família que escolhi para ter aqui, muito obrigado por tudo!

Por ultimo, porém não menos importante, aos meus amigos inesquecíveis e sempre presentes (raça ruim), Angela Maria, Angela Valéria, Diogo Andrade, Grazielle Ribeiro, Juliana Fontes, Marcela de Jesus, Marília Nogueira, Paloma Félix, Suely Andrade, Tiago Nascimento e Valdereis Fontes.

À CAPES pela bolsa concedida.

Enfim, a todos, mesmo que não citados, meu carinho, admiração e muito obrigado.

EVANGELISTA, Afrânio Ferreira. Avaliação do efeito do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea em modelo murino de neuropatia periférica diabética. 99 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

O diabetes é uma doença de alta prevalência que, frequentemente, induz o comprometimento do sistema nervoso periférico. Na neuropatia diabética periférica, os sintomas mais encontrados são os sensitivos, no qual a dor neuropática, condição crônica caracterizada por alodinia e hiperalgesia, é a mais debilitante. Esta, prejudica a qualidade de vida do paciente, sendo muitas vezes não responsiva aos métodos farmacológicos convencionais de tratamento. Diante desse panorama, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que possuam ação efetiva neste tipo de dor é de grande relevância. O uso da terapia celular no tratamento de lesões do sistema nervoso tem demonstrado resultados promissores e o potencial terapêutico de células-tronco na neuropatia experimental tem sido proposto. Neste estudo, avaliou-se o efeito de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CMsMO) na neuropatia diabética periférica estabelecida em modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina (ETZ). Quatro semanas após a indução do modelo por ETZ (80 mg/kg; ip; 3 dias consecutivos), os animais receberam uma administração endovenosa de CMsMO ( $1 \times 10^6$ ) ou veículo. O tratamento com gabapentina (30 mg/kg; v.o. a cada 12 horas durante seis dias consecutivos) foi usado como padrão ouro. Os limiares nociceptivos térmico e mecânico foram avaliados durante todo o período experimental (90 dias), pelos métodos de hargreaves e von Frey. A avaliação da função motora foi realizada pelo teste de rota-rod. Em diferentes tempos e para todos os grupos experimentais, foram realizadas coletas de segmentos da medula espinal (L4-L5) para dosagem de citocinas por ELISA e segmentos do nervo isquiático foram também coletados para avaliação de alterações morfológicas por microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Os dados comportamentais demonstraram que o tratamento com CMsMO reduziu a mecanoalodinia e a hipoalgesia térmica, levando os limiares nociceptivos de animais neuropáticos a níveis similares aos de animais não neuropáticos. Do mesmo modo, a administração de CMsMO normalizou a função motora dos animais neuropáticos. Dados de microscopia mostraram que animais neuropáticos apresentaram atrofia axonal, redução do número de fibras mielínicas e aparente redução do número de fibras amielínicas no nervo isquiático. Animais neuropáticos tratados com CMsMO tiveram menor ocorrência de atrofia axonal e não apresentaram redução do número de fibras mielínicas ou amielínicas, em relação aos neuropáticos tratados com salina. Além disso, animais neuropáticos tratados com CMsMO apresentaram menores níveis espinais de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e maiores de IL-10 e TGF- $\beta$ , em relação aos animais neuropáticos não tratados. Esse conjunto de resultados indica que CMsMO produzem efeito antinociceptivo duradouro na neuropatia diabética, seguido de modificações no padrão fisiopatológico da doença, o que aponta a terapia celular como uma interessante alternativa para o controle da neuropatia diabética periférica dolorosa.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dor neuropática, Células-tronco mesenquimais, Neuropatia diabética periférica



EVANGELISTA, Afrânio Ferreira. Effect of mesenchymal stem cells derived from bone marrow transplantation in a murine model of peripheral diabetic neuropathy. 99 f. il. Dissertation (Masters) – Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Research Center, Salvador, 2014.

### ABSTRACT

Diabetes is a highly prevalent disease which frequently compromises the peripheral nervous system. In peripheral diabetic neuropathy, the most frequent symptoms are sensitive, in which the neuropathic pain, chronic condition characterized by allodynia and hyperalgesia, is the most debilitating. Neuropathic pain affects the quality of patients' lives, and is often not responsive to pharmacological conventional treatment methods. Against this background, the development of new therapeutic approaches that have an effective action in this type of pain is of great importance. The use of cell therapy in the treatment of lesions in the nervous system has shown promising results and the therapeutic potential of stem cells in experimental neuropathy has been proposed. In this study, we evaluated the effect of mesenchymal stem cells derived from bone marrow (CMsMO) in peripheral diabetic neuropathy established in experimental model of streptozotocin (STZ) induced diabetes in mice. Four weeks after the induction of the model by administration of STZ (80 mg/kg, ip; 3 days) the animals received an CMsMO by intravenous administration ( $1 \times 10^6$ ) or vehicle. The treatment with gabapentin (30 mg/kg, orally every 12 hours for six days) was used as the gold standard. The thermal and mechanical nociceptive thresholds were assessed throughout the entire experimental period (90 days), using Hargreaves and von Frey methods, respectively. Motor function evaluation was conducted using the rotarod test. At different times, were analyzes conducted in spinal cord segments (L4-L5) to determine cytokines profile by ELISA. Sciatic nerve segments were also collected for evaluation of morphological changes by optical and electron transmission microscopy. According to the behavioral data, the CMsMO treatment reduced the mecanoalodinia and the thermal hypoalgesia, leading nociceptive thresholds of neuropathic animals to levels similar to those of non-neuropathic animals. Similarly, CMsMO administration normalized motor function of neuropathic animals. Microscopy data demonstrated that neuropathic animals had axonal atrophy and an apparent decrease of the number of myelinated fibers as well a reduction in the number of unmyelinated fibers in the sciatic nerve, but neuropathic animals treated with CMsMO had a lower incidence of axonal atrophy, showed no decrease in the number of myelinated fibers and no apparent decrease in the amount of unmyelinated fibers in relation to neuropathics treated with saline. Furthermore, neuropathic animals treated with CMsMO presented lower levels of spinal IL-1 $\beta$  and higher levels of TNF- $\alpha$ , and IL-10 and TGF- $\beta$  compared to neuropathic animals that received saline. These data indicate that CMsMO produces a lasting analgesic effect in diabetic neuropathy, followed by changes in the pathophysiological disease pattern, which indicates cell therapy as an interesting alternative for the control of painful peripheral diabetic neuropathy.

**KEYWORDS:** Neuropathic pain, Mesenchymal stem cells, Peripheral diabetic neuropathy.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

<b>AGE</b>	Produtos finais de glicosilação avançada ( <i>Advanced Glycosylation End-product</i> )
<b>ATP</b>	Adenosina-trifosfato
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do encéfalo ( <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
<b>CCL2</b>	( <i>C-C motif</i> ) ligand 2
<b>CD 117</b>	<i>Cluster of designation 117</i>
<b>CD11b</b>	<i>Cluster of designation 11b</i>
<b>CD34</b>	<i>Cluster of designation 34</i>
<b>CD44</b>	<i>Cluster of designation 44</i>
<b>CD45</b>	<i>Cluster of designation 45</i>
<b>CD63</b>	<i>Cluster of designation 63</i>
<b>CD90</b>	<i>Cluster of designation 90</i>
<b>CMsMO</b>	Células mesenquimais de medula óssea
<b>CNTF</b>	Fator neutrofílico ciliar ( <i>Ciliary neurotrophic factor</i> )
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DMEM</b>	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfoxido
<b>DMT1</b>	Diabetes Mellitus tipo 1
<b>DMT2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetra-acético ( <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>EGFP</b>	Proteína verde fluorescente aumentada ( <i>Enhanced green fluorescent protein</i> )
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green fluorescent protein</i> )
<b>GLUT-2</b>	Transportador de glicose 2 ( <i>Glucose transporter 2</i> )
<b>GRD</b>	Gânglio da raiz dorsal
<b>IDF</b>	Federação Internacional do Diabetes ( <i>International diabetes federation</i> )
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 ( <i>Insulin-like growth factor 1</i> )

<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível ( <i>Inducible nitric oxide synthase</i> )
<b>iPS</b>	Célula-tronco pluripotente induzível ( <i>Pluripotent stem cell inducible</i> )
<b>MMP</b>	Metaloproteinase de matriz
<b>NDP</b>	Neuropatia diabética periférica
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator de transcrição nuclear $\kappa$ B ( <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico ( <i>nitric oxide</i> )
<b>PAI-1</b>	Inibidor do ativador de plasminogênio 1 ( <i>Plasminogen activator inhibitor 1</i> )
<b>PBS</b>	Tampão fosfato ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PMSF</b>	Fluoreto fenilmetanossulfonil ( <i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i> )
<b>RAGE</b>	Receptor para produtos finais de glicosilação avançada ( <i>Receptor for Glycosilation End-product</i> )
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SBF</b>	Soro fetal bovino
<b>SCA-1</b>	Antígeno de Células tronco – 1 ( <i>Stem cell antigen 1</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator transformador de crescimento $\beta$ ( <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$ ( <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
<b>TRPV1</b>	<i>Transient receptor potential vanilloid 1</i>
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b>	Potencial terapêutico das CMsMO na restauração neuronal.	13
<b>Figura 2</b>	Delineamento Experimental.	27
<b>Figura 3</b>	Cultura de CMsMO em diferenciação das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, observadas por microscopia óptica de contraste de fase.	30
<b>Figura 4</b>	Variação do peso corporal dos animais durante o período experimental.	31
<b>Figura 5</b>	Variação da glicemia dos animais durante o período experimental.	32
<b>Figura 6</b>	Efeito do transplante de CMsMO sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos com neuropatia diabética periférica.	33
<b>Figura 7</b>	Efeito do transplante com CMsMO sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos com neuropatia diabética.	35
<b>Figura 8</b>	Efeito do transplante de CMsMO sobre a função motora de camundongos com neuropatia diabética.	36
<b>Figura 9</b>	Fotomicrografia em corte transversal do nervo isquiático de camundongos.	38
<b>Figura 10</b>	Eletromicrografias representativa do nervo isquiático de camundongos dos diferentes grupos avaliados.	39
<b>Figura 11</b>	Parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia diabética periférica.	41
<b>Figura 12</b>	Valores médios da razão G do nervo isquiático de animais com neuropatia diabética periférica.	41
<b>Figura 13</b>	Frequência em porcentagem do diâmetro de fibras mielínicas.	42
<b>Figura 14</b>	Efeito de CMsMO sobre a expressão de citocinas no segmento L4-L5 da medula espinal de camundongos em modelo de neuropatia diabética periférica.	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Expressão de marcadores de superfície celular das CMsMO	28
-----------------	---	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	03
2.1	DIABETES <i>MELLITUS</i> (DM)	03
2.1.1	Neuropatia diabética periférica (NDP)	04
2.1.2	Neuropatia diabética periférica dolorosa (NDPD)	06
2.1.3	Modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1	08
2.2.	TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO	09
2.2.1	CMsMO e dor neuropática	12
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
3.1	OBJETIVO GERAL	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	16
4.1	ANIMAIS	16
4.2	MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA	16
4.3	OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E TRANSPLANTE DE CMSMO	17
4.4	CITOMETRIA DE FLUXO	18
4.5	DIFERENCIAÇÃO DE CMSMO	18
4.6	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO – FILAMENTOS DE VON FREY	20
4.7	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO – HARGREAVES	21
4.8	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA – TESTE DE ROTA-ROD	21
4.9	ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO NERVO ISQUIÁTICO	22
4.10	COLETA DE TECIDO, EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	23
4.11	DROGAS, MEIOS, DILUENTES E REAGENTES	24
4.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	25

4.13	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	28
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE CMSMO POR CITOMETRIA DE FLUXO	28
5.2	DIFERENCIAÇÃO DE CMsMO EM LINHAGENS ADIPOGÊNICA, CONDROGÊNICA E OSTEOGÊNICA	28
5.3	PESO DOS ANIMAIS	30
5.4	CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLICOSE	31
5.5	LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO	32
5.6	LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO	34
5.7	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA	35
5.8	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CMSMO SOBRE A MORFOLOGIA DO NERVO ISQUIÁTICO	36
5.9	AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO NERVO ISQUIÁTICO	38
5.10	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO NERVO ISQUIÁTICO	40
5.11	EFEITO DE CMSMO SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA MEDULA ESPINAL	42
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	45
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	52
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	53
<b>9</b>	<b>APÊNDICE</b>	66

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente o diabetes é uma das principais síndromes que acometem o ser humano. Com prevalência mundial estimada em 8,3% e cerca de 12 milhões de brasileiros afetados (Federação Internacional do Diabetes – IDF, 2013), ela provoca uma série de complicações que contribuem para a redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos. Entre essas complicações se destaca a neuropatia diabética periférica (NDP), que acomete cerca de 50% dos pacientes diabéticos (BOULTON et al., 2005; EDWARDS et al., 2008). A NDP compreende um grupo heterogêneo e complexo de alterações que envolvem diferentes partes do sistema nervoso periférico somático e autônomo, podendo ser simétrica ou assimétrica, focal ou multifocal (VINIK et al., 2008; TESFAYE, 2007). Dos sintomas que apontam para o desenvolvimento de neuropatia, os mais encontrados são os sensitivos como as parestesias, diminuição da sensibilidade cutânea e a dor neuropática, que interferem em diferentes aspectos biológicos, psicológicos e sociais desse grupo de pacientes (ZIEGLER, 2009; FEHER et al., 2013).

A dor neuropática pode se manifestar de várias formas, como por exemplo, dor paroxística, dor evocada por estímulos não nocivos (alodinia), aumento da intensidade de dor induzida por estímulos nocivos (hiperalgesia) ou como uma combinação paradoxal de perda sensitiva e hiperalgesia (GALVÃO, 2005). O tratamento farmacológico de primeira escolha para a dor neuropática é baseado no uso de medicamentos de ação central, como os anticonvulsivantes (gabapentina, carbamazepina e lamotrigina) e antidepressivos (amitriptilina e imipramina), os quais possuem uma eficácia moderada na redução da dor em apenas 50% dos pacientes tratados (ZIEGLER, 2010). Em adição, nenhum desses medicamentos possui ação curativa na neuropatia, atuando apenas como um tratamento paliativo. Além do modesto controle analgésico, esses medicamentos provocam efeitos indesejados, tais como cansaço, sonolência, boca seca, tonturas, náuseas e constipação, comprometendo a adesão do paciente ao tratamento ou reduzindo sua qualidade de vida (TESFAYE et al., 2009). Desta forma, torna-se



fundamental a busca por novos procedimentos e/ou medicamentos visando o adequado controle da dor neuropática de origem diabética.

Uma emergente estratégia para a regeneração ou restabelecimento funcional de tecidos lesionados é o uso de células-tronco (PROCKOP, 1997, AKIYAMA et al., 2002; SYKOVÁ et al., 2006). Estas são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e de se diferenciar em diferentes tipos celulares, podendo ser de origem embrionária ou adulta (SANTOS et al., 2011). As células-tronco adultas estão presentes em diversos tecidos, sendo as provenientes da medula óssea as mais estudadas. As células mesenquimais de medula óssea (CMsMO) compreendem células-tronco com grande potencial de diferenciação tendo a função fisiológica de manter o estado de homeostase do organismo, através da reposição de células destruídas por lesões ou doenças (WAGERS; WEISSMAN, 2004). Seu amplo potencial terapêutico tem sido demonstrado em estudos pré-clínicos e clínicos, incluindo nas doenças do sistema nervoso (TOGEL et al., 2005; RIVERA et al., 2006; BALL et al., 2007; GERDONI et al., 2007; PROCKOP; OLSON, 2007; URBAN et al., 2008). Em função de seu proposto potencial regenerador sobre as células nervosas (EGLITIS; MEZEY, 1997; MEZEY, 2000; CHOPP; LI 2002), é possível que as células-tronco tenham efeito terapêutico sobre as neuropatias, que decorrem da lesão ou disfunção do sistema nervoso. De fato, estudos recentes demonstraram que a administração de células-tronco reduz a dor neuropática comportamental em modelo experimental de ligadura do nervo isquiático (KLASS et al., 2007; MUSOLINO et al., 2007; SINISCALCO et al., 2010) e de neuropatia diabética (GUIMARÃES et al., 2013). Entretanto, a melhor caracterização desse efeito, assim como os mecanismos envolvidos nas ações de células-tronco durante a neuropatia diabética, ainda necessitam ser investigados. Desta forma, este estudo objetiva avaliar o potencial terapêutico do transplante de CMsMO, na neuropatia em modelo experimental de diabetes induzida por estreptozotocina, abordando seu potencial modificador da doença em detrimento ao perfil paliativo dos analgésicos clinicamente disponíveis.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DIABETES *MELLITUS* (DM)

Atualmente o diabetes é uma das principais síndromes que acometem o ser humano. Não se trata de uma única doença, mas de um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, a qual é resultante da redução da produção ou perda da capacidade de ação da insulina. Sua classificação atual baseia-se na etiologia e não mais no tipo de tratamento, portanto, como proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e seguido pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), existem quatro tipos de DM. O diabetes *mellitus* do tipo 1 (DMT1) é caracterizado pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas por um processo auto-imune; o tipo 2 (DMT2) decorre de alterações na ação ou secreção da insulina, estando intimamente relacionado com a obesidade; o DM gestacional, diagnosticado durante a gravidez; e outros tipos específicos de DM, causados por outros processos como infecção, defeitos genéticos na função das células  $\beta$ , induzida por medicamentos ou agentes químicos, entre outros (OLIVEIRA; VENCIO, 2014).

De acordo com a OMS, uma pandemia de diabetes *mellitus* está em curso em virtude do aumento do envelhecimento da população, urbanização, má qualidade de vida e sedentarismo (OMS, 1999). Dados recentes da Federação Internacional do Diabetes indicam que 8,3% da população mundial adulta – 382 milhões de pessoas – têm diabetes, destes, 80% reside em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Neste contexto, o Brasil possui quase 12 milhões de diabéticos, perdendo apenas para China, Índia e EUA. De acordo com uma análise prospectiva dessa Federação, se nenhuma ação for tomada, em menos de 25 anos, o número de diabéticos no mundo aumentará para 592 milhões, elevando os custos com tratamento e prevenção de 548 bilhões de dólares em 2013, para 627 bilhões em 2035 (IDF, 2013).

Além de provocar altos custos às reservas financeiras mundiais, o DM provoca uma série de complicações que contribuem para a redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos, tais como retinopatia (LIU, et

al., 2014), problemas renais (AL-RUBEAN et al., 2014) e vasculopatias (MUREA; MA; FREEDMAN, 2012). Dentre essas complicações se destaca a neuropatia diabética periférica (NDP), que acomete cerca de 50% dos pacientes diabéticos (CANDRILLI et al., 2007).

### 2.1.1 Neuropatia diabética periférica (NDP)

A neuropatia diabética compreende um grupo heterogêneo e complexo de alterações que envolvem diferentes partes do sistema nervoso periférico e autônomo e é responsável por elevado quadro de morbidade e mortalidade em ambos pacientes diabéticos tipo 1 ou 2 (VINIK et al., 2008; TESFAYE, 2007). Dentre os vários tipos, a polineuropatia sensório-motora simétrica e distal é a forma mais comum de neuropatia diabética periférica, com uma prevalência que pode variar de 8%, em pacientes com o diagnóstico precoce, até mais de 50%, em indivíduos diabéticos a mais de 25 anos. Esta pode ser caracterizada pela presença de anormalidades sensoriais crônicas como dor neuropática coexistente com perda de sensibilidade (BOULTON et al., 2005; EDWARDS et al., 2008; OBROSOVA, 2009; ZIEGLER, 2009; TESFAYE et al., 2010).

A hiperglicemia persistente é vista como o principal fator de risco para o desenvolvimento da NDP, porém fatores como idade avançada, duração da doença e sedentarismo também contribuem para seu agravamento (EDWARDS et al., 2008). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas à NDP, entre eles, o aumento do fluxo de glicose para a via do poli-ol, o acúmulo de produtos finais de glicosilação avançada, a ativação excessiva ou inapropriada da proteína quinase C e o aumento do estresse oxidativo.

A via do poli-ol envolve a redução da glicose em sorbitol pela aldose redutase e sua re-oxidação em frutose. Nos tecidos insulino-independentes, o excesso de glicose intracelular é metabolizado por esta via e o aumento da concentração de sorbitol e frutose causa um distúrbio osmótico, promovendo influxo de água e comprometendo a homeostase celular. Nos neurônios, o excesso de sorbitol provoca ainda a inibição do mioinositol, importante para a regulação da bomba sódio-potássio ATPase, provocando diminuição da velocidade da condução neural. Além disso, esta via diminui a produção de

prostaciclina e óxido nítrico, potentes vasodilatadores endógenos, contribuindo para a hipóxia tecidual (GREENE et al., 1999; SILVA; COSTA, 2008).

Outro grande contribuinte para as complicações do diabetes no sistema nervoso é a glicação não-enzimática de proteínas, lipídios e carboidratos que resulta na formação dos produtos finais de glicosilação avançada ou AGEs. Entre outros pontos de atuação, os AGEs podem modificar proteínas intracelulares envolvidas na regulação gênica e em moléculas da matriz extracelular, interferindo na sinalização entre a matriz e a célula. A ativação dos receptores de AGEs (RAGEs) nas células, estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (BROWNLE, 2005 e GOLDIN, et al., 2006). Nos neurônios, a ativação destes receptores induz o estresse oxidativo através da NADPH oxidase, promovendo desarranjos bioquímicos que prejudicam o suporte neurotrófico e reduzem o fluxo sanguíneo no nervo (WADA e YAGIHASHI, 2005 e VINCENT et al., 2007).

A hiperglicemia persistente também estimula a formação de diacilglicerol (DAG), um mensageiro lipídico que provoca a ativação da PKC. A ativação dessa proteína quinase desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que promove a superexpressão de fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), fator transformador do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além da diminuição da produção de óxido nítrico (NO) e aumento da atividade da endotelina-1, potente vasoconstritor. Essas alterações resultam em vasoconstrição e comprometimento do fluxo sanguíneo causando hipóxia, sendo também um estímulo para neovascularização (ABDOLLAHI e HOSSEINI, 2013 e CORRÊA-GIANNELLA e VIEIRA, 2008).

Por último, o estresse oxidativo gerado pela formação de radicais livres através do aumento da via glicolítica, também é importante fator desencadeante da neuropatia diabética. Estes radicais podem provocar danos no DNA e ativar proteínas da membrana mitocondrial com a liberação de citocromo C e ativação da caspase 3, promovendo assim, a morte celular programada. Além disso, podem ativar NF- $\kappa$ B nas células de Schwann, células endoteliais e neurônios, fator que está relacionado à transcrição de moléculas

pró-inflamatórias como citocinas e prostaglandinas, provocando a ativação de macrófagos. Estes macrófagos contribuem para a neuropatia diabética através de vários mecanismos, como liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e proteases, que em conjunto, produzem uma lesão celular oxidativa e degeneração da mielina (YAGIHASHI; MIZUKAMI; SUGIMOTO, 2011).

Desta forma, cada um dos mecanismos descritos acima pode contribuir significativamente para a lesão dos nervos periféricos no paciente diabético. Como consequência direta dessa lesão, a função dos neurônios sensoriais é drasticamente alterada, com alteração da velocidade de condução, redução do limiar de ativação, alteração do perfil de expressão gênica e sensibilização sináptica (OBROSOVA, 2009). Tais alterações se expressam clinicamente na neuropatia diabética como distúrbios de sensibilidade e dor neuropática, um quadro denominado neuropatia diabética periférica dolorosa (NDPD) (ZIEGLER, 2009; FEHER et al., 2013).

### 2.1.2 Neuropatia diabética periférica dolorosa (NDPD)

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a NDPD é definida como dor decorrente da lesão ou disfunção do sistema nervoso periférico em pacientes diabéticos (TREEDE et al., 2008). Estima-se que a prevalência de dor neuropática nos pacientes com NDPD possa variar de 3 a 25%, de acordo com o critério de diagnóstico utilizado (BOULTON, 2004). Na prática, esta dor é comumente distal, simétrica e com exacerbação noturna, descrita pelos pacientes como dor espontânea em forma de formigamento, queimação e sensação de choque elétrico; muitas vezes acompanhada de hiperalgesia e alodinia. Esta condição dolorosa pode persistir por anos e é resistente ao tratamento convencional, o qual é baseado no uso de medicamentos que tratam somente os sintomas e não modificam o padrão da doença (TESFAYE et al., 2010). Em função do seu caráter debilitante, a NDPD pode afetar diretamente o humor, o sono e a qualidade de vida do paciente, sendo um dos principais fatores que levam o diabético a procurar o serviço de saúde (ZIEGLER, 2009; TEFAYE et al., 2009, 2010; FEHER et al., 2013).

Diversos mecanismos têm sido associados à dor neuropática em pacientes diabéticos. Estudos recentes demonstraram que as células da glia, importantes na preservação da homeostase do sistema nervoso, possuem papel crucial no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática. Esta é ativada na medula espinal de animais neuropáticos em resposta a liberação pelo neurônio aferente primário de neurotransmissores excitatórios (glutamato e substância P), fatores neurotróficos (como fator neurotrófico derivado do encéfalo - BDNF), adenosina tri-fosfato (ATP), metaloproteinases (MMPs) e quimiocinas (MCMAHON; MALCANGIO, 2009; WEN et al., 2011; MIKA, 2013).

No caso da dor neuropática de origem diabética, diferentemente do que ocorre na dor neuropática por lesão mecânica de nervos periféricos, os astrócitos não participam do processo de indução dolorosa, sendo este papel específico das células microgliais (TSUDA et al., 2008; WODARSKI et al., 2009). Entre as diferentes vias de sinalização possivelmente envolvidas na ativação glial, o NF- $\kappa$ B tem ganhado notoriedade. Animais *knockout* para a subunidade p50 do NF- $\kappa$ B, não desenvolvem alodinia mecânica em modelo de NDPD induzida por estreptozotocina e o tratamento com inibidor de NF- $\kappa$ B previne o aparecimento da dor neuropática experimental (QUAN; DU; WANG, 2007; BERTI-MATTERA et al., 2008). Acredita-se que este fator de transcrição, que controla a expressão de vários genes relacionados ao processo doloroso, atue induzindo a microglia a liberar citocinas pró-inflamatórias envolvidas na manutenção da dor neuropática. De fato, a contribuição das citocinas espinais nos processos de manutenção da dor neuropática tem sido demonstrada (TSUDA et al., 2005; TALBOT et al., 2010). Pabreja, em 2011 verificou que a administração durante duas semanas de minociclina, um inibidor seletivo da ativação microglial, conseguiu atenuar o desenvolvimento da neuropatia diabética e atribuiu este efeito aos níveis reduzidos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  encontrados na medula espinal dos ratos neuropáticos.

Atualmente, o tratamento farmacológico para a dor neuropática de origem diabética está baseado no uso de medicamentos de ação central, como os anticonvulsivantes (gabapentina, carbamazepina e lamotrigina) e antidepressivos tricíclicos (amitriptilina e imipramina), os quais exercem efeito moderado de redução da dor, atuando apenas nos sintomas sem promover

ação curativa. Além disso, sua ação analgésica é eficiente em apenas 50% dos pacientes tratados e seu uso provoca efeitos indesejados, como cansaço, sonolência, boca seca, tonturas, náuseas e constipação, que comprometem a adesão do paciente ao tratamento e reduz sua qualidade de vida (TESFAYE et al., 2009). Diante disto, a busca por novas formas de tratamento e controle da dor neuropática em pacientes diabéticos é de grande relevância. Nesse contexto, os modelos experimentais tem papel fundamental, por viabilizarem o desenvolvimento e estudo pré-clínico de novas abordagens terapêuticas. De fato, os modelos experimentais de DM têm contribuído fundamentalmente para os avanços na compreensão da fisiopatologia dessa doença e investigação de novas terapias.

### 2.1.3 Modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1

O uso de animais em pesquisas científicas possibilitou ao homem adquirir grande parte do conhecimento científico disponível atualmente. Principalmente na área biomédica, o uso de modelos experimentais tem ajudado a identificar e desenvolver tratamentos para diversas doenças que afetam os seres humanos (ANDERSEN et al., 2004).

A adoção de um modelo de neuropatia diabética que mimetize as manifestações evidenciadas na clínica é de grande importância para a validação das descobertas na área. Nesse contexto, a estreptozotocina é a ferramenta mais utilizada para a indução de modelos animais de diabetes *mellitus* do tipo 1. Trata-se de um antibiótico isolado da cepa *Streptomyces achromogenes*, de natureza glicosamina-nitrosureia. Sua porção deoxiglicose se liga aos transportadores de glicose GLUT-2 presentes nas células  $\beta$ -pancreáticas e seu radical nitrosuréia exerce efeito citotóxico sobre essas células (XIANG et al., 2010). Dentre os vários mecanismos propostos para explicar a ação da estreptozotocina sobre as células  $\beta$  do pâncreas, está a hipótese de que essa substância atue como agente alquilante sobre a estrutura do DNA, além de estimular a produção de EROs, com elevação da peroxidase lipídica e consequente diminuição das enzimas antioxidantes. Desta forma, a modificação da estrutura do DNA, em conjunto com sua fragmentação causada por espécies reativas de oxigênio, compromete a biossíntese e secreção de

insulina e interfere no metabolismo energético destas células, resultando em apoptose (ELSNER et al., 2000, KANETO et al., 2005, XIANG et al., 2010, BISHNOI et al., 2011).

Dependendo do protocolo de indução adotado, a administração de estreptozotocina pode gerar uma hiperglicemia mantida em animais viáveis sem suplementação insulínica, possibilitando assim, o desenvolvimento de alterações similares às complicações crônicas desenvolvidas em pacientes diabéticos, como redução da velocidade de condução e do fluxo sanguíneo no nervo, redução do limiar doloroso e alterações de sensibilidade, característicos da neuropatia diabética (WALKER et al., 1999; FRICKER et al., 2008). Essas propriedades indicam que, dentro das limitações de um modelo experimental, a estreptozotocina induz um quadro de neuropatia com boa equivalência clínica.

## 2.2 TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO

Entende-se como terapia celular, o conjunto de metodologias e abordagens tecnológicas que utilizam células para o tratamento de doenças como câncer, diabetes, doenças cardíacas e neurodegenerativas. Dentro desse contexto, destaca-se o potencial terapêutico das células-tronco. Estas são células indiferenciadas que possuem elevada capacidade de divisão celular e que podem se diferenciar e originar células especializadas. Células-tronco podem ser embrionárias, quando obtidas nos estágios iniciais de desenvolvimento do embrião, ou adultas, encontradas nos tecidos especializados, onde têm a função de servir de suporte para manutenção e regeneração dos mesmos (MEIRELES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; SANTOS et al., 2011). Estas células são classificadas também quanto a sua capacidade de diferenciação, em toti, pluri, multi, oligo ou unipotente. Células-tronco totipotentes são aquelas encontradas no embrião até o estágio de mórula e que possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tecidos embrionários e extra-embrionários, enquanto que as pluripotentes são capazes de se diferenciar apenas nos tecidos próprios do embrião. As multipotentes possuem capacidade de gerar células de vários tecidos e as células-tronco oligo ou unipotentes são aquelas que possuem a habilidade de se diferenciar



em poucos ou apenas um tipo celular específico (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

Recentemente, foi descrito um novo tipo de células-tronco. Denominadas células-tronco de pluripotência induzida ou iPS, elas são obtidas pela reprogramação genética de células adultas diferenciadas. Em 2012, o pesquisador japonês Shinya Yamanaka foi um dos ganhadores do prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, por desenvolver a técnica revolucionária que possibilitou a produção das iPSs (TAKAHASHY; YAMANAKA et al, 2006). Estas células apresentaram as mesmas características de diferenciação e auto-renovação das células-tronco embrionárias e desde sua descoberta, têm renovado os ânimos dos pesquisadores, visto que o uso de células-tronco embrionárias apresenta limitações nos aspectos éticos/religiosos pela necessidade de um embrião para sua obtenção. Porém, assim como as células-tronco embrionárias as iPS apresentam instabilidade cromossômica e possibilidade de indução de tumores (HANNA et al., 2007; MIURA et al., 2009).

O uso terapêutico de células-tronco adultas tem despertado o interesse de clínicos e pesquisadores no mundo todo, devido à sua capacidade de auto-renovação e de se diferenciar em células dos diversos tecidos especializados (ZAGO, 2005). Além disso, elas podem ser obtidas de órgãos provenientes dos três tecidos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) como: medula óssea, fígado, músculo esquelético, epitélio da pele, sangue periférico, polpa dentária, pâncreas, retina, encéfalo, entre outros (MEIRELES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006). Dentro deste cenário, as células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) tem sido popularizadas, pois compreendem células-tronco adultas com grande potencial de diferenciação, além de serem facilmente isoladas e expandidas *in vitro* (SOUZA et al., 2010). Essas células tem a função fisiológica de manter o estado de homeostase do organismo pela reposição de células destruídas por lesões ou doenças. Sua caracterização, de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular, deve obedecer aos seguintes critérios: (1) capacidade de aderência ao plástico, caso mantida sob condição de cultura; (2) expressão de marcadores que as caracterizem imunofenotipicamente como CD90, CD44 e SCA-1, e baixa expressão de CD45, CD34, CD11b, entre outros, e; (3) capacidade de se

diferenciar em múltiplas linhagens, como adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas (DOMINICI, 2006).

Dados da literatura tem demonstrado o grande potencial terapêutico das CMsMO (STOCK et al., 2014; BRAGA et al., 2008; TOGEL et al., 2005; GERDONI et al., 2007; PROCKOP; OLSON, 2007; URBAN et al., 2008). Os mecanismos propostos para explicar tais ações terapêuticas incluem fusão celular, transdiferenciação e ação parácrina. Em função do caráter regenerador e reparador desta terapia a fusão celular e a transdiferenciação foram as hipóteses inicialmente propostas. A hipótese da fusão célula-célula diz que células hospedeiras de diferentes linhagens são fusionadas às células-tronco, as quais passam a apresentar os marcadores de superfície da célula do hospedeiro. Em 2003, Alvarez-Dolado e colaboradores conseguiram observar esse fenômeno entre células-tronco derivadas da medula óssea e células neurais, cardiomiócitos e hepatócitos. Entretanto, devido a sua baixa frequência, parece pouco provável que este mecanismo seja o responsável pelo reparo tecidual (WANG et al., 2003).

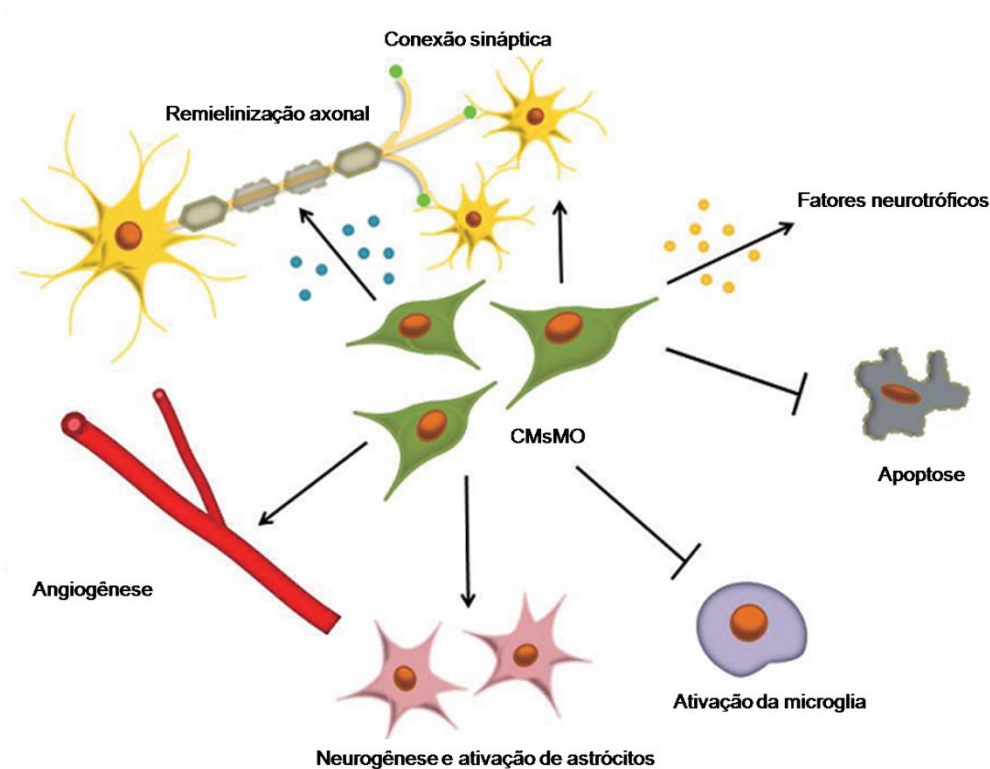
A transdiferenciação compreende a capacidade da célula-tronco adulta obtida de um tecido de gerar tipos celulares diferenciados de outros tecidos, até mesmo originários de uma camada germinativa distinta. Contudo, estudos demonstraram que a injeção de células-tronco no miocárdio isquêmico melhorou a função cardíaca 72 horas após o transplante, e devido a este curto espaço de tempo em que se observou o efeito, a hipótese da transdiferenciação foi descartada (GNECCHI et al., 2005; 2006; NOISEUX et al., 2006). Pesquisas de outros grupos demonstraram que o número de cardiomiócitos provenientes de células-tronco exógenas foi demasiadamente baixo para explicar a notável melhora da função cardíaca (LAFLAMME et al., 2007; LIÃO et al., 2007). Deste modo, ficou claro que o efeito terapêutico observado no miocárdio lesado, foi em grande parte atribuído ao efeito parácrino das células-tronco, as quais podem influenciar as células adjacentes a exercerem suas funções através da secreção de vários fatores como citocinas e fatores de crescimento que podem melhorar a sobrevivência celular e ativar mecanismos endógenos de reparo (GNECCHI et al., 2008; BURDON et al., 2011; SEO; CHO, 2012; MASTRI; LIN; LEE, 2014). Neste contexto,

atualmente acredita-se que este seja o provável mecanismo desencadeador dos benefícios da terapia com CMsMO. Assim, é válida a investigação deste efeito sobre a recuperação funcional e regeneração do sistema nervoso lesionado (BURDON et al., 2011).

### 2.2.1 CMsMO e dor neuropática

Apesar do caráter regenerativo da terapia celular ser relativamente bem aceito há algumas décadas, a possibilidade desse fenômeno ser aplicável ao sistema nervoso é uma temática recente. A idéia de que células-tronco poderiam ter ação neuroprotetora em doenças do sistema nervoso, surgiu no final do século passado com a descoberta da presença de células-tronco no tecido neural adulto e a sua capacidade de se diferenciar em neurônios *in vitro* (MORSHEAD et al., 1994; MCKAY 1997; PING et al., 2002). Posteriormente, Eglitis & Mezey em 1997, demonstraram que CMsMO expressavam marcadores de células gliais no encéfalo de camundongos adultos. Poucos anos depois, estes mesmos autores revelaram que estas células são capazes de se diferenciar em neurônios *in vivo* (MEZEY et al., 2000). Em conjunto, essas pesquisas levantaram a possibilidade do uso de CMsMO para tratar doenças degenerativas ou lesão do sistema nervoso. De fato, diversos estudos têm fortalecido essa idéia (STEMBERGER et al., 2011; HAYASHI et al., 2013; PLUCHINO; COSSETI, 2013; STONE; GRANDE; LOW, 2013).

De modo similar às outras ações terapêuticas de células-tronco, a hipótese de que os efeitos neuroprotetores de CMsMO decorriam de sua diferenciação em células do tecido lesado, foi substituída pela hipótese da ação parácrina. Em 2002, Chop e Li, demonstraram que CMsMO possuem efeitos terapêuticos em modelos experimentais de lesão neural, sugerindo que estes seriam mediados pela liberação de fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias, os quais atuariam estimulando a neuro e angiogênese, promovendo assim a restauração do tecido lesionado e melhora da função (figura 1).



**Figura 1 Potencial terapêutico das CMsMO na restauração neural.** As células mesenquimais secretam uma variedade de fatores neurotróficos e angiogênicos que promovem o crescimento neuronal, induzem a angiogênese, neurogênese e ativação dos astrócitos, melhorando a conexão sináptica e remielinização axonal, diminuição da apoptose e regulação da ativação microglial (modificado de Seo & Cho, 2012).

Apesar de, como descrito acima, já serem demonstradas as propriedades neuroprotetoras e regenerativas destas células no sistema nervoso, o potencial das células-tronco no controle da dor neuropática, a qual está diretamente ligada à perda da integridade e função neural, ainda é uma questão pouco investigada. Os primeiros estudos que abordaram esse tema demonstraram que em modelos murinos de dor neuropática por lesão mecânica do nervo isquiático, o tratamento com CMsMO previne o aparecimento do comportamento doloroso (KLASS et al., 2007; MUSSOLINO et al., 2007). O uso de CMsMO para o tratamento da neuropatia diabética foi realizado pela primeira vez por Shibata e seus colaboradores em 2008. Neste estudo, os autores utilizaram o modelo de diabetes por estreptozotocina e injetaram as células mesenquimais no músculo esquelético. Quatro semanas depois, a análise do tecido nervoso mostrou um aumento local no número de capilares e na concentração de fatores angiogênicos. Um estudo subsequente com esse

mesmo modelo experimental demonstrou que o uso de CMsMO melhorou a velocidade de condução paralelamente ao aumento da vascularização do nervo periférico, sugerindo que o seu efeito terapêutico decorre de ação parácrina (JEONG et al., 2009). Nenhum desses estudos, no entanto, avaliou o impacto do transplante sobre a dor neuropática comportamental. Em linha com essa idéia, demonstramos recentemente em nosso laboratório, que células mesenquimais da polpa do dente induzem efeito antinociceptivo na neuropatia diabética dolorosa experimental (GUIMARÃES et al., 2013).

Os estudos descritos acima sugerem os benefícios das células-tronco na neuropatia, por outro lado, a melhor caracterização desses efeitos, assim como os mecanismos envolvidos nessas ações, necessita ainda maiores investigações. Desta forma, no presente estudo os efeitos do transplante de CMsMO sobre a neuropatia diabética experimental serão investigados, abordando seu potencial modificador da doença em detrimento ao perfil paliativo dos analgésicos clinicamente disponíveis.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 GERAL

Avaliar os possíveis efeitos terapêuticos de CMsMO em modelo experimental de neuropatia periférica de origem diabética em camundongos.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar se o transplante com CMsMO induz antinocicepção na neuropatia diabética experimental;
- Verificar se o transplante com CMsMO é capaz de reverter as alterações de sensibilidade térmica de camundongos com neuropatia diabética;
- Verificar se o transplante com CMsMO é capaz de restabelecer a função motora de camundongos com neuropatia diabética;
- Verificar se o tratamento com CMsMO é capaz de modificar o padrão de alterações morfológicas presentes no nervo isquiático de animais neuropáticos;
- Avaliar se o tratamento com CMsMO influencia no perfil de expressão de citocinas na medula espinal de camundongos com neuropatia diabética.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, machos, pesando entre 20 e 25 gramas, com idade entre 40 e 60 dias, provenientes do Biotério do CPqGM, FIOCRUZ – BA e os doadores de medula óssea foram da mesma linhagem, porém fêmeas entre 35 e 50 dias de idade.

Os camundongos foram mantidos em sala climatizada a  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , em ciclo claro/ escuro de 12 horas cada, sem restrição hídrica ou alimentar durante todo o período experimental. Os experimentos comportamentais foram realizados entre as 7 horas da manhã e 5 horas da tarde. Todos os experimentos foram realizados conforme as recomendações da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do CPqGM, FIOCRUZ – BA (CEUA: L-IGM - 025/2011).

### 4.2 MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA

Os camundongos receberam durante três dias consecutivos, uma administração diária, por via intraperitoneal, de 80 mg/kg de estreptozotocina (Sigma), utilizando tampão citrato (pH 4,5) como veículo (GUIMARÃES et al., 2013). O grupo naive recebeu apenas a administração do veículo e foram considerados diabéticos os animais que apresentaram concentração plasmática de glicose superior a 250 mg/dL em determinações com glicosímetro digital Accu-Check (Roche Diagnósticos, Mannheim, Alemanha). Em todos os grupos experimentais a glicemia e o peso corporal foram avaliados no período basal, 28 e 90 dias após a indução do diabetes. Os limiares nociceptivos mecânico e térmico foram avaliados antes e após a indução do modelo, durante todo o período experimental (90 dias).

### 4.3 OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E TRANSPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMAIS

As células totais da medula óssea foram isoladas dos ossos longos das patas traseiras de camundongos fêmeas, eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub>. Usando técnicas estéreis, a pata foi amputada na altura da articulação coxo-femural e foram retirados os músculos e nervos para obtenção da tíbia e fêmur. As epífises foram removidas e a medula lavada usando uma seringa com agulha a fim de coletar as células totais da medula em um tubo com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado 50 µg/ml de gentamicina. As células foram submetidas ao gradiente de *Ficcol* e centrifugadas a 1500 RPM (806g) durante 10 minutos a 15°C. Foi coletado o anel formado por células mononucleares e o restante do material contendo principalmente eritrócitos e granulócitos foi desprezado. Em seguida, a fração enriquecida de células mononucleares foi novamente diluída em meio DMEM completo, centrifugada a 1500 RPM (806 g) por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em solução fisiológica (0,9% de NaCl), sendo em seguida submetido ao teste de viabilidade com azul de *trypan*. As células foram contadas em câmara de *Newbauer*, onde uma amostra diluída (1:1000) foi posta na câmara para contagem das células presentes nos quatro quadrantes, em todos os campos. O resultado obtido foi dividido por quatro e multiplicado por 10<sup>5</sup>, sendo 10<sup>3</sup> o fator de diluição utilizado e 10<sup>4</sup> o fator da câmara.

Para aquisição de CMsMO, as células mononucleares da medula óssea foram cultivadas em frascos de cultura a uma densidade de 7x10<sup>6</sup> células/ml em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células não aderentes foram removidas por lavagens em meio DMEM após 3 dias de cultura. Depois de terem atingido cerca de 80% de confluência, essas células foram “*tripsinizadas*” e semeadas em novos frascos para expansão. O cultivo celular foi monitorado por microscopia de contraste de fase e o meio trocado três vezes por semana até que a confluência celular tivesse atingido de 80 a 100%. Então, as células foram centrifugadas a 1500 RPM (806 g) por 10 minutos a temperatura ambiente, contadas em câmara de *Newbauer* e preparadas para a administração nos animais. O número de CMsMO



administradas em cada animal foi de  $1 \times 10^6$  em solução fisiológica estéril com 10% de heparina. As células foram administradas por via endovenosa pela veia da cauda.

#### 4.4 CITOMETRIA DE FLUXO

Os marcadores característicos de CMsMO foram avaliados por citometria de fluxo. Para isso, CMsMO na 6ª passagem, foram tripsinizadas e a suspensão celular foi lavada 2 vezes com solução salina 0,9%. Uma concentração de  $5 \times 10^5$  de células foi incubada a 4°C por 30 minutos com os seguintes anticorpos na concentração 1/50: CD90PE (CALTAG, Buncningham, Inglaterra), Sca1PE-Cy5 (CALTAG), CD45APC (CALTAG), CD34PE (CALTAG), CD44PE (CALTAG), CD11b (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), CD31APC (BD), CD117PE (BD) e CD63PE (BD). Após incubação, foi realizada mais duas lavagens com solução salina 0,9% e, em seguida, realizada a aquisição dos dados e análise no citômetro de fluxo LRSFortessa (BD). Pelo menos 50.000 eventos foram coletados e analisados.

#### 4.5 DIFERENCIAÇÃO DE CMSMO

A capacidade de diferenciação das CMsMO em adipócitos, condrócitos e osteócitos, foi investigada com a utilização de meio suplementado com fatores indutores de diferenciação específicos, na 6ª passagem. Para a diferenciação adipogênica, CMsMO foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo ( $10^4$  células/poço). Após atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e substituído por meio de indução adipogênica *Stem Pro Adipogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado com meio completo. Para observar a deposição de gordura, após quinze dias em cultivo, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. Em seguida, foram coradas com solução de *Oil red* por 5 minutos e em seguidas lavadas com álcool 70%. As imagens foram capturadas

por microscópio AX70 (OLYMPUS) utilizando o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

Para a diferenciação condrogênica, CMsMO foram cultivadas com meio DMEM e 10% SBF em placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo ( $10^5$  células/poço). Após atingirem 40-50% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas, durante 21 dias, com meio de diferenciação condrogênica *Stem Pro Chondrogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo. Para avaliação da síntese de proteoglicanos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com solução de *Alcian Blue* (GIBCO) em HCl 0,1N por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com solução de HCl 0,1N e, em seguida, adicionado água destilada para a neutralização da acidez. As imagens das células diferenciadas em condrócitos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

Para diferenciação osteogênica,  $5 \times 10^5$  CMsMO foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo. Ao atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas por até 14 dias, com meio de diferenciação osteogênica *Stem Pro Osteogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada em microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo. A deposição de cálcio foi observada através da coloração com vermelho de Alizarina 2%. Após fixação em paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavagem com água destilada, as células foram coradas com solução de vermelho de Alizarina 2% por 3 minutos e, em seguida, realizadas duas lavagens com água destilada. As imagens das células diferenciadas em

osteoblastos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO - FILAMENTOS DE VON FREY

Com o objetivo de avaliar o limiar de resposta ao estímulo mecânico, foi realizado o teste com os filamentos de von Frey, que consistem de segmentos de fio de nylon cuja rigidez a tensão é previamente determinada em gramas pelo fabricante (*Stoelting*). O método de leitura utilizado é denominado *up-and-down*, por considerar um total de seis respostas consecutivas iniciando após o filamento em que o animal muda do comportamento não responsivo, interpretado como não nociceptivo, ao comportamento responsivo, detectado pelo movimento de retirada da pata ou *flinch* (CHAPLAN et al.,1994). Nessa técnica, cada filamento é utilizado por seis segundos e apenas quando o animal está ativo (acordado), com as quatro patas sobre a superfície e o peso do corpo igualmente distribuído. Inicialmente os camundongos foram postos em caixas de acrílico transparente, elevadas sobre um espelho, com fundo em tela de arame galvanizado que permite acesso a superfície plantar da pata, onde permaneceram por trinta minutos para adaptação. Em seguida, a leitura do limiar nociceptivo foi realizada.

O resultado obtido considera o valor logaritmo da força proporcionada pelo último filamento ( $X_f$ ), o valor obtido de acordo com cada padrão de respostas positivas e negativas ( $k$ ) e a média da diferença entre os estímulos em unidades logarítmicas ( $\delta$ ), sendo expresso como 50% do limiar nociceptivo em gramas, ou seja, a força do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações, conforme fórmula a seguir:

$$50\% \text{ gramas Limiar} = \frac{(10^{[X_f + k\delta]})}{10.000}$$

#### 4.7 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO - HARGREAVES

Com o objetivo de avaliar o limiar de resposta ao estímulo térmico foi realizado o teste plantar em aparelho Hargreaves (Ugo Basile, Varese, Itália), como descrito previamente (HARGREAVES et al., 1988). Para isso, os animais foram alocados em compartimentos individuais de acrílico e posicionados sobre uma superfície de vidro especial, que permite a passagem homogênea da luz e do calor, durante cinco minutos para adaptação ao ambiente. Após esse período, uma fonte de luz infravermelha foi posicionada sob uma das patas traseiras do animal, enquanto um cronômetro eletrônico foi acionado. Quando o animal exibe resposta positiva (flinch ou retirada da pata) a fonte de luz e o relógio param automaticamente. Um tempo de corte de 20 segundos foi utilizado para evitar dano tecidual. Em cada animal foram realizadas três medidas de latência de retirada da pata, com um intervalo de 5 a 10 minutos entre elas e o resultado foi expresso como a média das três leituras em segundos.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA – TESTE DE ROTA-ROD

Com o objetivo de avaliar a função motora dos animais diabéticos e submetidos ao transplante com CMsMO, foi realizado o teste de rota-rod (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), descrito previamente por KURIBARA et al., 1977. Este teste consiste em um aparelho composto de uma barra horizontal rugosa de 3 cm de diâmetro, localizada a 25 cm da superfície, subdividida em cinco compartimentos e programada para girar a velocidade constante de 8rpm. Como controle positivo, foi utilizado um grupo de animais que receberam diazepam (10mg/kg, i.p., pré-tratamento de 30 minutos - NONATO et al., 2009), um depressor do SNC que reduz o tempo de permanência do animal no aparelho. O teste teve duração total de 120 segundos, durante este período, foi cronometrado o tempo em que o animal permaneceu na barra. Cada animal teve até 3 tentativas para ultrapassar 100 segundos. Para os animais que caíram nas 3 tentativas, foi calculada a média de permanência nas 3 leituras e aqueles que alcançaram 100 segundos ou mais não foram recolocados no aparelho e este foi considerado o seu tempo de corrida.

#### 4.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO NERVO ISQUIÁTICO

Ao término dos 90 dias que consistiram o período experimental, os camundongos foram eutanasiados e amostras do nervo isquiático ( $\pm 1$ cm) foram coletadas, processadas e submetida a análise morfológica por microscopia óptica e eletrônica de transmissão. As amostras foram fixadas em solução contendo 2,5% de glutaraldeído (Sigma, USA), 2% de paraformaldeído (Reagen, Brasil), tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,4 e água destilada, durante 24 horas a 4°C. Logo após foram pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1% (Sigma, USA), ferricianeto de potássio 0,8% (Synth, Brasil), cloreto de cálcio 5 mM e tampão cacodilato por 1 hora em temperatura ambiente, seguido de desidratação com diferentes concentrações de acetona. Posteriormente, as amostras foram submersas em solução de acetona e resina Poly/Bed (Polyscience, Alemanha) por 24 horas em diferentes concentrações e em seguida, polimerizadas em estufa a 60°C durante três dias. Foram então seccionadas em ultramicrotomo Leica S6E (1 $\mu$ M) e coradas com azul de toluidina (Merk, Inglaterra), diluído em 1% de tetraborato de sódio (Ecibra, Brasil).

As imagens dos cortes semifinos foram capturadas e digitalizadas através do microscópio Olympus BX51 e para análise morfométrica do nervo, foi utilizado o *software Image Pro-Premier 9.1* (Media Cybernetics ®). Foram digitalizadas imagens de um corte por animal de cada grupo, na objetiva de 10x para observação da área total do nervo e em objetiva de 100x, para a seleção da amostra. Em cada amostra foram definidos cinco campos de áreas conhecidas, dispostos aleatoriamente e foram excluídos da análise morfométrica, axônios em degeneração, com dupla mielinização e aqueles contidos no limite inferior e direito dos campos.

O cálculo utilizado para se obter a porcentagem da amostra foi realizado através da multiplicação da somatória da área dos campos por cem e dividido pela área total do nervo. Já para se obter o número total de axônios, a somatória dos axônios quantificados foi multiplicada por cem e dividido pela porcentagem da amostra.

A mensuração do diâmetro médio dos axônios foi resultado da somatória do diâmetro dividido pelo número de axônios, do mesmo modo ocorreu para o cálculo do diâmetro médio das fibras mielínicas. Para a espessura da bainha de mielina, o diâmetro da fibra mielínica foi subtraído pelo diâmetro do axônio e dividido por dois. Logo após, foi calculada a espessura média da bainha através da divisão do somatório da espessura da bainha de mielina dividido pelo número de fibras. A razão G foi determinada através da razão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa.

Para análise ultraestrutural do nervo isquiático foram realizados cortes ultrafinos das amostras, contrastadas com acetato de uranila a 5% e 15% de citrato de chumbo e visualizadas em microscópio eletrônico JEOL JEM -1230.

#### 4.10 COLETA DE TECIDO, EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Para coleta de medula espinal, animais de todos os grupos experimentais foram sacrificados por decaptação e o segmento lombar 4-5 da medula foi coletado nos diferentes tempos experimentais. Cada segmento de medula espinal foi então homogeneizado em 100  $\mu$ L de tampão (PBS 1x, NaCl 0,4M, tween – 20 0,05%, BSA 0,5%, PMSF 0,1mM, DMSO, cloreto de benzetônio 0,1mM, EDTA 10mM, e aprotinina , 20KIU), permanecendo por uma hora em gelo. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por 25 minutos e o sobrenadante coletado. Para que não houvesse variação da quantidade de proteínas de um animal para o outro, foi realizada a dosagem de proteínas totais pelo método de fluorescamina, que foi posteriormente utilizada na normalização dos dados. As amostras processadas foram utilizadas para a quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  pela técnica do ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Foram utilizados os kits DuoSet ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para cada citocina.

Placas de 96 poços (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50  $\mu$ L do anticorpo de captura (anticorpo monoclonal purificado anti-citocina), diluído em PBS 1x e mantidas a 4°C *overnight*. Em seguida, as placas foram lavadas 3X com PBS - Tween® 20 a 0,05%, e foram adicionados 100  $\mu$ L da solução de PBS com 5% de Tween® 20 e NaN<sub>3</sub> a

0,05%. Foram então mantidas à temperatura ambiente por 2 horas com o objetivo de bloquear os sítios inespecíficos. Logo após, as placas foram lavadas 3X e incubados por 2 horas à temperatura ambiente com 50 µL da amostra (por poço, em duplicata) e suas respectivas curvas padrão. Após novas lavagens, foi adicionado o anticorpo de detecção anti-citocina biotilado e as placas foram novamente incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens foram adicionados 50 µL/poço de estreptoavidina diluída 1:200, e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens, a reação foi revelada com 50 µL/poço de solução reveladora contendo 10 mL de tampão citrato-fosfato 1M, 2 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uma pastilha de TMB (tetrametilbenzidina). O bloqueio da reação foi feito pela adição de 50 µL/poço de ácido fosfórico 1:20. As placas foram lidas em espectrofotômetro (Spectra Max 190 -Molecular Devices, Califórnia, EUA), sob comprimento de onda de 450 nm e os dados analisados no software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices).

#### 4.11 DROGAS, MEIOS, DILUENTES E REAGENTES

*Alcian blue* (GIBCO);

Aprotinina (Sigma, EUA);

Azul de Trypan (Trypan blue solution) a 0,4%, da (Sigma, EUA);

Azul de toluidina (Merk, Inglaterra);

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Invitrogen, EUA);

Estreptozotocina (Sigma, EUA), diluída em tampão citrato (pH 4,5);

Ferricianeto de potássio a 0,8% (Synth, Brasil);

Gabapentina (Pfizer®, USA), diluída em solução salina (NaCl a 0,9%);

Glutaraldeído (Sigma, USA);

Histopaque® de densidade 1077 e 1119 (Sigma, EUA);

Kits Duoset ELISA Development System (R e D System, EUA);

*Oil red* (Sigma, EUA);

Paraformaldeído (Reagen, Brasil) diluído em tampão cacodilato de sódio 1M, pH 7,4;

Resina poly/bed (Polyscience, Alemanha);

Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);

*Stem Pro Adipogenesis Differentiation Kit* (GIBCO);

*Stem Pro Chondrogenesis Differentiation Kit* (GIBCO);

*Stem Pro Osteogenesis Differentiation Kit* (GIBCO);

Sulfato de gentamicina (Garamicina® - Mantecorp, Brasil) diluído em DMEM;

Tetraborato de sódio (Ecibra, Brasil);

Tetrametilbenzedina (TMB – Sigma, EUA);

Tetróxido de ósmio 1% (Sigma, EUA);

Tripsina (Sigma, EUA);

Vermelho de alizarina (INLAB, Brasil);

#### 4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de seis animais por grupo. A comparação entre os grupos foi feita utilizando one-way ANOVA, seguido do teste de Tukey. Em estudos de medidas repetidas, foi utilizado o two-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Para as análises morfométricas, foi realizado o teste de Shapiro wilk e como todas não foram positivas para normalidade, foi realizado o teste de Kurskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns. Os dados foram analisados no software GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA), e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ .



#### 4.13 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nesse estudo, o período experimental foi de 90 dias, a partir da indução do modelo. As leituras dos limiares nociceptivos foram realizadas durante todo o período experimental no horário compreendido entre as 07 e 17 horas. A coleta de do segmento do nervo isquiático para análise morfológica e morfométrica, foi realizada no final do período experimental e as coletas de tecido para dosagem de citocinas foram realizadas nos seguintes tempos: (1) antes da indução do modelo de neuropatia diabética (basal), (2) 28 dias após a indução do modelo e antes do transplante, (3) 45 dias após a indução do modelo de diabetes, (4) no fim do período experimental (90 dias).

Os grupos experimentais foram definidos da seguinte forma:

- ETZ-: Grupo de animais que não foram induzidos ao modelo de diabetes por ETZ nem receberam a administração de CMsMO. O objetivo deste grupo foi avaliar a resposta do animal não doente, em situação de homeostase.
- ETZ+: Animais que foram induzidos ao modelo de diabetes por ETZ, porém não foram transplantados com CMsMO. O objetivo desse grupo é evidenciar a resposta do animal doente ao longo do tempo.
- ETZ + CMsMO: Animais diabéticos e submetidos ao transplante de  $1 \times 10^6$  CMsMO. O objetivo desse grupo é avaliar o efeito do tratamento com CMsMO sobre diferentes parâmetros de neuropatia.
- ETZ + Gabapentina: Grupo de animais induzidos ao modelo de diabetes e tratados com o fármaco de referência usado na clínica atualmente. O objetivo desse grupo é comparar o efeito da droga de referência ao efeito de CMsMO nesse modelo experimental.

A gabapentina (30 mg/kg) foi administrada por via oral a cada 12 horas durante seis dias consecutivos. A avaliação dos limiares nociceptivos desses animais, durante o tratamento, foi realizada antes e uma hora após a administração da gabapentina, entre as 08 e 10 horas da manhã.

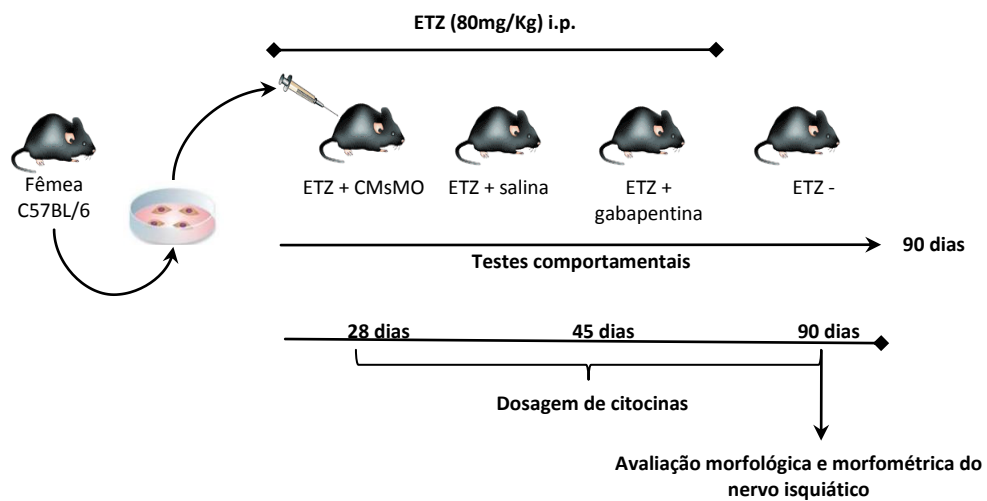


Figura 2: Delineamento experimental.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DE CMSMO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A expressão de marcadores de superfície característicos de células-tronco mesenquimais foi investigada, como parte fundamental do processo de caracterização celular. A análise por citometria de fluxo revelou células com alta expressão de marcadores de CMsMO, como SCA-1, CD44 e CD90, além de alta expressão para células GFPs, em contrapartida revelou baixa expressão de CD11b, CD45, CD31, CD34, CD117 e CD63 (tabela 01). As análises foram realizadas na 6<sup>o</sup> passagem.

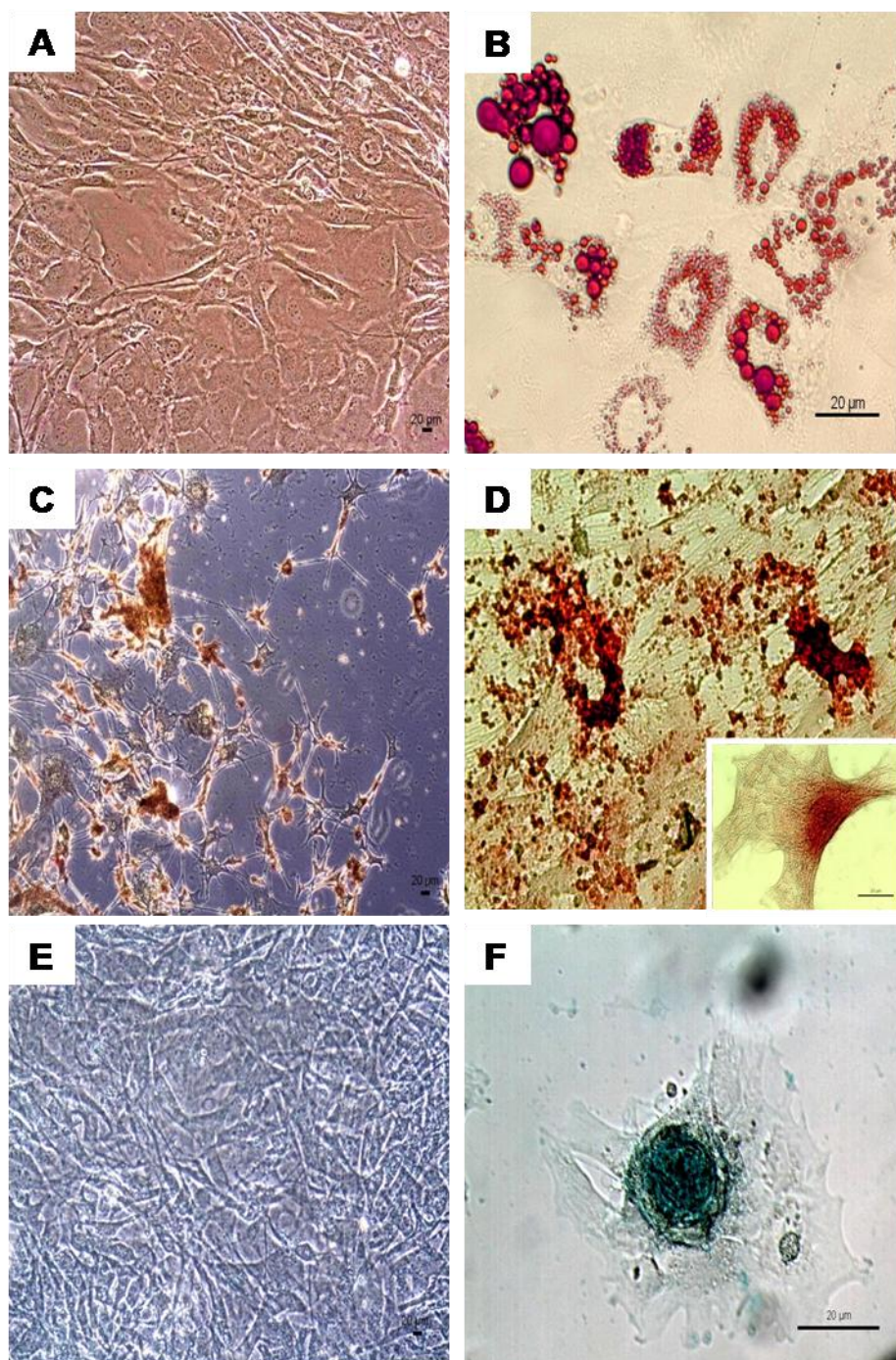
**Tabela 1:** Expressão de marcadores de superfície celular das CMsMO

<b>Marcador</b>	<b>% células positivas</b>
GFP	84,3
CD11b	1,1
CD45	9,9
CD31	2,1
CD34	2,5
SCA-1	82,0
CD44	96,2
CD117	2,1
CD63	6,0
CD90	68,4

### 5.2 DIFERENCIAÇÃO DE CMSMO EM LINHAGENS ADIPOGÊNICA, CONDROGÊNICA E OSTEOGÊNICA

As culturas de CMsMO foram capazes de se diferenciar *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (figura 03). CMsMO mantidas em contato com meio de diferenciação para linhagem adipogênica, apresentaram acúmulo intracelular lipídico após quinze dias de cultivo (figura 3B), o que não foi observado em CMsMO indiferenciadas coradas com oil red (figura 3A). Ao término de quinze dias em contato com meio de diferenciação osteogênica, a observação microscópica evidenciou na cultura de CMsMO a presença de deposição de cálcio intracelular, corados com corante vermelho de

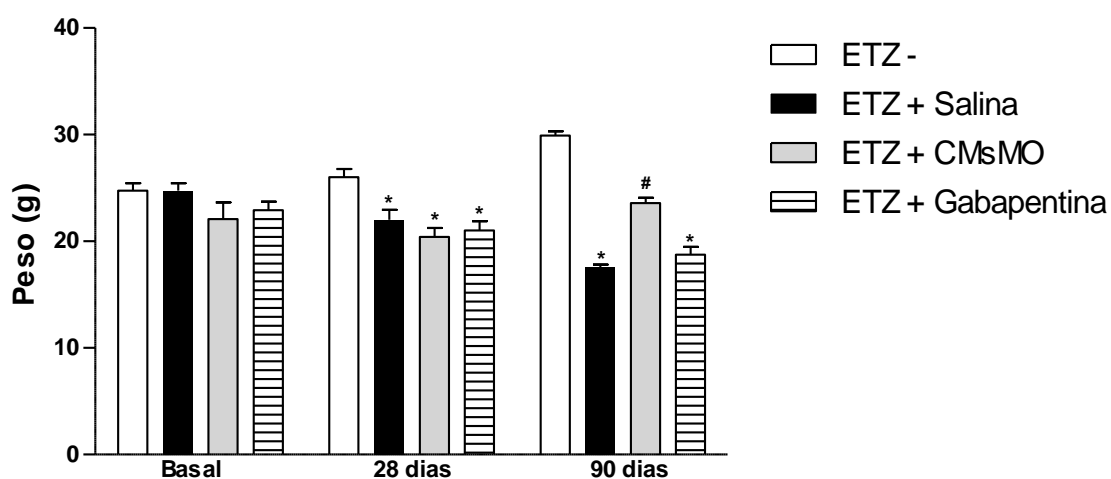
alizarina. Esse achado sugere diferenciação em linhagem osteogênica (figuras 3D e *inset*). As células controle também foram coradas, porém como evidenciado na figura 3C, as mesmas foram negativas para deposição de cálcio intracelular. CMsMO foram submetidas ao contato com meio de diferenciação condrogênica e ao final de 21 dias foram coradas com Alcian blue. Nessas células foi evidenciada a presença de proteoglicanos, corados em azul, característicos de condrócitos (figura 3F). As células controle também foram submetidas à coloração, porém não foi evidenciado diferenciação em condrócitos, permanecendo negativas para proteoglicanos (figura 3E).



**Figura 3: Cultura de CMsMO em diferenciação em células das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, observadas por microscopia óptica de contraste de fase.** Painel A. CMsMO indiferenciadas submetidas a coloração com *oil red*. Painel B. Diferenciação adipogênica, presença do acúmulo de lipídios intracelular corado com *oil red*. Painel C. CMsMO indiferenciada submetida a coloração com alizarina vermelha a 2%. Painel D. Diferenciação osteogênica, células com acúmulo de cálcio coradas com alizarina vermelha 2%. *Inset* - Célula em diferenciação osteogênica em maior aumento. Painel E. CMsMO indiferenciada submetida a coloração por *Alcian blue*. Painel F. Diferenciação em condrócitos evidenciada pelo acúmulo de proteoglicanos corado por *Alcian blue*. Barra = 20 µm.

### 5.3 PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Durante todo o período experimental, o peso corporal dos camundongos foi monitorado, e os dados estão representados na figura 04. Ao final de quatro semanas após a indução do diabetes, imediatamente antes do transplante de CMsMO, os camundongos ETZ+ sofreram uma redução de peso estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo de camundongos que não receberam ETZ (ETZ-). Ao final do período experimental de noventa dias, a perda de peso dos animais ETZ+ tratados com CMsMO foi menor em relação aos animais dos grupos ETZ + salina e ETZ + gabapentina ( $p < 0,01$ ).

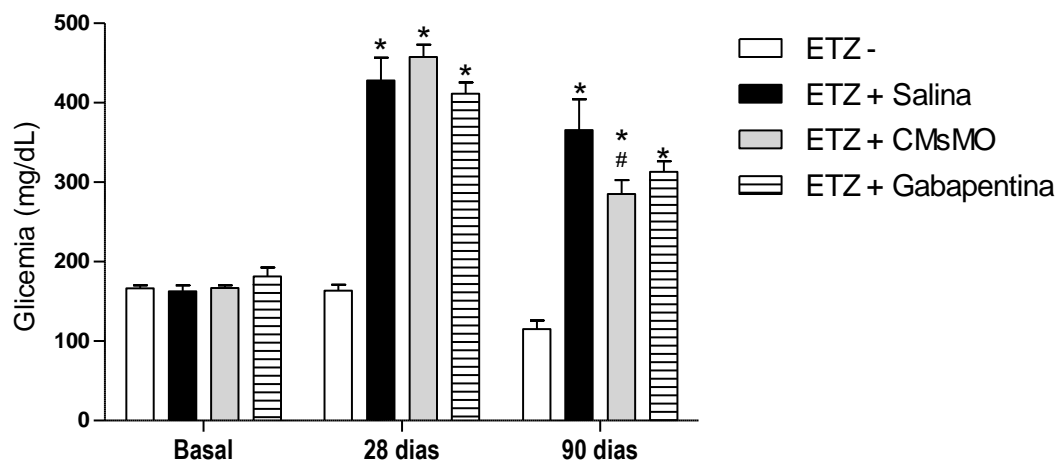


**Figura 4: Variação do peso corporal dos animais durante o período experimental.** Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 06$  animais. \* Significância estatística em relação ao grupo ETZ- ( $p < 0,001$ ). # Significância estatística em relação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Análise estatística determinada pelo teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

### 5.4 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLICOSE

Durante todo o período experimental, a glicemia dos camundongos foi monitorada, estando os dados representados na Figura 5. Quatro semanas após a indução do modelo experimental de diabetes, e imediatamente antes do transplante, os camundongos tratados com ETZ apresentaram aumento da glicemia em relação aos camundongos que não receberam ETZ (ETZ-)

( $p < 0,001$ ). No tempo de 90 dias, o transplante com CMsMO reduziu de modo estatisticamente significativa a glicemia dos camundongos ( $p < 0,001$ ), embora esses valores ainda sejam superiores aos dos animais ETZ- ( $p < 0,001$ ).



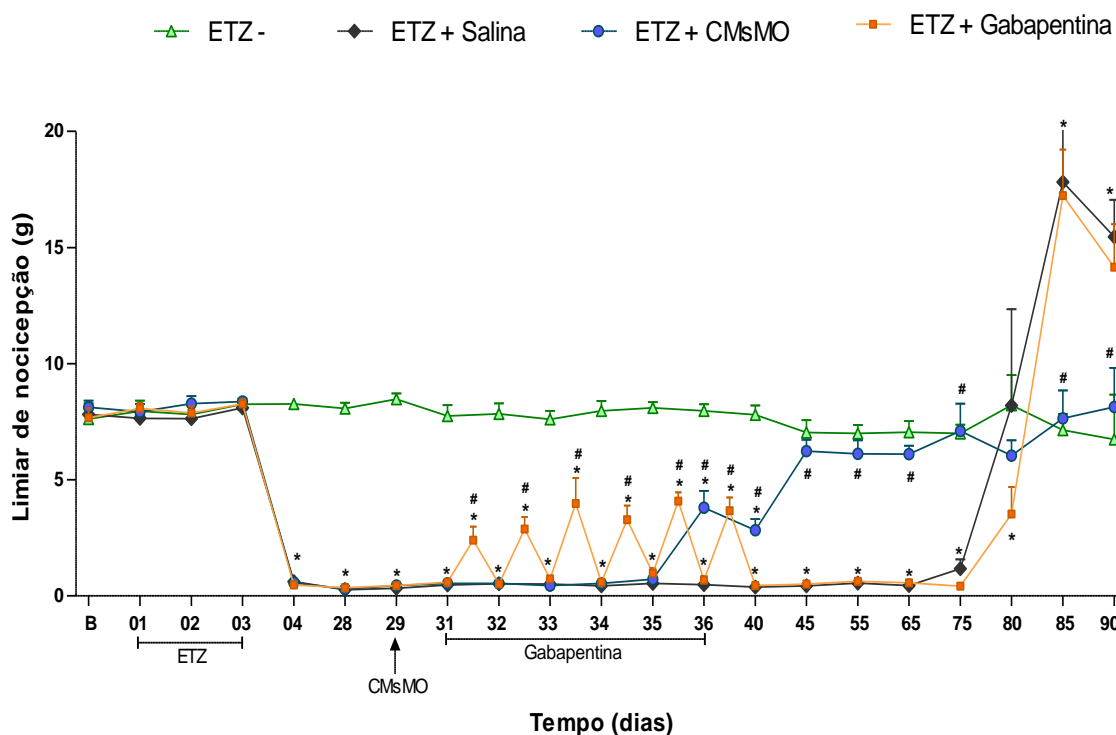
**Figura 5: Variação da glicemia dos animais durante o período experimental.** Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 06$  animais. \* Significância estatística em relação ao grupo ETZ- ( $p < 0,001$ ). # Significância estatística em relação ao grupo ETZ+salina ( $p < 0,001$ ). Análise estatística determinada pelo teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

## 5.5 LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO

O limiar de resposta a estímulo mecânico foi avaliado com o objetivo de confirmar o desenvolvimento da neuropatia periférica e avaliar o efeito dos tratamentos. Apenas 24h após o fim do período de indução do modelo há uma ampla e consistente redução do limiar de resposta a estímulo mecânico ( $p < 0,001$ ), caracterizando o desenvolvimento da NDPD (Figura 6). O tratamento com gabapentina (30 mg/kg) duas vezes ao dia por seis dias consecutivos (31 até 36), induziu efeito antinociceptivo apenas parcial e transitório, retornando ao estado de alodinia mecânica após o término do efeito da droga. Uma única administração intravenosa de  $1 \times 10^6$  CMsMO, mostrou-se capaz de reverter a alodinia e normalizar o limiar nociceptivo mecânico até o fim do período experimental. O efeito antinociceptivo do tratamento foi

estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) 7 dias após o transplante, aumentando progressivamente até a normalização completa do limiar nociceptivo.

É interessante observar que a partir do 80º dia, nos camundongos com NDP tratados com salina ou gabapentina, houve aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) do limiar de nocicepção, caracterizando perda de sensibilidade. Importaneamente, esse fenômeno não foi observado nos animais tratados com CMsMO, os quais permaneceram com limiares semelhantes aos dos camundongos ETZ- até o fim do estudo.

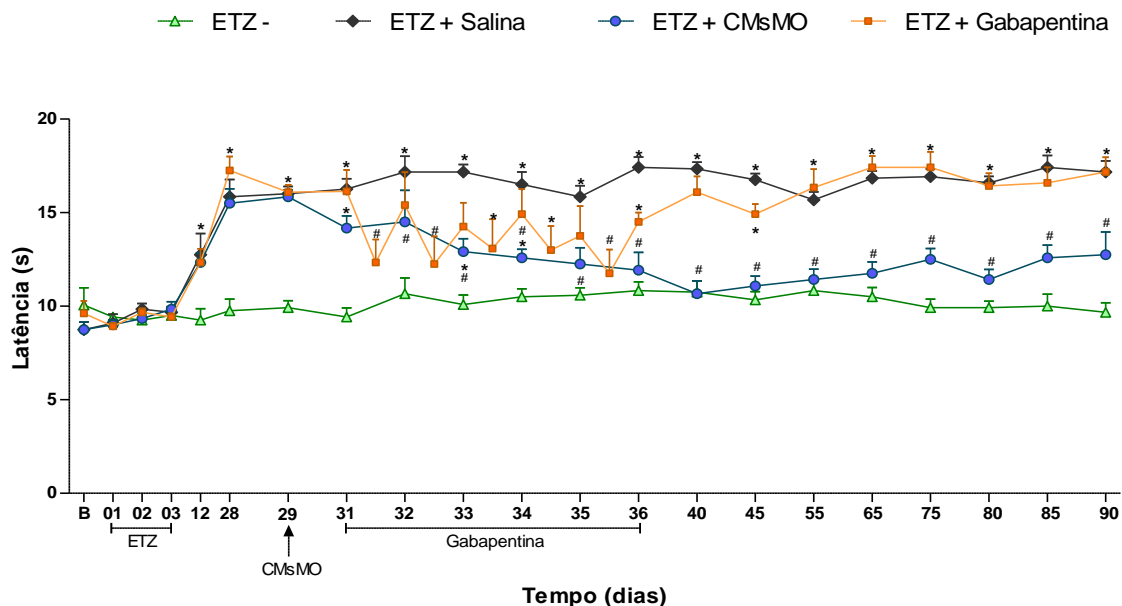


**Figura 6: Efeito do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos em modelo de neuropatia diabética periférica (NDP).** B – Representa o período antes da indução do modelo de diabetes. Os dias 01 a 03 correspondem ao período de indução do modelo de diabetes, pela administração diária de estreptozotocina (ETZ; grupos ETZ+). Animais tratados diariamente com salina nos dias 01 a 03 representam o grupo controle (ETZ-). A seta, no dia 29, indica o momento da administração endovenosa de CMsMO (ETZ+ CMsMO) ou salina (ETZ+salina). A gabapentina (30 mg/kg) foi administrada por via oral a cada 12h entre os dias 31 e 36. O eixo das ordenadas representa o limiar de nocicepção em gramas. Dados foram expressos como média e E.P.M;  $n = 6$  camundongos por grupo. \* significância estatística em relação à ETZ - ( $p < 0,001$ ). # significância estatística em relação à ETZ + salina ( $p < 0,001$ ). Teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.



## 5.6 LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO

O limiar de resposta a estímulo nociceptivo térmico foi avaliado com o objetivo de confirmar o desenvolvimento de NDP e avaliar os efeitos dos tratamentos. Os resultados estão apresentados na figura 7. Vinte e oito dias após a indução do modelo houve aumento do limiar de resposta a estímulo térmico ( $p < 0,001$ ), indicativo da perda de sensibilidade térmica, que caracteriza o desenvolvimento da NDP nesse modelo. A administração de CMsMO ( $1 \times 10^6$ ) (dia 29), mostrou-se eficaz na reversão da hipoalgesia térmica instalada. Apesar do início da reversão ter sido observado dois dias após o transplante ela tornou-se estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) a partir do 4º dia pós-transplante (dia 33). Após esse ponto, o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CMsMO manteve-se nos mesmos patamares de animais não neuropáticos durante todo o período experimental. O tratamento com gabapentina (30 mg/kg) duas vezes ao dia por seis dias consecutivos (31 até 36), induziu uma redução discreta da hipoalgesia instalada ( $p < 0,001$ ). Esse efeito foi observado apenas no período em que a droga permanecia ativa no organismo do animal.

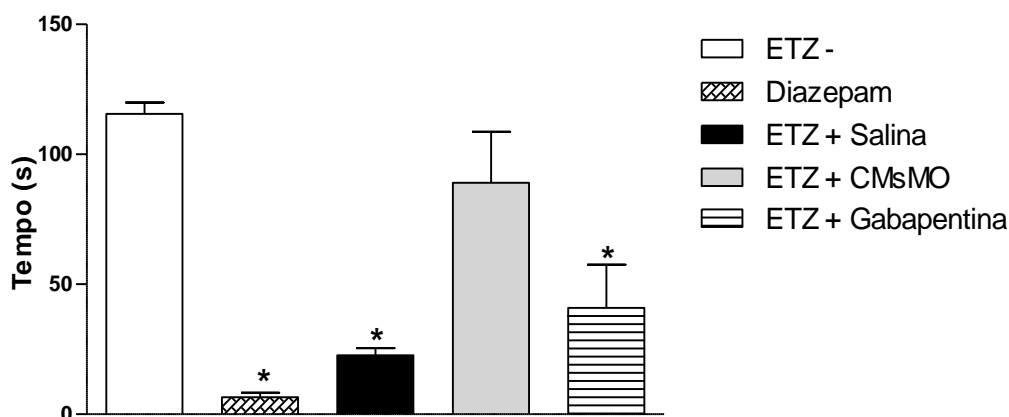


**Figura 7: Efeito do tratamento com células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de neuropatia diabética periférica (NDP).** B – Representa o período antes da indução do modelo experimental. Os dias 01 a 03 correspondem ao período de indução do modelo de diabetes, pela administração diária de estreptozotocina (ETZ; grupos ETZ+). Animais tratados diariamente com salina nos dias 01 a 03 correspondem ao grupo controle (ETZ-). A seta, no dia 29, indica o momento da administração endovenosa de CMsMO (ETZ+ CMsMO) ou salina (ETZ+salina). A gabapentina (30 mg/kg) foi administrada por via oral a cada 12h entre os dias 31 e 36. O eixo das ordenadas representa o tempo de latência em segundos para a retirada da pata. Dados foram expressos como média e E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. \* significância estatística em relação ao grupo ETZ - ( $p < 0,001$ ). #significância estatística em relação ao grupo ETZ + salina ( $p < 0,001$ ). Análise estatística determinada pelo teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

## 5.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

Visando avaliar se o transplante de CMsMO melhora a função motora de animais com NDPD, os mesmos foram submetidos ao teste de rota-rod no final do período experimental. A figura 8 mostra o tempo de permanência em segundos dos animais sobre a barra giratória. O diazepam foi utilizado como droga de referência em animais não neuropáticos, para fins de comparação. Como esperado, o diazepam (10 mg/kg/ip) induziu grande redução do tempo de permanência dos animais no rota-rod ( $p < 0,001$ ). Animais com NDPD também apresentaram redução do tempo de permanência no aparelho ( $p < 0,001$ ), indicando déficit motor. O transplante com CMsMO ( $1 \times 10^6$ ), foi capaz de reverter totalmente o déficit motor dos camundongos com NDPD. Por outro lado, o tratamento com gabapentina (30 mg/kg) duas vezes ao dia por

seis dias consecutivos, não foi capaz de promover melhora estatisticamente significativa na função motora de animais com NDPD.

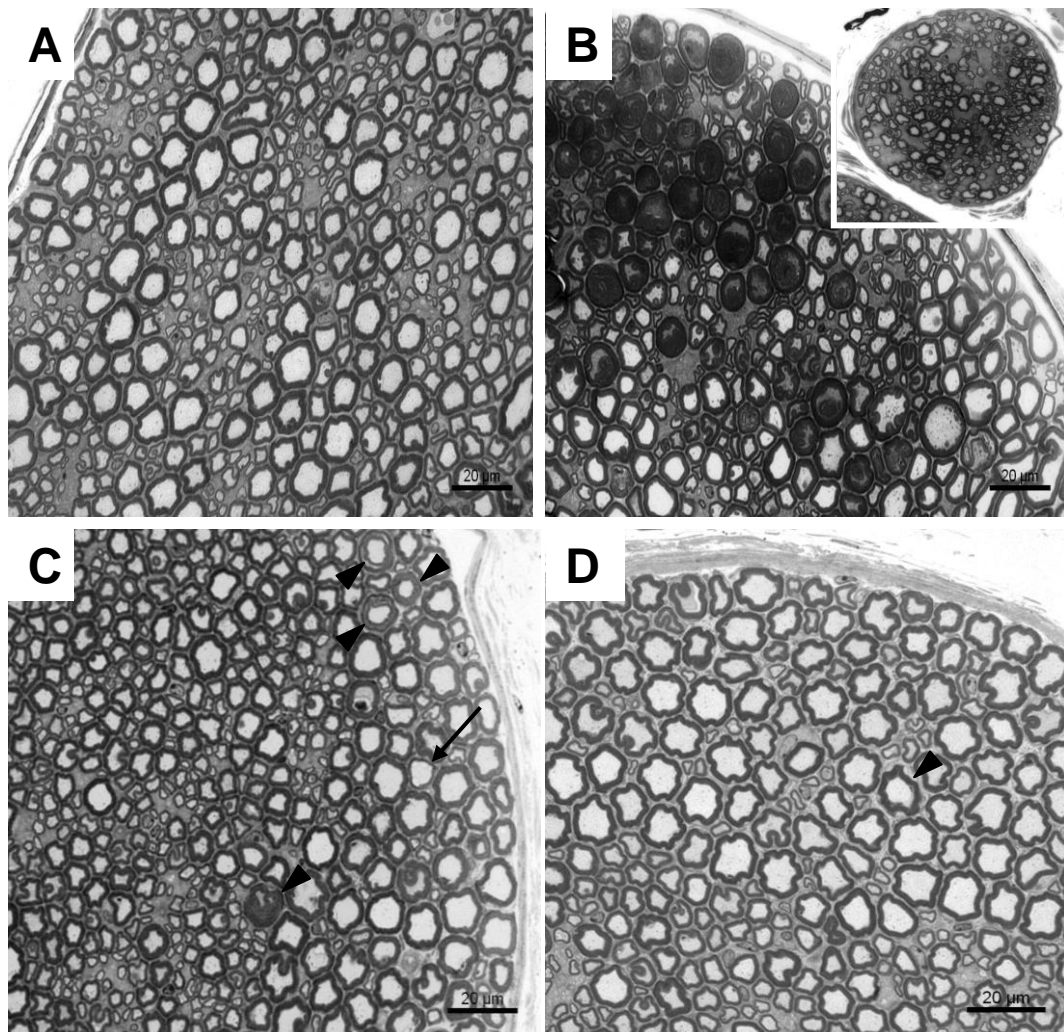


**Figura 8: Efeito do transplante de CMsMO sobre a função motora de camundongos em modelo de neuropatia diabética periférica no teste de rota-rod.** A avaliação do desempenho motor dos camundongos foi feita no fim do período experimental (90 dias). Para a indução do modelo experimental, a estreptozotocina (ETZ 80 mg/kg) foi administrada durante três dias consecutivos (grupos ETZ+). Animais tratados diariamente com salina correspondem ao grupo controle (ETZ-). No dia 29 após a indução do modelo os camundongos receberam administração endovenosa de CMsMO (ETZ+ CMsMO) ou salina (ETZ+salina). O diazepam (10 mg/Kg), administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes do teste, foi utilizado como droga de referência. Dados foram expressos como média do tempo em segundos de permanência do animal no rota-rod  $\pm$  EPM, de 06 animais por grupo. \* Significância estatística em relação ao grupo ETZ - ( $P < 0,001$ ), determinada pelo teste de One way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey.

## 5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CMSMO SOBRE A MORFOLOGIA DO NERVO ISQUIÁTICO

A análise histológica de cortes transversais de segmentos do nervo isquiático foi realizada no final do período experimental (90 dias). A figura 9A representa um nervo de aspecto morfológico normal (grupo ETZ -), nota-se a presença de fibras mielinizadas de calibres variáveis, contorno regular, bainhas de mielina íntegras e com espessura proporcional ao diâmetro dos respectivos axônios. No grupo ETZ + salina, observou-se a presença de fibras mielínicas de grosso calibre com atrofia axonal e retração da bainha mielina (figura 9B). Nota-se no *inset* da figura 9B, um feixe de fibras nervosas em menor aumento, apresentando axônios com diâmetros e espessuras da bainha de mielina aparentemente menores. A figura 9C representa o aspecto morfológico do nervo isquiático de animais ETZ tratados com gabapentina. Nota-se a presença de fibras mielínicas de grosso calibre com axônios atrofícos e afrouxamento da

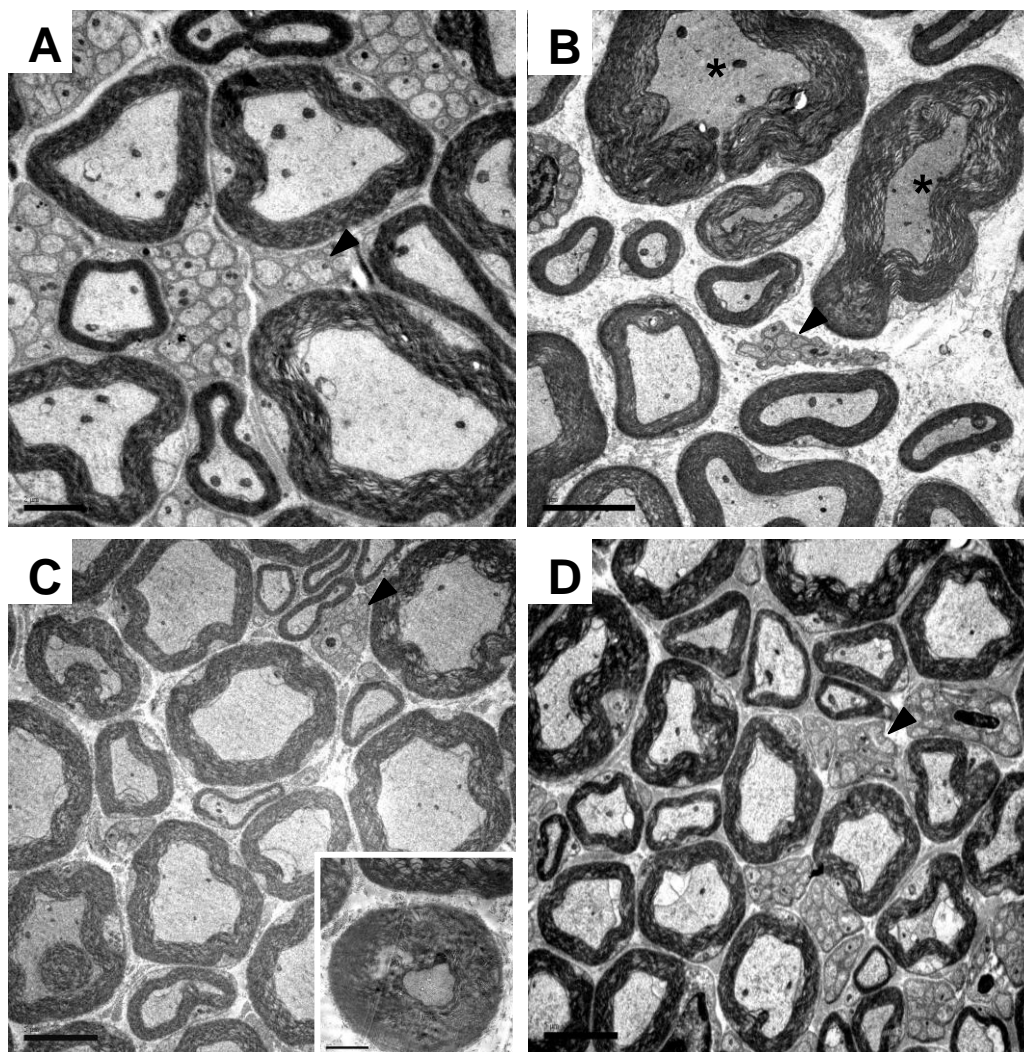
bainha de mielina, indicados nas pontas de setas e axônio de grosso calibre e camada de mielina delgada com característica sugestiva de remielinização (seta). Por fim, a figura 9D é uma fotomicrografia de corte transversal do nervo isquiático de um animal do grupo ETZ + CMsMO, evidenciando a presença de aparente processo atrófico em axônio mielinizado (ponta de seta) e fibras mielínicas de diferentes calibres e bainha de mielina íntegra.



**Figura 9: Fotomicrografias em corte transversal do nervo isquiático de camundongos.** A - Animal não-diabético com características morfológicas normais. B – Corte histológico do nervo isquiático representativo do grupo ETZ + salina, observa-se fibras mielínicas de grande calibre com atrofia axonal e bainha de mielina frouxa. *Inset* – Feixe de nervo isquiático em menor aumento com redução da densidade de fibras mielínicas de grande calibre. C – Fotomicrografia do nervo isquiático representativa do grupo ETZ + gabapentina, as pontas setas indicam atrofia axonal e bainha de mielina frouxa e a seta revela um axônio envolto por uma delgada camada de mielina. D – Corte transversal do nervo isquiático de camundongo do grupo ETZ + CMsMO, observa-se aparente processo atrófico em axônio (ponta de seta) e presença de fibras mielínicas de calibres diversos com características morfológicas normais. Coloração: azul de toluidina, barra = 20µm.

## 5.9 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO NERVO ISQUIÁTICO

A análise qualitativa dos aspectos ultraestruturais do nervo isquiático de camundongos, revelou com maiores detalhes as características descritas na avaliação histológica. A figura 10A indica uma eletromicrografia representativa do grupo ETZ –, com axônios das fibras mielínicas envoltos por uma bainha de mielina típica e com espessura relativa conforme aumenta o calibre da fibra. Nota-se também a presença de numerosas fibras amielínicas distribuídas homogeneamente no espaço endoneural. Na figura 10B, é observada a presença de fibras mielínicas de grande calibre em processo de atrofia axonal com afrouxamento da bainha de mielina, além de distribuição assimétrica e aparente diminuição de fibras amielínicas. A análise ultraestrutural do nervo isquiático de camundongos pertencentes ao grupo ETZ + gabapentina permitiu revelar a presença de atrofia axonal com bainha de mielina frouxa (figura 10C – *inset*) e poucas fibras amielínicas dispostas no espaço endoneural (figura 10C). Por ultimo, a avaliação qualitativa das características ultraestruturais de animais tratados com CMsMO revelou a presença de fibras mielínicas de tamanhos diversos e bainhas com calibre proporcional ao axônio circundante, além da presença de numerosas fibras amielínicas com distribuição homogênea (figura 10D).

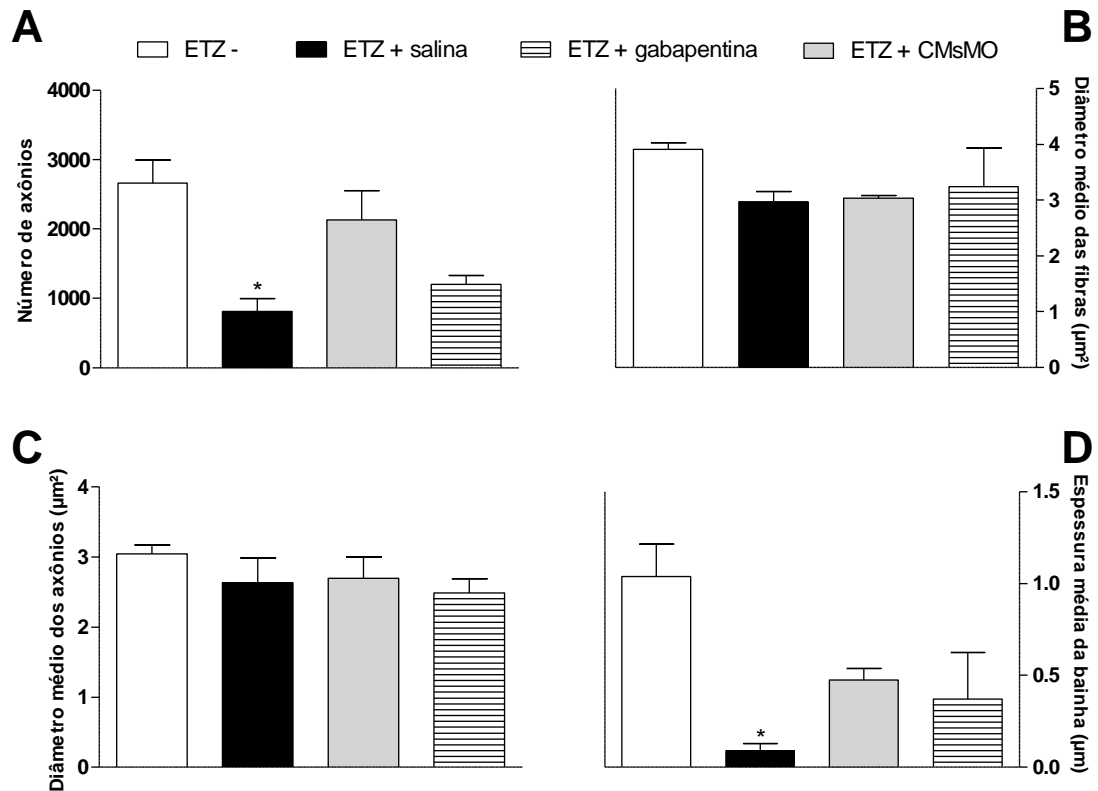


**Figura 10: Eletromicrografias representativas do nervo isquiático de camundongos dos diferentes grupos avaliados.** Na figura A (ETZ -), observa-se fibras mielínicas com tamanhos variados e camada de mielina proporcional, entre eles numerosas fibras amielínicas (barra = 2  $\mu$ m). B – Eletromicrografia representativa do grupo ETZ + salina com poucas fibras amielínicas (ponta de seta) e presença de axônios atróficos com bainha de mielina frouxa (\*). C – Eletromicrografia representativa do grupo ETZ + gabapentina com fibras mielínicas de tamanhos e calibres variados com fibras amielínicas escassas (ponta de seta). *Inset* – Axônio atrófico com bainha de mielina frouxa. D – Eletromicrografia representativa do grupo ETZ + CMsMO com fibras mielinizadas com bainha de mielina de diâmetros variados e presença de grande quantidade de fibras amielínicas (ponta de seta). Barra = 5 $\mu$ m.

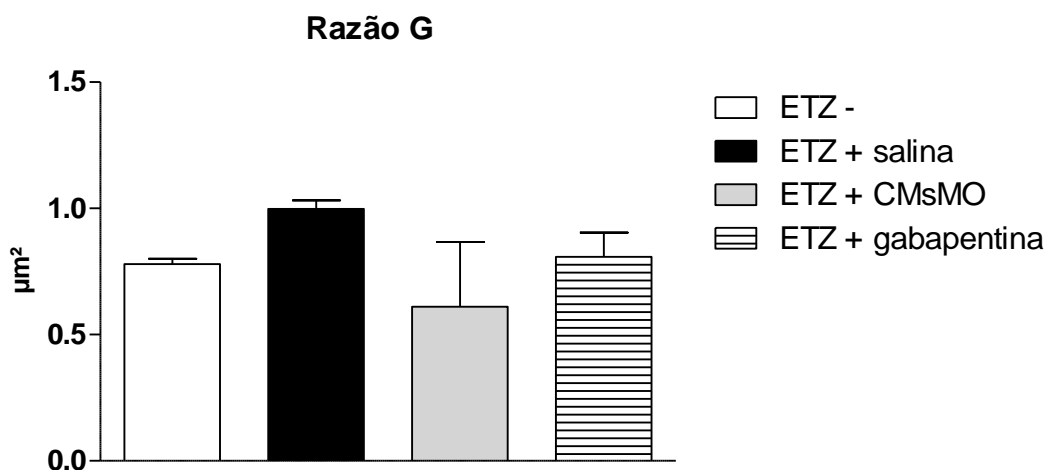
## 5.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO NERVO ISQUIÁTICO

Os dados referentes à análise morfométrica das fibras mielínicas do nervo isquiático de camundongos dos diferentes grupos experimentais estão representados nas figuras 11 à 13. Na figura 11 estão representados o número de axônios (painel A), o diâmetro médio das fibras mielínicas (painel B), o diâmetro médio dos axônios (painel C) e espessura média da bainha de mielina (painel D). Nervos isquiáticos de camundongos do grupo ETZ+salina apresentaram menor quantidade de axônios em relação ao grupo não-diabético (ETZ -,  $p < 0,05$ ), enquanto essa redução não foi observada em animais do grupo ETZ+CMsMO. Animais neuropáticos tratados com gabapentina apresentaram redução do número de axônios, que não foi estatisticamente significativa (figura 11A). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada com relação ao diâmetro médio das fibras mielínicas e ao diâmetro médio dos axônios (figuras 11B e C). Já o gráfico da espessura média da bainha de mielina (figura 11D), revela que os animais do grupo ETZ + salina apresentaram menor espessura da bainha de mielina quando comparados com o grupo ETZ - ( $p < 0,05$ ). Nos animais ETZ+ tratados com CMsMO ou gabapentina não foi observada redução estatisticamente significativa da espessura de mielina em relação ao grupo ETZ-. A figura 12, expressa o resultado da razão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da bainha de mielina, denominada razão G. Nenhuma diferença estatística foi identificada entre os grupos avaliados para esse parâmetro.

A análise da frequência, em porcentagem, dos diferentes diâmetros das fibras mielínicas está expressa na figura 13. Nota-se que os camundongos diabéticos que receberam salina (ETZ + salina) ou gabapentina (ETZ + gabapentina), apresentaram uma maior proporção de fibras mielinizadas finas, com cerca de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro ( $p < 0,001$ ) em relação aos não diabéticos (ETZ -). Nos camundongos diabéticos tratados com CMsMO não houve diferença estatística em relação ao grupo ETZ-.

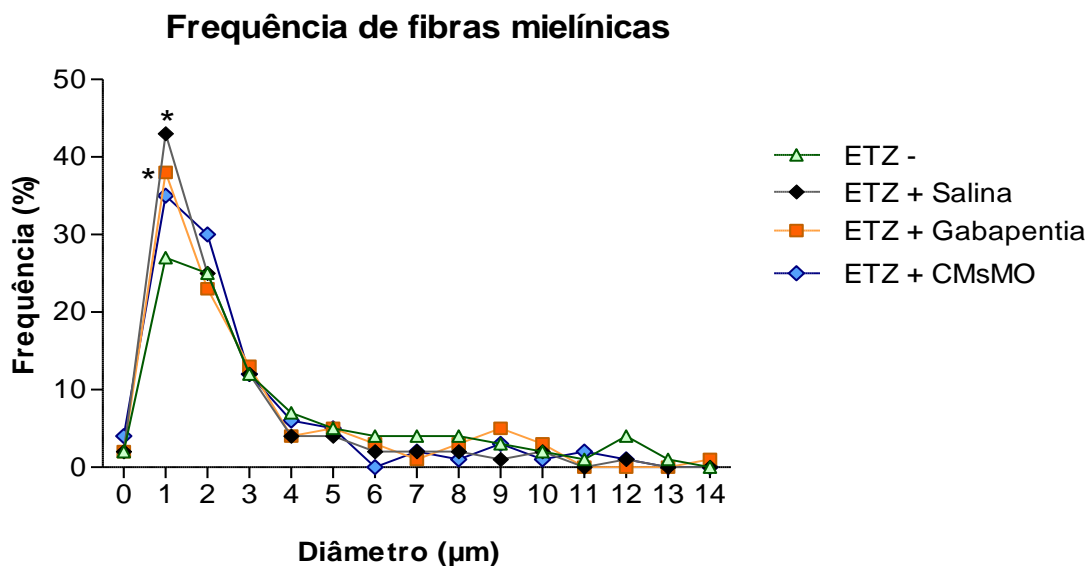


**Figura 11: Parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia diabética periférica.** Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 03$  animais. \* Significância estatística em relação ao grupo ETZ- ( $p < 0,05$ ). Análise estatística determinada pelo teste de Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunns.



**Figura 12: Valores médios da razão G do nervo isquiático de animais com neuropatia diabética periférica.** Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 03$  animais,  $p < 0,05$ . Análise estatística determinada pelo teste de Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunns.





**Figura 13: frequência em porcentagem do diâmetro de fibras mielínicas.** Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 03$  animais. \* Significância estatística em relação ao grupo ETZ- ( $p < 0,001$ ). Análise estatística determinada pelo teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

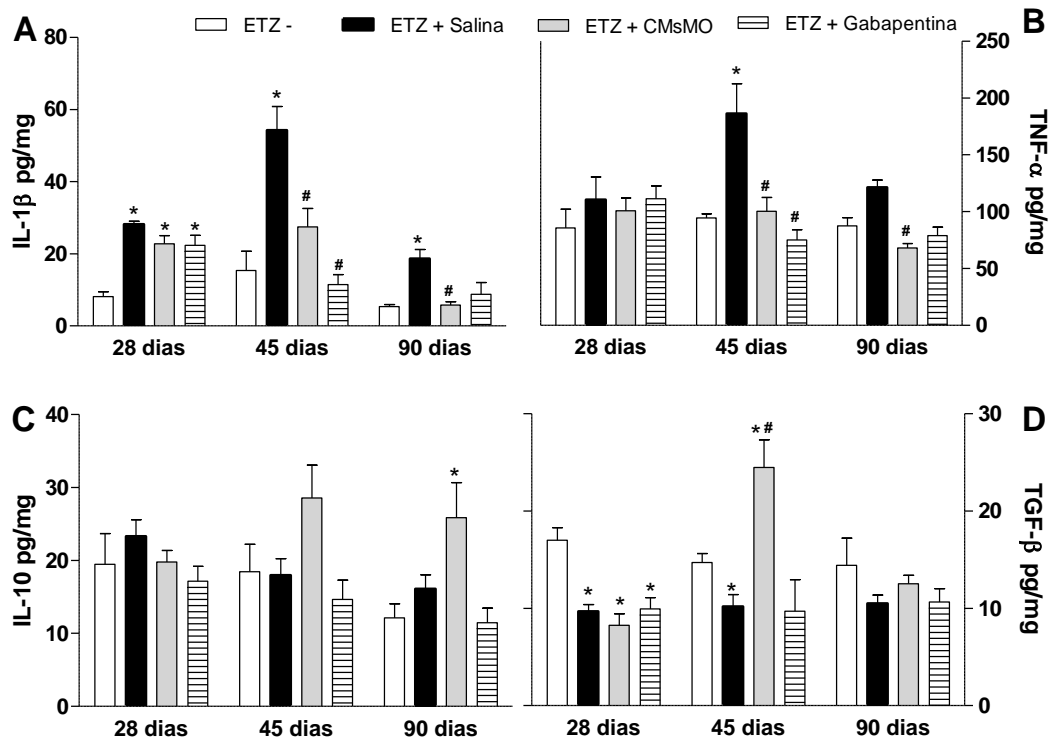
### 5.11 EFEITO DE CMSMO SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA MEDULA ESPINAL

Com o objetivo de avaliar se o tratamento com CMsMO exerce uma ação modificadora sobre o curso da neuropatia diabética, foi investigado o perfil de expressão de citocinas espinais, um importante fenômeno envolvido na manutenção da neuropatia. Os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  na medula espinal (L4-L5) foram avaliados antes e após o transplante de CMsMO, estando os resultados apresentados na figura 14.

Os resultados mostraram que animais neuropáticos exibiram níveis espinais mais elevados de IL-1 $\beta$ , em todos os tempos estudados, quando comparados aos animais não diabéticos ( $p < 0,01$ ). Os níveis espinais de IL-1 $\beta$  foram reduzidos e normalizados 15 e 60 dias, respectivamente, após o transplante de CMsMO em animais neuropáticos. A gabapentina reduziu os níveis espinais de IL-1 $\beta$  de modo estatisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) apenas 9 dias após sua administração (ponto de 45 dias). Os níveis de TNF- $\alpha$  na

medula espinal foram aumentados nos camundongos diabéticos no ponto de 45 dias ( $p < 0,001$ ). O tratamento com CMsMO produziu uma redução estatisticamente significativa de TNF- $\alpha$  na medula espinal 15 e 60 dias após o transplante, em comparação ao grupo ETZ+salina ( $p < 0,001$ ). Em contrapartida, o tratamento com gabapentina reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  apenas 9 dias pós-tratamento ( $p < 0,001$ ).

A dosagem de IL-10 mostrou que o transplante de CMsMO aumentou os níveis espinais dessa citocina em animais neuropáticos 60 dias após o transplante ( $p < 0,001$ ). O tratamento com gabapentina não modificou o padrão de IL-10. Em adição, animais neuropáticos exibiram níveis espinais mais baixos de TGF- $\beta$ , nos tempos de 28 e 45 dias após a indução do modelo, quando comparados aos animais controles ( $p < 0,01$ ). O transplante de CMsMO em animais neuropáticos aumentou os níveis dessa citocina 15 dias após o transplante ( $p < 0,001$ ). O tratamento com gabapentina não modificou os níveis de TGF- $\beta$ .



**Figura 14: Efeito de CMsMO sobre a expressão de citocinas no segmento L4-L5 da medula espinal de camundongos em modelo de neuropatia diabética periférica.** Dados foram expressos como média e E.P.M dos valores de picogramas de citocina por miligramas de proteína; n = 6 camundongos por grupo. As avaliações foram feitas nos tempos de 28 dias após a indução do modelo (antes do transplante), 45 dias após a indução do modelo (15 dias após o transplante), e 90 dias após a indução do modelo (60 dias após o transplante e no fim do período experimental). \* significância estatística em relação ao grupo ETZ - ( $p < 0,001$ ). # significância estatística em relação ao grupo ETZ + salina ( $p < 0,001$ ). Teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos o potencial terapêutico do transplante de células mesenquimais derivadas da medula óssea em modelo experimental de neuropatia diabética periférica. Uma única administração sistêmica de CMsMO foi capaz de normalizar as alterações de sensibilidade mecânica e térmica, características da NDP, além de promover melhora da função motora e modificar o padrão de expressão de citocinas na medula espinal. Em adição, o transplante foi capaz de reduzir as alterações morfológicas no nervo isquiático, indicando o potencial reparador dessa terapia em condições de neuropatia.

Cerca de 40% dos indivíduos com NDP apresentam dor espontânea e alodinia mecânica (VINIK et al., 2008; BASTYR et al., 2005). Do mesmo modo, alodinia mecânica também tem sido identificada em modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina (DREL et al., 2007a; DREL et al., 2007b; OBROSOVA et al., 2008; VARENIUK et al., 2008). De fato, no presente estudo observamos que apenas 24 horas após a administração da estreptozotocina, uma nítida alodinia mecânica se instalou nos animais diabéticos, confirmando o desenvolvimento da neuropatia. Por outro lado, pacientes com NDP avançada apresentam perda da percepção sensorial, que está intimamente relacionada com os casos de ulcerações e amputações de membros (ELDOR et al., 2004; PRADHAN et al., 2009; OBROSOVA, 2009). Neste sentido, o acompanhamento da sensibilidade mecânica dos animais diabéticos por noventa dias permitiu detectar que, por volta do 75º dia após a indução do modelo, a alodinia mecânica inicial deu lugar a uma perda de sensibilidade tátil, evidenciada pelo drástico aumento do limiar nociceptivo mecânico a valores acima dos basais. Além disso, em conjunto com a hipoalgesia mecânica, pacientes com NDP avançada relatam também a perda da sensibilidade ao estímulo térmico (DYCK et al., 2000). No presente estudo, 12 dias após a indução do modelo experimental de diabetes, os animais apresentaram marcada hipoalgesia térmica. Esses resultados reforçam a adequação do modelo experimental utilizado para o estudo da neuropatia. De acordo com Obrosova et al., (2008), a capacidade de gerar um quadro hiperglicêmico em roedores por um longo período de tempo, faz deste modelo de diabetes, um

dos melhores para avaliar a hipoalgesia térmica e mecânica, característicos da NDP avançada.

Tendo sido estabelecido o perfil de sensibilidade mecânica e térmica dos animais neuropáticos no modelo experimental escolhido, o transplante de CMsMO foi realizado quatro semanas após a indução do modelo. Esse tempo foi estabelecido para o tratamento, pois é considerado na literatura como um momento em que as alterações da neuropatia diabética já estão instaladas (MCGUIRE et al., 2009; GUILFORD; RYOLS; WRIGHT, 2011; WATERMAN et al., 2012). Diferentemente dos resultados obtidos com a gabapentina, um único transplante de CMsMO, proporcionou melhora progressiva e duradoura da sensibilidade térmica e mecânica de animais neuropáticos. A completa normalização dos limiares nociceptivos mecânico e térmico foi observada 16 e 6 dias, respectivamente, após o transplante, mantendo-se nesses níveis até o fim do período experimental. De modo similar, estudos anteriores com células mesenquimais já haviam detectado melhora da sensibilidade térmica e mecânica de roedores diabéticos (SHIBATA et al., 2008; WATERMAN et al., 2012). Porém, a comparação do efeito das CMsMO com o fármaco de referencia utilizado na terapêutica da dor neuropática de origem diabética ainda precisava ser investigada. O tratamento diário com gabapentina contribuiu apenas de forma transitória e discreta para a normalização dos limiares nociceptivos dos animais neuropáticos. Esta possui um papel bem estabelecido no controle da dor crônica em pacientes com neuropatia diabética, com modesta eficácia no alívio da dor e ação dose-dependente, responsável por produzir efeitos colaterais como tonturas, sonolência, fadiga e ganho de peso, os quais dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento (BACKONJA et al., 1998; TURAN et al., 2006, TURK, WILSON, COHANA, 2011).

Adicionalmente, tem sido demonstrado que ratos hiperglicêmicos, além de possuírem alterações sensitivas comportamentais, também apresentam déficit da função motora (ABRAHAM; PAUL; PAULOSE, 2010). De fato, observamos que o desempenho dos animais neuropáticos no teste de rota-rod foi comprometido em relação ao dos animais não neuropáticos. Diferentemente dos resultados obtidos com a gabapentina, neste estudo conseguimos demonstrar em primeira mão que o transplante de CMsMO normalizou o

desempenho motor dos animais neuropáticos, indicando que o benefício desse tratamento abrange diferentes parâmetros de neuropatia.

Muitos e variados mecanismos têm sido propostos para explicar as alterações de sensibilidade e alodinia característicos de neuropatia diabética. Entre eles, as alterações morfológicas e funcionais das fibras nociceptivas, C e A $\delta$ , presentes nos nervos sensoriais periféricos. Para tentar explicar o desenvolvimento da hipoalgesia no diabetes, vários autores demonstraram que a manutenção da hiperglicemia não controlada por um longo período, é capaz de provocar lesões irreversíveis nos nervos sensoriais de camundongos, gerando déficit na transmissão da informação nervosa pelas fibras sensoriais e perda da sensibilidade ao estímulo doloroso (SEGAUDO-ROUSSEL et al., 2007; LENNERTZ et al., 2011; PATEL; UDAYABANU, 2013). Dessa forma, no presente estudo, alterações morfológicas no nervo isquiático de camundongos neuropáticos foram investigadas, assim como os efeitos do transplante de CMsMO sobre essas alterações. Demonstramos aqui, a partir da avaliação morfológica e morfométrica do nervo isquiático, diferenças significantes entre os nervos de animais diabéticos e de animais controle. Animais diabéticos apresentaram atrofia axonal, alteração na quantidade e/ou distribuição de fibras amielínicas no espaço endoneural, diminuição do número de fibras mielínicas grossas, redução da espessura da bainha de mielina e maior percentual de fibras mielínicas finas (A $\delta$ ). A presença de atrofia axonal juntamente com afrouxamento da bainha de mielina foi mais evidente em fibras de grosso calibre. Isso sugere que as fibras do tipo A $\beta$ , responsáveis pela transmissão de estímulos táteis, são mais susceptíveis a lesão provocada pela hiperglicemia. Em adição, a aparente redução de fibras amielínicas, fibras nociceptivas polimodais tipo C, pode possuir relação com a perda de sensibilidade térmica e mecânica observada na avaliação comportamental. Corroborando nossos dados, Lennertz e colaboradores (2011), verificaram em modelo experimental de diabetes, redução do número de fibras sensoriais e diminuição de sua função, resultando em hiposensibilidade comportamental térmica e mecânica em camundongos diabéticos há 6 e 8 semanas. A indução dessas alterações morfológicas e funcionais poderia explicar o aparecimento da hipoalgesia térmica descrita no presente trabalho, sugerindo ainda que as fibras

amielínicas são as primeiras a serem afetadas pela hiperglicemia, considerando que a redução de sensibilidade mecânica foi mais tardia.

Shibata et al. (2008) reportou em seus experimentos, que a injeção de CMsMO no músculo esquelético de camundongos com neuropatia diabética foi capaz de aumentar a circularidade axonal das fibras mielínicas do nervo sural. Embora estudos morfológicos do nervo isquiático tenham sido realizados em modelos experimentais de neuropatia diabética (FAZAN et al., 2010; NISHIDA et al., 2013; SHI et al., 2013), até o presente momento não há informações disponíveis sobre os efeitos do tratamento sistêmico com células-tronco sobre estes parâmetros no nervo periférico. No presente estudo demonstramos, pela primeira vez, que o tratamento com CMsMO foi capaz de reduzir as alterações morfológicas encontradas no nervo isquiático de animais diabéticos. Camundongos diabéticos tratados com CMsMO apresentaram fibras amielínicas distribuídas no espaço endoneural, fibras mielínicas de calibres variados e aspectos morfológicos normais. Esses resultados podem justificar os efeitos observados sobre a sensibilidade mecânica e térmica, pois uma única administração de CMsMO produziu normalização dos limiares nociceptivos durante todo o período experimental. Reforçando essa idéia, o tratamento diário com gabapentina, que produziu um efeito transitório sobre os limiares nociceptivos, não modificou o padrão morfológico do nervo. Dessa forma, esses resultados podem indicar que o tratamento com CMsMO pode constituir uma abordagem mais efetiva para o controle da neuropatia, por interferir no padrão de alterações associadas à doença.

De acordo com Xu et al. (2002), muitos aspectos envolvidos na comunicação célula de Schwann-axônio estão comprometidos na neuropatia diabética, o que resulta em degeneração axonal. Dentre eles, o aumento do metabolismo da glicose por vias alternativas como a via dos polióis, que provoca acúmulo de sorbitol, responsável por gerar distúrbios hiperosmóticos comprometendo a homeostase celular, e o mau funcionamento da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase. Em adição, a formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs), a ativação da via DAG/PKC e o estresse oxidativo desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular que promove a ativação de NF- $\kappa$ B e a

transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (SIMA, 2001; SIMMONS; FELDMAN, 2002; BROWNLE, 2005 e GOLDIN, et al., 2006).

De fato, a contribuição de citocinas nas alterações de sensibilidade observadas na neuropatia diabética tem ganhado destaque nos últimos anos (TOTH et al., 2010; MORGADO et al., 2011; WANG; COUTURE; HUONG, 2014). Em pacientes diabéticos, a hiperglicemia persistente gera um processo inflamatório crônico de baixo grau com a liberação de citocinas, as quais desencadeiam e modulam a alodinia e a hiperalgesia associadas à neuropatia diabética (VINCENT et al., 2011, DEL REY et al., 2012). Do mesmo modo, estudos com modelos experimentais fornecem dados que reforçam a hipótese do papel das citocinas espinais nos mecanismos de dor neuropática (SWEITZER; MARTIN; DELEO, 2001; KIM et al., 2007; KIM et al., 2010). Kawasaki e colaboradores (2008) demonstraram que a ativação das células gliais na medula espinal pode liberar citocinas pró-inflamatórias, as quais irão iniciar uma cascata de transdução de sinal e a liberação de neurotransmissores excitatórios facilitando a transmissão da dor. Além disso, animais *knockout* para NF- $\kappa$ B não desenvolvem alodinia mecânica em modelo experimental de diabetes, sugerindo que a ativação deste fator de transcrição e conseguinte liberação de substâncias pró-inflamatórias participam diretamente do desenvolvimento da dor neuropática (BERTI-MATERA et al., 2008). Considerando o papel determinante das citocinas na fisiopatologia da neuropatia, após a avaliação do efeito de CMsMO sobre as manifestações comportamentais e alterações morfológicas da neuropatia, o presente trabalho buscou averiguar o efeito da terapia celular sobre o padrão de expressão de citocinas na medula espinal dos camundongos neuropáticos. Dados de ELISA demonstraram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , na medula espinal de camundongos neuropáticos em relação aos não neuropáticos. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura que já demonstraram aumento espinal de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em animais diabéticos (LEDEBOER et al., 2005; PABREJA et al., 2011). Em roedores neuropáticos tratados com CMsMO observou-se uma redução dos níveis espinais de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que persistiu até o fim do período experimental. Já o tratamento com gabapentina induziu uma redução transitória dos níveis dessas citocinas na



medula. Thacker et al., (2007), demonstraram que a liberação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na medula espinal provoca o acúmulo de radicais livres, ativação de COX-2 e iNOS, com conseguinte liberação de prostaglandinas e óxido nítrico, que são mediadores envolvidos na sensibilização central e dor neuropática. De acordo com essa idéia, a redução dos níveis espinais de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em animais diabéticos pode contribuir para os efeitos benéficos das CMsMO nos distúrbios de sensibilidade descritos no presente trabalho.

O efeito inibitório de CMsMO sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias foi previamente relatado. Siniscalco et al. (2010) demonstraram em modelo de ligadura do nervo isquiático que células-tronco mesenquimais injetadas no ventrículo lateral do cérebro de camundongos foram capazes de inibir a expressão do gene da interleucina - 1 $\beta$ . Nesse trabalho, os autores sugeriram que as células-tronco mesenquimais atuam na neuropatia promovendo a regeneração das interações entre tecido neural e glia via efeito parácrino, ou seja, através da liberação de citocinas anti-inflamatórias, que limitam a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios. Mais tarde, em 2012 Waterman e colaboradores reforçaram esta idéia, ao usarem células mesenquimais geneticamente modificadas para superexpressão de fatores anti-inflamatórios, eles perceberam que estas células modificadas foram capazes de reduzir fortemente os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias de camundongos com neuropatia diabética, evidenciando sua ação parácrina.

Em linha com esses estudos, demonstramos que o transplante de CMsMO induz aumento espinal das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ , nos animais neuropáticos. Já o tratamento com gabapentina não modificou o padrão de expressão dessas citocinas. A contribuição de IL-10 para os efeitos terapêuticos de células mesenquimais tem sido proposta. Em 2005, Lyushnenkova e colaboradores demonstraram que células-tronco mesenquimais exercem efeito imunossupressor através da produção de fatores solúveis como IL-10. A partir de então, a contribuição dessa citocina para os efeitos terapêuticos das células-tronco tem sido amplamente demonstrada em diferentes modelos experimentais (NEMETH et al., 2009; LIU et al., 2009; LI et al., 2010). As propriedades neuroprotetoras das células mesenquimais também têm sido associadas a IL-10. Há bastante tempo já se tem descrito que a ação

conjunta de TGF- $\beta$  e IL-10 inibe a resposta imunológica no sistema nervoso central, através da regulação da microglia, impedindo sua ativação e desencadeamento da inflamação (LODGE; SRIRAM, 1996). Além disso, IL-10 induz o aumento de TGF- $\beta$  e estimula a regeneração axonal exercendo ação neuroprotetora (WALSH e MIDHA, 2009). Creange et al. (1997) demonstraram que após axotomia, citocinas neuroprotetoras como IL-6 e TGF- $\beta$  são superexpressas e promovem o crescimento axonal e restabelecimento das conexões com as células de Schwann. A IL-10 é conhecida por diminuir os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (FIORENTINO et al., 1991). Em pesquisas com células-tronco, cientistas encontraram níveis elevados desta interleucina no soro e medula espinal de camundongos com dor neuropática por lesão do nervo isquiático ou de origem diabética, e atribuíram a redução do processo doloroso a sua ação sobre tais citocinas pró-inflamatórias. (SINISCALCO et al., 2011; WATERMAN et al., 2012). Assim, como demonstrado, é possível que o benefício promovido pela terapia celular na neuropatia diabética tenha a IL-10 como protagonista da modulação de fatores inflamatórios e consequente melhora da sensibilidade.

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que uma única injeção de CMsMO foi capaz de promover reversão das complicações sensitivas e motoras evocadas pelo diabetes, além de modificar o padrão espinal de expressão de citocinas e promover redução das alterações morfológicas no nervo periférico. Vale salientar que nenhum medicamento atualmente disponível para o controle da neuropatia diabética exibe tal perfil de efeitos, o que foi evidenciado também com os resultados da gabapentina, apresentados no presente estudo. Esse trabalho reforça a necessidade e a importância de novas investigações sobre o tema ao passo que aponta uma alternativa de grande potencial para o tratamento das complicações que afetam os nervos periféricos dos diabéticos.

## 7 CONCLUSÕES

Através dos resultados apresentados e analisados neste trabalho, conclui-se que:

- Um único transplante de CMsMO foi capaz de melhorar de forma progressiva e duradoura as alterações da sensibilidade térmica e mecânica da neuropatia diabética, além de normalizar o desempenho motor dos camundongos neuropáticos;
- O tratamento diário com gabapentina contribuiu apenas de forma transitória e discreta para a normalização dos limiares nociceptivos dos animais neuropáticos.
- As CMsMO foram capazes de reduzir as alterações morfológicas e morfométricas encontradas no nervo isquiático de animais diabéticos;
- O transplante de CMsMO induziu aumento espinal das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  e redução de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  até o final do período experimental.

## 8 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M. E.; HOSSEINI, A. Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives oxidative. **Oxid. Med. and Cell. Long.**, p. 01-15, 2013.

ABRAHAM, P. M.; PAUL, J.; PAULOSE, C. S. Down regulation of cerebellar serotonergic receptors in streptozotocin induced diabetic rats: Effect of pyridoxine and aegle marmelose. **Brain Res. Bull.**, v. 82, p. 87-94, 2010.

ANDERSEN, M. L.; et al. S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. **Unifesp**, v. 1, p. 167, 2004.

AKIYAMA, Y. et al. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow strom. **J. Neurosc.**, v. 22, n. 15, p. 6623-6630, 2002.

AL-RUBEAN, K. et al. Diabetic nephropathy and its risk factors in a society with a type 2 diabetes epidemic: a saudi national diabetes registry-based study. **PLoS ONE**, v. 9, fev. 2014.

BACKONJA, M. et al. Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 280, p. 1831-1836, 1998.

BALL, M. L. et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. **Blood**, v.110, p. 2764–2767, 2007.

BASTYR, E. J.; PRICE, K. L.; BRIL, V. The MBBQ study group. Development and validity testing of the neuropathy total symptom score-6: questionnaire for the study of sensory symptoms of diabetic peripheral neuropathy. **Clin. Ther.**, v. 27, p. 1278-1294, 2005.

BERTI-MATTERA, L.N. et al. Sulfasalazine blocks the development of tactile allodynia in diabetic rats. **Diabetes**, v. 57, p. 2801-2808, 2008.

BISHNOI, M. et al. Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. **Molecular Pain**, v. 7, p. 52, 2011.

BOULTON, A.J. et al. Diabetic somatic neuropathies. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1458-1486, 2004.

BOULTON, A. J. et al. American Diabetes Association Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, p. 4.956-4962, 2005.

BRAGA, L.M.M. et al., In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction. **J. Biomed. Sci.**, v. 15(3), p. 365-74, 2008.

BROWNLE, M. the pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 56, p.1615-25, 2005.

BURDON et al., Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: Current perspectives and therapeutic potencial. **Bone Marrow Research**, v. 2011, p. 01-14, 2011.

CANDRILLI SD, DAVIS KL, KAN HJ, LUCERO MA, ROUSCULP MD. Prevalence and the associated burden of illness of symptoms of diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. **J. Diabetes Complications**, v. 21, p. 306 – 314, 2007.

CHAPLAN, S.R. BACH, F.W. POGREL, J.W. CHUNG, J.M. YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J. Neurosci. Methods**, v. 53, p. 55– 63, 1994.

CHOPP, M. & LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurology**, v. 1, p. 92-100, 2002.

CHRISTIANSON, J.A. RYALS, J.M. MCCARSON, K.E. WRIGHT, D.E. Beneficial actions of neurotrophin treatment on diabetes-induced hypoalgesia in mice, **Journal of Pain**, v. 4, p.493–504, 2003.

CORRÊA-GIANNELLA e VIEIRA. Genética das Complicações Microvasculares no DM1. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 52, fev. 2008.

CREANGE, A. BARLOVATZ-MEIMON, G. GHERARDI, R. K. Cytokines and peripheral nerve disorders. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 8, p. 145–151, 1997.

DEL REY, A. APKARIAN, A.V. MARTINA, M. BESEDOVSKY, H.O. Chronic neuropathic pain-like behavior and brain-borne IL-1 $\beta$ . **Ann. NY Acad. Sci.** v. 1262, p. 101-107, 2012.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8(4), p. 315-7, 2006.

DREL, V.R. PACHER, P. VARENIUK, I. et al. Evaluation of the peroxynitrite decomposition catalyst Fe(III) tetra-mesitylporphyrin octasulfonate on peripheral neuropathy in a mouse model of type 1 diabetes. **Int. J. Mol. Med.**, v. 20, p.783–792, 2007(a).

DREL, V.R. PACHER, P. VARENIUK, I. et al. A peroxy nitrite decomposition catalyst counteracts sensory neuropathy in streptozotocin-diabetic mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 569, p. 48–58, 2007(b).

DYCK, P. J.; DYCK, P. J.; LARSON, T. S.; O'BRIEN, P. C.; VELOSA, J. A. Patterns of quantitative sensation testing of hypoesthesia and hyperalgesia are predictive of diabetic polyneuropathy: a study of three cohorts. Nerve Growth Factor Study Group. **Diabetes Care**, v.23, p. 510–517, 2000.

EDWARDS, et al., Diabetic neuropathy: mechanisms to management. **Pharmacol. Ther.**, v. 120, p. 01 – 34. 2008.

EGLITIS, M. A. & MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, p. 4080-4085, 1997.

ELDOR, R. RAZ, I. BEN YEHUDA, A. BOULTON, A.J. New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies. **Diabet. Med.**, v. 21, p. 1161–1173, 2004.

ELSNER M, GULDBAKKE B, TIEDGE M, MUNDAY R, LENZEN S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**, v. 43(12), p. 1528-1533, 2000.

FAZAN, V. P. S. VASCONCELOS, C. A. C. VALENÇA, M. M. NESSLER, R. MOORE, K. C. Diabetic Peripheral Neuropathies: A Morphometric Overview. **Int. J. Morphol.**, v. 28, p. 51-64, 2010.

FEHER, G. et al., Diabetic Neuropathies: Diagnosis and Management. **Neuroendocrinology**, v. 98, p. 267-280. 2013.

FIORENTINO, D. F. ZLOTNIK, A. MOSMANN, T. R. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 147, p. 3815–3822, 1991.

FRICKER, B. MULLER, A. RENÉ, F. Evaluation Tools and Animal Models of Peripheral Neuropathies. **Neurodegenerative Dis.**, v. 5, p. 72–108, 2008.

GALVÃO, A. C. R. Dor neuropática: Tratamento com anticonvulsivantes. **Segmento Farma**, 2005.

GERDONI, E. et al., Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Ann. Neurol.**, v. 61, p. 219–227, 2007.

GOLDIN, B. A. A. BECKMAN, J. A. SCHIMIDT, A. M. CREAGER, M. A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v.114, p. 597-605, 2006.

GREENNE, D. A.; AREZZO, J. C.; BROWN, M. B. Diabetic neuropathy: scope of the syndrome. **The Am. J. of Med.**, v. 107, p.25-85, 1999.

GNECCHI, M. HE, H. LIANG, O. D. et al., Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Aktmodified mesenchymal stem cells, **Nature Medicine**, v. 11, p. 367–368, 2005.

GNECCHI, M. HE, H. NOISEUX, N. et al., Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement, **FASEB Journal**, v. 20, p. 661–669, 2006.

GNECCHI, M. ZHANG, Z. NI, A. DZAU, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy, **Circulation Research**, v. 103, p. 1204–1219, 2008.

GUILFORD, B. L. RYALS, J. M. WRIGHT, D. E. Phenotypic Changes in Diabetic Neuropathy Induced by a High-Fat Diet in Diabetic C57Bl/6 Mice. **Exp. Diab. Res.**, v. 2011, p. 01-14, 2011.

GUIMARÃES, E.T. CRUZ, G.S. ALMEIDA, T.F. SOUZA, B.S.F. KANETO, C.M. VASCONCELOS, J.F. SANTOS, W.L.C. SANTOS, R.R. VILLARREAL, C.F. SOARES, M.B.P. Transplantation of Stem Cells Obtained from Murine Dental Pulp Improves Pancreatic Damage, Renal Function and Painful Diabetic Neuropathy in Diabetic Type 1 Mouse Model. **Cell Trasplantation**, v. 22(12), p. 2345-2354, 2013.

HANNA, J. WERNIG, M. MARKOULAKI, S. et al., Treatment of sickle cell anemia model with iPS cell generated from autologous skin. **Science**, v. 318, p. 1920-1923, 2007.

HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, FLORES C, JORIS J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32(1), p. 77-88, 1988.

HAYASHI et al., Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons functions in parkinsonian macaques. **J. Clin. Investigate**, v. 123, p. 272-285, 2013.

HOFSTETTER, C. P.; SCHWARZ, E. J.; HESS, D. et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99(4), p. 2199-2204, 2002.

I.D.F. International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas**, Ed. 6, 2013.

JEONG, et al., Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. **Journal of the American heart association - Circulation**, v. 119, p. 699-708, 2009.

KANETO, H. KAWAMORI, D. MATSUOKA, T.A. KAJIMOTO, Y. YAMASAKI, Y. Oxidative stress and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. **Am. J. Ther.**, v.12, p. 529-533, 2005.

KAWASAKI, Y. XU, Z.Z. WANG, X. PARK, J.Y. ZHUANG, Z.Y. TAN, P.H. GAO, Y.J. ROY, K. CORFAS, G. LO, E.H. et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. **Nat Med.** v. 14, p. 331-336, 2008.

KAWASAKI, Y. ZHANG, L. CHENG, J. K. JI, R. R. Cytokine mechanisms of central sensitization: Distinct and overlapping role of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 5189–5194, 2008.

KIM, D. et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. **J. Biol. Chem.** v. 282, p. 14975–14983, 2007.

KIM et al., NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. **PNAS**, v. 107, p. 14851-14856, 2010.

KURIBARA, H. HIGUCHI, Y. TAKADORO, S. Effects of central depressants on rotarod and traction performances in mice. **J. Pharmacol.**, v. 27, p. 117 - 126, 1977.

LAFLAMME, M. A. ZBINDEN, S. EPSTEIN, S. E. MURRY, C. E. Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. **Annual Review of Pathology**, v. 2, p. 307–339, 2007

LEDEBOER, A. et al., Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 115, p. 71–83, 2005.

LENNERTZ, R.C. MEDLER, K.A. BAIN, J.L. WRIGHT, D.E. STUCKY, C.L. Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetic neuropathy, **J. Neurophysiol.**, v. 106, p. 905-914, 2011.

LIAO, R. PFISTER, O. JAIN, M. MOUQUET, F. The bone marrow-cardiac axis of myocardial regeneration. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 50, p. 18–30, 2007

LI, J. ZHU, H. LIU, Y. et al. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in *Macaca Fascicularis*. **Brain Research**, epub ahead of print, 2010.



LIU, N. CHEN, R. DU, H. et al. Expression of IL-10 and TNF-alpha in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells. **Cell Molecular Immunology**, v. 6, p. 207-213, 2009.

LIU L, JIAO J, WANG Y, WU J, et al. TGF-beta1 Gene Polymorphism in Association with Diabetic Retinopathy Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 9, abr. 2014.

LODGE, P.A. SRIRAM, S. Regulation of microglial activation by TGF- $\beta$ , IL-10, and CSF-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, p. 502-508, 1996.

LYUSHNENKOVA, E. MOSCA, J.D. ZERNETKINA, V. MAJUMDAR, M.D. BEGGS, K.J. SIMONETTI, D.W. et al. T cell responses to allogenic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance and suppression. **J. Biomed. Sci.**, v. 12, p. 47-57, 2005.

KLASS, M. GAVRIKOV, V.DRURY, D. STEWART, B. HUNTER, S. DENSON, D. D. HORD, A. CSETE, M. Intravenous Mononuclear Marrow Cells Reverse Neuropathic Pain from Experimental Mononeuropathy. **International Anesthesia Research Society**, v. 104, n. 4, 04/2007.

MASTRI, M. LIN, H. LEE, T. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. **World J. Stem cell**, v. 6, p. 82-93, 2014.

MCGUIRE, J. F. ROUEN, S. SIEGFREID, E. WRIGHT, D. E. DOBROWSKY, R.T. Caveolin-1 and altered neuregulin signaling contribute to the pathophysiological progression of diabetic peripheral neuropathy, **Diabetes**, v. 58, p. 2677–2686, 2009.

MCKAY R. Stem cells in the central nervous system. **Science**, v. 276, p. 66–71, 1997.

MCMAHON, S.B. & MALCANGIO M. Current challenges in glia-pain biology. **Neuron**, v. 64, p. 46–54, 2009.

MEIRELES, L.S, CHAGASTELLES, P.C. & NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. v. 109, p. 2204-2213, 2006.

MEZEY, E. et al., Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, v. 290, p. 1779-1782, 2000.

MIKA, J. et al. Importance of glial activation in neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, p. 106–119, 2013.

MIURA, K. OKADA, Y. AOI, T. et al., Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 743-745, 2009.

MORGADO, C. PEREIRA-TERRA, P. CRUZ, C. D. TAVARES, I. Minocycline completely reverses mechanical hyperalgesia in diabetic rats through microglia-induced changes in the expression of the potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) at the spinal cord. **Diabetes Obes Metab.** v.13, p.150-159, 2011.

MORSHEAD, C. M., B. A. et al., Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: A relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. **Neuron**, v.13, p.1071–1082, 1994.

MUREA, M. MA, L. E FREEDMAN, B.I. Genetic and Environmental Factors Associated With Type 2 Diabetes and Diabetic Vascular Complications. **The Review of diabetic studies**, v. 9 (1), 2012.

MUSOLINO, P.L., et al. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. **Neuroscience Letters**, v. 418 (1), p. 97-101, 05/2007.

NEMETH, K. LEELAHAVANICHKUL, A. YUEN, P.S.T. et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2–dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature Medicine**, v. 15, p. 42-49, 2009.

NISHIDA, N. YAMAGISHI, S.MIZUKAMI, H. YAGIHASHI, S. Impaired nervefiber regeneration in axotomized peripheral nerves in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 4, p. 533-539, 2013.

NOISEUX, N. GNECCHI, M. LOPEZ-ILASACA, M. et al., Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation, **Molecular Therapy**, v. 14, p. 840–850, 2006.

NONATO, F. B. BARROS, T. A. A. LUCHESE, A. M. OLIVEIRA, C. E. C. SANTOS, R. R. SOARES, M. B. P., VILLARREAL, C. F. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 102 – 107, 2009.

OBROSOVA, I.G. DREL, V.R. OLTMAN, C.L, et al. Role of nitrosative stress in early neuropathy and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.**, v. 293, p. E1645–E1655, 2007.

OBROSOVA, I.G. XU, W. LYZOGUBOV, V.V. et al. PARP inhibition or gene deficiency counteracts intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain in advanced diabetic neuropathy. **Free Radic Biol Med.**, v. 44, p. 972–981, 2008.

OBROSOVA, I.G. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. **Neurotherapeutics**. v. 6, p. 638-647, 2009.

OLIVEIRA, J.E.P. & VENCIO, S. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Gen**, 2014.

PABREJA, K. DUA, K. SHARMA, S. PADI, S.S. KULKARNI, S.K. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible antiinflammatory and anti-oxidant mechanisms. **Eur. J. Pharmacol.** v. 661, p. 15–21, 2011.

PATEL, S.S. UDAYABANU, M. Effect of *Urtica dióica* on memory dysfunction and hypoalgesia in an experimental model of diabetic neuropathy, **Neuroscience Letters**, v.552, p. 114-128, 2013.

PING, W.U. et al., Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 1271 – 1278, 2002.

PLUCHINO, S. COSSETI, C. How stem cell speak with host immune cells in inflammatory brain diseases. **Glia**, v. 61, p. 1369-1401, 2013.

PRADHAN, L. NABZDYK, C. ANDERSEN, N.D. LOGERFO, F.W. VEVES, A. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. **Expert Rev Mol Med**. v. 11, 2009.

PROCKOP. D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. **Science**, v. 276 (5309), p. 71-74, 1997.

PROCKOP, D. J. OLSON, S. D. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair. Let's not overlook some essential precautions. **Blood**, v.109, p. 3147–3151, 2007.

QUAN, Y. DU, J. & WANG, X. High glucose stimulates GRO secretion from rat microglia via ROS, PKC, and NF-kappaB pathways. **J. Neurosci. Res.**, v. 85, p. 3150–3159, 2007.

RIVERA, F.J. COUILLARD-DESPRES, S. PLOETZ, X.P.S. CAIONI, M. LOIS, C. BOGDAHN, U. AIGNER, L. Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 2209–2219, 2006.

SANTOS, R. R. *et al.* Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico. **Dental Press J Orthod**. v.16 (6), p. 111-118, 2011.

SEO, J.H & CHO, S-R. Neurorestoration Induced by Mesenchymal Stem Cells: Potential Therapeutic Mechanisms for Clinical Trials. **Yonsei Med. J.**, v. 53(6), p. 1059-1067, 2012.

SEGAUDO-ROUSSEL, D. FROMY, B. SAUMET, J.L. Diabetic neuropathy in animal models. **Drug Discov. Today Dis.**, v. 4, p. 39-44, 2007.

SIMA, A. A. F. Diabetic neuropathy; polero genetic backgrounds, current and future therapies. **Expert Rev. Neurotherapeut.**, v. 1, p. 225–238, 2001.

SIMMONS, Z. FELDMAN, E. L. Update on diabetic neuropathy. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 15, p. 595–603, 2002.

SINISCALCO, D. GIORDANO, C. GALDERISI, U. et al. Intra-brain microinjection of human mesenchymal stem cells decreases allodynia inneuropathic mice. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 655-669, 2010.

SINISCALCO, D. GIORDANO, C. GALDERISI, U. et al. Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular and biomolecular modifications in neuropathic mice. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 5, p. 01-10, 2011.

SILVA, N. R.; COSTA, C. E. M. A hiperglicemia e os mecanismos envolvidos nas disfunções vasculares do Diabetes Mellitus. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 12, p. 265-270, 2008.

SHI, X. CHEN, Y. NADEEM, L. XU, G. Beneficial effect of TNF- $\alpha$  inhibition on diabetic peripheral neuropathy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 02-09, 2013.

SHIBATA, T. NARUSE, K. KAMIYA, H. KOZAKAE, M. KONDO, M. YASUDA, Y. et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. **Diabetes**, v. 57, p. 3099-30107, 2008.

SOUZA, F. S. NAPOLI, P. HAN, S. W. CARVALHO, V. C. L. A. C. Células-Tronco Mesenquimais: Células Ideais para a Regeneração Cardíaca? **Rev. Bras. Cardiol. Invas.**, v. 18, p. 344-353, 2010.

STEMBERGER, S. et al., Mesenchymal stem cell in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: immunomodulation and neuroprotection. **Plos one**, v. 6, p. 1-11, 2011.

STOCK P, et al., Human\_bone\_marrow\_mesenchymal\_stem\_cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury. **Int J Mol Science**, v.15(4), p. 7004-28, 2014.

STONE, L. L. GRANDE, A. LOW, W. C. Neural repair and neuroprotection with stem cells in ischemic stroke. **Brain Science**, v. 3, p. 599-614, 2013.

SYKOVÁ, E.; JENDELOVÁ, P.; URDZÍKOVÁ, L. et al. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels: two strategies for spinal cord injury repair. **Cellular and Molecular Neurobiology.**, v. 26(7-8), p. 1113-1129, 2006.

SWEITZER, S. MARTIN, D. DELEO, J. A. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 103, p.529–539, 2001.

TAKAHASHI, K. YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v.126, p. 663-76, 2006.

TALBOT, S. CHAHMI, E. DIAS, J.P. COUTURE, R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. **J. Neuroinflamm.**, v. 7, p. 36–51, 2010.

THACKER, M.A. CLARK, A.K. MARCHAND, F. MCMAHON, S.B. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: Immune cells and molecules. **Anesth. Analg.**, v. 105, p. 838–847, 2007.

TREEDE, R.D. Et al., Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, p. 1630-1635, 2008.

TESFAYE S. Clinical features of diabetic polyneuropathy. In: Veves A, Malik R (eds). Diabetic neuropathy: clinical management. **Humana press**, ed.02, 2007.

TESFAYE, S. Advances in the management of diabetic peripheral neuropathy. **Curr Opin Support Palliat Care.** v.3, p. 136-143, 2009.

TESFAYE, S. et al., Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. **Diabetes Care.** v.33, p. 2285-2293, 2010.

TOGEL, F. et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, p. F31–F42, 2005.

TOTH, C. C. JEDRZEJEWSKI, N. M. ELLIS, C. L. FREY II, W. H. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. **Molecular pain**, v. 6, p. 2-22, 2010.

TSUDA, M. INOUE, K. SALTER, M.W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in “small” glia. **Trends Neuroscience**, v. 28, p. 101–107, 2005.

TSUDA, M. et al., Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. **Glia**, v. 56, p. 378–386, 2008.

TURAN, A. WHITE, P.F. KARAMANLIOĞLU, B. MEMIS, D. TAŞDOĞAN, M. PAMUKÇU, Z. YAVUZ, E. Gabapentin: An Alternative to the Cyclooxygenase-2 Inhibitors for Perioperative Pain Management. **Pain medicine**, v. 102, p. 175-181, 2006.

TURK, D. WILSON, H. CAHANA, A. Treatment of chronic non-cancer pain. **Lancet**, v. 377, p. 2226-2235, 2011.

VARENIUK, I. PAVLOV, I.A. OBROSOVA, I.G. Inducible nitric oxide synthase gene deficiency counteracts multiple manifestations of peripheral neuropathy in a streptozotocin-induced mouse model of diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 2126 –2133, 2008.

VINCENT, A. M. et al., Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. **Endocrinology**, v.148, p. 548–558, 2007.

VINCENT, A.M, CALLAGHAN, B.C, SMITH, A.L et al. Diabetic neuropathy: Cellular mechanisms as therapeutic targets. **Nat Rev Neurol.**, v. 7, p. 573–583, 2011.

VINIK et al., Diabetic Neuropathy in Older Adults. **Clin Geriatr Medicine**, v. 407, 24 ago. 2008.

URBAN, V. S. KISS, J. KOVÁKS, J. GÓCZA, E. VAS, V. MONOSTORI, E. UHER, F. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. **Stem Cells**, v. 26, p. 244–253, 2008.

WADA, R., e YAGIHASHI, S. Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. **Ann. N. Y. Acad. Science**, v. 1043, p. 598–604, 2005.

WAGERS, A.J. & WEISSMAN, I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v. 116 (5), p. 639–648, 2004.

WANG, X.; WILLENBRING, H.; AKKARI, Y. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. **Nature**, v. 422, p. 897-900, 2003.

WANG, D. COUTURE, R. HONG, Y. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain. **Eur. Jour. Of Pharmacology**, v. 728, p. 59-66, 2014.

WALKER, D. CARRINGTON, A. CANNAN, S.A. SAWICKI, D. SREDY, J. BOULTON, A.J. MALIK, R.A. Structural abnormalities do not explain the early

functional abnormalities in the peripheral nerves of the streptozotocin diabetic rat. **J. Anat.** v.195, p. 419-27, 1999.

WALSH, S. MIDHA, R. Use of stem cells to augment nerve injury repair. **Neurosurgery**, v. 65, p. A80-86, 2009.

WATERMAN, R. MORGENWECK, J. NOSSAMAN, B. SCANDURRO, A. SCANDURRO, S. BETANCOURT, A. Anti-Inflammatory Mesenchymal Stem Cells (MSC2) Attenuate Symptoms of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy. **Stem Cell Transplantation Medicine**, v. 1, p. 557-565, 2012.

WEN, Y-R. et al., Microglia: A promising target for treating neuropathic and postoperative pain and morphine tolerance. **J. Formos. Med. Assoc.**, v.110 (8), p. 487-494, 2011.

**World Health Organization.** Report of a WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. WHO/NCD/NCS/99.2. Geneva: WHO, 1999.

WODARSKI, R. et al., Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur. J. Pain**, v.13, p. 807–811, 2009.

WRIGHT, D.E. RYALS, J.M. MCCARSON, K.E. CHRISTIANSON, J.A. Diabetes-induced expression of activating transcription factor 3 in mouse primary sensory neurons, **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 9, p. 242–254, 2004.

XIANG, F. LU, X. STRUTT, B. HILL, D.J. & FENG, Q. NOX2 Deficiency protects against streptozotocin-Induced  $\beta$ -cell destruction and development of diabetes in mice. **Diabetes**, v. 50, p. 2603-2611, 2010.

XU, G. PIERSON, C. R. MURAKAWA, Y. SIMA, A. A. F. Altered tubulin and neurofilament expression and impaired axonal growth in diabetic nerve regeneration. **J. Neuropathol. Exp. Neurology**, v. 61, p. 164–175, 2002.

YAGIHASHI, S. MIZUKAMI, H. & SUGIMOTO, K. “Mechanism of diabetic neuropathy: where are we now and where to go?” **Journal of Diabetes Investigation**, v. 2(1), p.18–32, 2011.

ZAGO, M. A. Terapia com células-tronco. Fundamentos, oportunidades e obstáculos. **Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão**, v. 8(4), p. 145-150, 2005.

ZIEGLER, D. Painful diabetic neuropathy. **Diabetes care**, v. 32, suplem. 2, Nov. 2009.

ZIEGLER, D. Diabetic peripheral neuropathy. In: Holt R, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein A (eds). Texto do livro Diabetes, **Wiley-Blackwell**, ed. 4, 2010.

ZHUANG, Z.Y. et al., ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. **Pain**. v. 114, p. 149–159, 2005.



## **9. APÊNDICE**

**APÊNDICE: Manuscrito em preparação****EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM BONE MARROW TRANSPLANTATION IN A MURINE MODEL OF PERIPHERAL DIABETIC NEUROPATHY**

---

Afrânio Ferreira Evangelista<sup>1</sup>, Daniela Nascimento Silva<sup>2</sup>, Marcos André Vannier dos Santos<sup>1</sup>, Milena Botelho Pereira Soares<sup>1,2</sup>, Cristiane Flora Villarreal<sup>1,3</sup>

1. Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, CEP 40296-710, Salvador, BA, Brazil;
2. Center of Biotechnology and Cell Therapy, São Rafael Hospital, CEP 41253-190, Salvador, BA, Brazil;
3. Pharmacy college, Federal University of Bahia, CEP 40170-290, Salvador, BA, Brazil.

**Corresponding author:**

Dr<sup>a</sup>. Cristiane Flora Villarreal

LAFTE/UFBA

Rua Barão de Jeremoabo, 147, Ondina, Salvador, Bahia, CEP: 40,170-115, Brazil.

Phone: 55 71 3283 – 6933

e-mail: [cfv@ufba.br](mailto:cfv@ufba.br)

## Abstract

Diabetes is a highly prevalent disease which frequently compromises the peripheral nervous system. In peripheral diabetic neuropathy, the most frequent symptoms are sensitive, in which the neuropathic pain, chronic condition characterized by allodynia and hyperalgesia, is the most debilitating. Neuropathic pain affects the quality of patients' lives, and is often not responsive to pharmacological conventional treatment methods. Against this background, the development of new therapeutic approaches that have an effective action in this type of pain is of great importance. The use of cell therapy in the treatment of lesions in the nervous system has shown promising results and the therapeutic potential of stem cells in experimental neuropathy has been proposed. In this study, we evaluated the effect of mesenchymal stem cells derived from bone marrow (Msc) in peripheral diabetic neuropathy established in experimental model of streptozotocin (STZ) induced diabetes in mice. Four weeks after the induction of the model by daily administration of STZ (80 mg/kg, ip; 3 days) the animals received an Msc by intravenous administration ( $1 \times 10^6$ ) or vehicle. The treatment with gabapentin (30 mg/kg, orally every 12 hours for six consecutive days) was used as the gold standard. The thermal and mechanical nociceptive thresholds were assessed throughout the entire experimental period (90 days), using Hargreaves and von Frey methods, respectively. Motor function evaluation was conducted using the rotarod test. At different times and for all experimental groups, analyzes were conducted in spinal cord segments (L4-L5) to determine cytokines profile by ELISA. Sciatic nerve segments were also collected for evaluation of morphological changes by optical and electron transmission microscopy. According to the behavioral data, the Msc treatment reduced the mecanoalodinia and the thermal hypoalgesia, leading nociceptive thresholds of neuropathic animals to levels similar to those of non-neuropathic animals. Similarly, Msc administration normalized motor function of neuropathic animals. Microscopy data demonstrated that neuropathic animals had axonal atrophy and an apparent decrease of the number of myelinated fibers as well a reduction in the number of unmyelinated fibers in the sciatic nerve, but neuropathic animals treated with Msc had a lower incidence of axonal atrophy, showed no decrease in the number of myelinated fibers and no apparent decrease in the amount of unmyelinated fibers in relation to neuropathics treated with saline. Furthermore, the Msc transplantation was able to modulate the profile of cytokine production in the spinal cord, one important event involved in the maintenance of neuropathic pain. Neuropathic animals treated with Msc presented lower levels of spinal IL-1 $\beta$  and higher levels of TNF- $\alpha$ , and IL-10 and TGF- $\beta$  compared to neuropathic animals that received saline. These data indicate that Msc produces a lasting analgesic effect in diabetic neuropathy, followed by changes in the pathophysiological disease pattern,

which indicates cell therapy as an interesting alternative for the control of painful peripheral diabetic neuropathy.

**Keywords:** Neuropathic pain, Mesenchymal stem cells, Peripheral diabetic neuropathy.

## Introduction

Currently diabetes is a major syndromes that affect humans. With worldwide prevalence estimated at 8.3% and about 12 million Brazilians affected (1), it causes a series of complications that contribute to reduced quality and life expectancy of individuals. Among these complications stands diabetic peripheral neuropathy (DPN), affecting about 50% of diabetic patients (2,3). The DPN comprises a heterogeneous group and complex changes involving different parts of the peripheral nervous system somatic and autonomous and can be symmetrical or asymmetrical, focal or multifocal (4,5). The symptoms that indicate the development of neuropathy are the most sensitive found as paraesthesia, decreased skin sensitivity and neuropathic pain, which interfere in different aspects, biological, psychological and social this group of patients (6,7).

Neuropathic pain may be manifested in several ways, for example, paroxysmal pain, pain evoked by no noxious stimulus (allodynia), increased severity of pain induced by noxious stimuli (hyperalgesia), or as a paradoxical combination of sensory loss and hyperalgesia (8). Pharmacological treatment of choice for neuropathic pain is based on the use of centrally acting drugs, such as anticonvulsants (gabapentin, carbamazepine and lamotrigine) and antidepressants (amitriptyline and imipramine), which have moderate efficacy in reducing pain in just 50% of treated patients (9). In addition, none of these drugs has curative action in neuropathy, acting only as a palliative treatment. In addition to the modest analgesic control, these medicines cause unwanted effects such as fatigue, drowsiness, dry mouth, dizziness, nausea and constipation, compromising patient compliance to treatment or reducing their quality of life (10). Thus, it is essential to search for new procedures and / or medications aiming adequate control of neuropathic pain of diabetic origin.

An emerging strategy for regeneration or functional recovery of injured tissues is the use of stem cells (11-13). These are undifferentiated cells that have the ability to self-renew and to differentiate into different cell types may be embryonic or adult origin (14). Adult stem cells are present in different tissues, and those from bone marrow the most studied. The mesenchymal cells of bone marrow (Msc) comprise stem cells with extensive differentiation potential having the function of keeping the physiological state of homeostasis of the organism by replacing cells destroyed by disease or injury (15). Its broad therapeutic potential has been shown in preclinical and clinical studies, including in diseases of the nervous system (16-21). In due to its potential proposed regeneration of nerve cells (22-24), it is possible that the stem cells have therapeutic effects on neuropathies arising from injury or dysfunction of the nervous system. In fact, recent studies have shown that stem cell administration reduces neuropathic pain behavior in an experimental model of sciatic nerve ligation (25,26) and diabetic neuropathy (27). However, the best characterization of this effect, as well as the mechanisms involved in stem cell actions during diabetic neuropathy, still need to be investigated. Thus, this study aims to evaluate the therapeutic potential of transplantation Msc, neuropathy in experimental model of streptozotocin-induced diabetes by addressing its potential modifier of the disease over the palliative profile of clinically available analgesics.

## **Material and methods**

### **Animals**

Mice of the C57BL / 6 strain male rats were used, weighing between 20 and 25 grams, aged between 40 and 60 days from the animal house of CPqGM, FIOCRUZ - BA and bone marrow donors were of the same strain, but females between 35 and 50 days old. The mice were kept in a room at  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in cycle light / dark 12 hours each, without water or food restriction during the experimental period. The behavioral experiments were conducted between 7 am and 5pm. All experiments were performed according to the recommendations of the International Association for the Study of Pain (IASP)

and approved by the Ethics Committee on Animal Use the CPqGM, FIOCRUZ - BA (CEUA: L-IGM - 025/2011).

### **Streptozotocin-induced diabetes**

Mice received three consecutive days, a daily administration intraperitoneally, 80 mg/kg of streptozotocin (Sigma) using citrate buffer (pH 4.5) as the vehicle (27). The group naive just received the administration of the vehicle. Were considered diabetic animals had plasma glucose levels 250 mg/dL in determinations with digital glucometer Accu-Check (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). In all experimental groups blood glucose and body weight were assessed at baseline, 28 and 90 days after induction of diabetes. From the model of induction, nociceptive thresholds of the animals were evaluated for 90 days. The withdrawal of the sciatic nerve segment for morphological and morphometric analysis was performed at the end of the trial period and tissue samples for measurement of cytokines were made at the following times: (1) before induction of diabetic neuropathy model (baseline), (2) 28 days after induction and the template prior to transplant, (3) 45 days after induction of diabetes model (4) at the end of the experimental period (90 days).

The experimental groups were set as follows:

**STZ-:** Group of animals that were not induced diabetes model or received administration of Msc;

**STZ +:** diabetic animals, but not transplanted with Msc;

**STZ + Msc:** Animals and diabetics undergoing transplantation of Msc  $1 \times 10^6$ ;

**STZ + Gabapentin:** diabetic mice and treated with gabapentin (30mg/kg, io).

### **Acquisition, isolation and mesenchymal stem cell transplantation**

Bone marrow cells were isolated from the long bones of the hind legs of female mice euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation. Using sterile techniques, the leg was amputated at the time of the hip joint and the muscles and nerves were removed to obtain the tibia and femur. The epiphyses were removed and washed bone marrow using a syringe needle to collect the total bone marrow cells in a tube in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented 50ug/ml gentamicin. The cells were subjected to Ficcol gradient and centrifuged

at 1500 rpm (806g) for 10 minutes at 15 °C. The ring formed was collected by mononuclear cells and the rest of the material containing mainly granulocytes and erythrocytes was discarded. Then, the mononuclear cell enriched fraction was further diluted in complete DMEM medium, centrifuged at 1500 rpm (806 g) for 10 minutes at room temperature. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in saline solution (0.9% NaCl), and then subjected to a viability test with trypan blue. Cells were counted in Neubauer chamber, where a diluted sample (1:1000) was placed in the chamber for counting of cells in four quadrants in all fields. The result was divided by four and multiplied by  $10^5$ ,  $10^3$  and the dilution factor used and the chamber  $10^4$  factor.

To acquire Msc, mononuclear bone marrow cells were cultured in culture flasks at a density of  $7 \times 10^6$  cells/ml in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Non-adherent cells were removed by washing in DMEM medium after 3 days of culture. After reaching approximately 80% confluency, such cells were "trypsinized" and seeded into new flasks for expansion. The cell culture was monitored by phase contrast microscopy and the medium changed three times a week until cell confluence had reached 80 to 100%. Then, the cells were centrifuged at 1500 rpm (806 g) for 10 minutes at room temperature, counted in Neubauer chamber and prepared for administration to animals. The number of Msc administered in each animal was  $1 \times 10^6$  in sterile saline solution with heparin 10%. The cells were administered intravenously by tail vein.

### **Evaluation of the mechanic nociceptive threshold – von Frey filaments**

In order to evaluate the response threshold to mechanical stimuli, the test was performed with von Frey filaments, which consist of nylon yarn segments whose stiffness voltage is predetermined by the manufacturer in grams (Stoelting). The reading method is called up-and-down, considering a total of six consecutive answers beginning after the filament where the animal changes the unresponsive behavior, interpreted as not nociceptive, the responsive behavior, detected by the withdrawal movement paw flinch or (28). In this technique, a single filament is used for six seconds and only when the animal is active (awake), with all four paws on the surface and the body weight evenly distributed. Initially, the mice were placed in clear acrylic boxes, high on a

mirror, with background in galvanized wire mesh that allows access to the plantar surface of the foot, where they remained for thirty minutes to adaptation. Then, reading the nociceptive threshold was carried out.

The result considers the logarithm value of the force provided by the last thread ( $X_f$ ), the value obtained according to each pattern of positive and negative responses ( $k$ ) and the average of the difference between the stimuli in logarithmic units ( $\delta$ ) and is expressed to 50% of the nociceptive threshold in grams, that is, the filament strength in which the animal responds in 50% of presentations, according to the following equation:  $50\% \text{ grams threshold} = (10^{[X_f + k\delta]})/10.000$ .

### **Evaluation of the nociceptive thermal threshold – hargreaves test**

In order to evaluate the response threshold to thermal stimulation was performed the test plant in Hargreaves apparatus (Ugo Basile, Varese, Italy), as described previously (29). For this, the animals were placed in individual compartments of acrylic and positioned on a special glass surface, which allows the passage of light and uniform heat for five minutes to adapt to the environment. After this period, a source of infrared light was placed under one of the animal's rear legs, while an electronic timer was triggered. When the animal exhibits positive response (flinch or paw withdrawal) the light source and the clock stop automatically. A cutoff time of 20 seconds was used to prevent tissue damage. In each animal were three paw withdrawal latency measurements with a range of 5 to 10 minutes between them and the result was expressed as the average of three readings in seconds.

### **Function evaluation motor – Rotarod test**

Aiming to assess motor function in diabetic animals and underwent transplantation with Msc, was held the rotarod test (Insight, Ribeirao Preto, Brazil), previously described by KURIBARA et al., 1977 (30). This test consists of a appliance consists of a rough horizontal bar 3cm in diameter, located at 25cm from the surface subdivided into five compartments and programmed to rotate at a constant speed of 8rpm. As a positive control, one group of animals was used receiving diazepam (10mg/kg, ip pretreatment 30 minutes (31)) a



CNS depressant reduces the time the animal remained in the machine. The test period extended for 120 seconds, during this period, the time was recorded when the animal remained on the rod. Each animal had up to 3 attempts to exceed 100 seconds. For animals that have fallen in three attempts, the average length of stay was calculated in three readings and those who have reached 100 seconds or more were not put back on the unit and this was considered its running time.

### **Analysis of morphological and morphometric sciatic nerve**

At the end of 90 days consisting of the experimental period, the mice were euthanized and samples of the sciatic nerve ( $\pm 1$  cm) were collected, processed and subjected to morphological analysis by light microscopy and transmission electron. The samples were fixed in solution containing 2.5% glutaraldehyde (Sigma, USA), 2% paraformaldehyde (Reagan, Brazil) of 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, and distilled water for 24 hours at 4 °C. Immediately after were post-fixed with osmium tetroxide (1% Sigma, USA), 0.8% potassium ferricyanide (Synth, Brazil) calcium chloride 5 mM cacodylate buffer for 1 hour at room temperature, followed by dehydration with different concentrations of acetone. Subsequently, the samples were submerged in acetone solution and resin Poly/Bed (Polysciences, Germany) for 24 hours at different concentrations, and then cured in an oven at 60 °C for three days. They were then cut on an ultramicrotome Leica S6E (1 $\mu$ M) and stained with toluidine blue (Merck, UK) diluted in 1% sodium tetraborate (Ecibra, Brazil).

The images of thin sections were captured and digitized using Olympus BX51 microscope and morphometric examination of nerve was performed using the software Image-Pro Premier 9.1 (Media Cybernetics ®). Were scanned images of a cutting animal of each group, the 10x objective to observe the total nerve area and a 100X lens, for the selection of the sample. Each sample was defined five fields of known areas, randomly arranged and was excluded from the morphometric analysis, axons degeneration, double myelination and those contained in the lower limit and right fields.

The calculation used to obtain the percentage of the sample was performed by multiplying the sum of the area of the fields by one hundred and divided by total

nerve area. Have to give the total number of axons, the sum of quantified axons was multiplied by one hundred and divided by the percentage of the sample. The measurement of the average diameter of axons was the result of the sum of the diameter divided by the number of axons, just as occurred in the calculation of the average diameter of myelin fibers. For the thickness of the myelin sheath, myelin fiber diameter was subtracted from the axon diameter and dividing by two. Thereupon, the average thickness was calculated from the sheath through the thickness of the sum of the myelin sheath division divided by the number of fibers. The G-ratio was determined from the ratio of the diameter of the axon of the nerve fiber diameter.

For ultrastructural analysis of the sciatic nerve were performed ultrathin sections of samples acetate contrasted with uranyl 5% and 15% lead citrate and viewed on a JEOL electron microscope JEM -1230.

### **Extraction of the tissue, quantification of proteins and cytokines**

For spinal cord collection, animals from all experimental groups were sacrificed by decapitation and the lumbar segment of the spinal cord 4-5 was collected at different time points. Each spinal cord segment was then homogenized in 100 of buffer (1x PBS, 0.4 M NaCl, Tween - 20 0.05% 0.5% BSA, 0.1 mM PMSF, DMSO, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and aprotinin, 20KIU), staying for an hour on ice. Afterwards, the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 25 minutes and the supernatant collected. In order to avoid variations in the quantity of proteins from one animal to another, the determination of total proteins by fluorescamine method was performed, which was then used to normalize the data. The processed samples were used for quantification of the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  by ELISA-technique (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). The DuoSet ELISA kits were used Development System (R & D Systems, Minneapolis, USA) for each cytokine.

96-well plates (NUNC - IMMUNO PLATE Surface Maxisorp) were coated with 50ul of the capture antibody (purified anti-cytokine monoclonal antibody) diluted in 1x PBS and kept at 4 °C overnight. Then the plates were washed 3X with PBS - 0.05% Tween®20, and added 100uL of PBS solution containing 5% Tween® 20 and 0.05% NaN<sub>3</sub>. They were then kept at room temperature for 2

hours in order to block nonspecific sites. Afterwards, plates were washed 3X and incubated for 2 hours at room temperature with 50 uL of sample (per well, in duplicate) and the respective standard curves. After further washes, was added to anti-cytokine detection antibody and biotinylated plates were incubated for 2 hours at room temperature. After washings were added 50 uL/well of streptavidin diluted 1:200 and incubated for 20 minutes at room temperature. After further washing, the reaction was developed with 50uL/well developing solution containing 10ml of 1M citrate-phosphate buffer, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 2uL of a tablet of TMB (tetramethylbenzidine). The reaction block was done by adding 50uL / well of phosphoric acid 1:20. The plates were read in a spectrophotometer (Spectra Max 190 -Molecular Devices, California, USA), under the wavelength of 450nm and data analyzed in Softmax 4.3.1 software (Molecular Devices).

### **Statistics**

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean of six animals per group. The comparison between groups was performed using one-way ANOVA followed by Tukey test. In studies of repeated measurements, we used the two-way ANOVA, followed by Bonferroni test. For morphometric analysis, we performed the Shapiro Wilk test and how all were negative for normality, we performed the test Kurskal Wallis followed by Dunns post-test. Data were analyzed with GraphPad Prism v.5.0 software (GraphPad Inc., San Diego, CA), and differences were considered statistically significant for p values <0.05.

### **Results**

#### **Weight and blood glucose**

Throughout the experimental period, blood glucose and body weight of the mice were monitored and the data are shown in Figure 01. At the end of four weeks after diabetes induction, immediately before transplantation Msc the STZ + mice were reduced weight and increased glucose statistically significant (p <0.01) compared to the group of mice that did not receive STZ (STZ-). At the end of ninety days trial period, the weight loss of the STZ + animals treated with Msc was lower compared to animal STZ + saline groups and STZ + gabapentin (p

<0.01), as well as transplantation with reduced Msc of statistically significant glucose to the mice ( $p < 0.001$ ), but these values are still higher than those of STZ- animals ( $p < 0.001$ ).

### **Mechanical nociceptive threshold**

The mechanical nociceptive threshold assessment demonstrated that 24 hours after the model of the induction period there was a large reduction in the response threshold mechanical stimulation ( $p < 0.001$ ), indicating the development of NDPD (Figure 2). The treatment with gabapentin (30 mg/kg) twice daily for six consecutive days (31 to 36) induced only partial and transient analgesic effect, returning to the state of mechanical allodynia after the drug effect. Single administrations of Msc  $1 \times 10^6$  proved capable of reversing allodynia and normalize the mechanical nociceptive threshold by the end of the trial period. The antinociceptive effect of treatment was statistically significant ( $p < 0,01$ ) 7 days after the transplant, gradually increasing to full normalization of nociceptive threshold. Interestingly, from the 80th day, the mice treated with saline or NDP gabapentin, a statistically significant increase ( $p < 0.001$ ) of nociception threshold, characterizing loss of sensitivity. Importantly, this phenomenon was not observed in animals treated with Msc, which remained with thresholds similar to those of mice STZ- to the end of the study.

### **Thermal nociceptive threshold**

The response to thermal nociceptive stimulus thresholds is presented in Figure 3. 28 days after the induction of the model was to increase the thermal stimulus response threshold ( $p < 0.001$ ), indicating loss of thermal sensitivity. Administration of Msc ( $1 \times 10^6$ ) (29), was effective in reversing the installed thermal hypoalgesia. Despite the initial reversal was observed two days after the transplantation it became statistically significant ( $p < 0.01$ ) from the 4th day after transplantation (day 33). After this point, the nociceptive threshold of neuropathic animals treated with Msc remained at the same levels of non neuropathic animals during the whole experimental period. The treatment with gabapentin (30 mg / kg) twice daily for six consecutive days (31 to 36), induced a slight decrease of the installed hypoalgesia ( $p < 0.001$ ). This effect was seen only in the period in which the drug remained active in the animal body.

### **Motor function evaluation**

Figure 4 shows the dwell time in seconds of the animals on the revolving bar. As expected, diazepam (10 mg/kg, ip) induced significant reduction of the residence time of the animals in the rotarod ( $p < 0.001$ ). Animals with NDPD also decreased the time spent on the set ( $p < 0.001$ ), indicating motor deficit. The transplantation Msc ( $1 \times 10^6$ ) was able to fully reverse motor deficits in mice with NDPD. On the other hand, treatment with gabapentin (30 mg/kg) twice daily for six consecutive days was not able to promote statistically significant improvement in motor function in animals with NDPD.

### **Effect of MSC on the morphology of sciatic nerve**

Histological analysis of cross-sections of sciatic nerve segments was performed at the end of the trial period. Figure 5A is a morphologically normal nerve (STZ group -) shows the presence of myelinated fibers of varying diameters, regular contour, intact myelin sheaths and thickness proportional to the diameter of their axons. In STZ + saline group, there was the presence of myelin fibers with axonal caliber atrophy and retraction of the myelin sheath (Figure 5B). Note in the inset of Figure 5B, a bundle of nerve fibers to a lesser increase in diameter and having axons seemingly minor myelin sheath thicknesses. Figure 5C is the morphological aspect of the sciatic nerve STZ animals treated with gabapentin. Note the presence of myelin fibers caliber with atrophic axons and loosening of the myelin sheath, indicated on the tips of arrows and axon caliber and thin myelin sheath with suggestive feature of remyelination (arrow). Finally, Figure 5D is a cross-sectional photomicrograph of the sciatic nerve of an animal STZ + Msc group, indicating the presence of apparent atrophic process myelinated axon (arrowhead) and myelin fibers of different diameters and myelin sheath integrates.

### **Transmission electron microscopy of the sciatic nerve**

The qualitative analysis of ultrastructural aspects of the sciatic nerve in mice revealed in more detail the characteristics described in the histological evaluation. The figura 6A indicates a representative micrograph of the STZ group - with axons of myelinated fibers surrounded by a typical myelin sheath

and relative thickness increases as the size of the fiber. It is also noted the presence of numerous unmyelinated fibers evenly distributed in space endoneural. In Figure 6B, the presence of large diameter myelinated fibers in axonal atrophy process with loosening of the myelin sheath is observed and asymmetrical distribution and apparent diminution of unmyelinated fibers. The ultrastructural analysis of the sciatic nerve of rats belonging to the group STZ + Gabapentin has revealed the presence of axonal atrophy with loose myelin sheath (Figure 6C - inset) and few unmyelinated fibers arranged in endoneurial space (Figure 6C). Finally, the qualitative assessment of ultrastructural characteristics of animals treated with Msc revealed the presence of myelin fibers of various sizes and with proportional caliber sheaths surrounding the axon, and the presence of numerous unmyelinated fibers with homogeneous distribution (Figure 6D).

### **Morphometry of the sciatic nerve**

The morphometric analysis of myelin fibers of the sciatic nerve of mice of different experimental groups are shown in figures 7, 8 and 9. sciatic nerves of STZ + saline group mice had lower amount of axons in relation to non-diabetic group (STZ -  $p < 0.05$ ), while this reduction was not observed in animals STZ + Msc group. Neuropathic animals treated with gabapentin decreased the number of axons that there was not statistically significant (Figure 7A). No statistically significant differences were found with respect to the mean diameter of the myelinated fibers and the average diameter of axons (7B and C figures). Since the graph of the average thickness of the myelin sheath (Figure 7D) show that the animals in the saline group had STZ + thinner myelin sheath when compared to STZ group - ( $p < 0.05$ ). In animals treated with STZ + Msc or gabapentin was no statistically significant reduction in the thickness of myelin compared to STZ- group. Figure 8 expresses the result of reason axon diameter by the diameter of the myelin sheath, called G ratio Nunhuma statistical difference was found between these two groups for this parameter. The analysis of the frequency, in percentage, of the different diameters of myelinated fibers is expressed in Figure 9. Note that the diabetic mice that received saline (STZ + saline) or gabapentin (STZ + gabapentin), had a higher proportion of myelinated fibers thin, with about  $1\mu\text{m}$  in diameter ( $p < 0.001$ )

compared to non-diabetic (STZ -). In diabetic mice treated with Msc there was no statistical difference from STZ- group.

### **Effect of Msc on cytokine expression in spinal cord**

The levels of cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$  in the spinal cord (L5-L4) were measured before and after transplantation Msc and the results are shown in Figure 10.

The results showed that neuropathic animals exhibited higher levels of spinal IL-1 $\beta$  at all time points when compared to non-diabetic animals ( $p < 0.01$ ). The spinal IL-1 $\beta$  was reduced and normalized 15 and 60 days, respectively, after transplantation Msc in neuropathic animals. Gabapentin reduced spinal levels of IL-1 $\beta$  in a statistically significant manner ( $p < 0.01$ ) only 9 days after administration (point 45 days). TNF- $\alpha$  levels in the spinal cord were increased in diabetic mice in the 45-day period ( $p < 0.001$ ). Msc treatment produced a statistically significant reduction of TNF- $\alpha$  in the spinal cord 15 and 60 days after the transplantation, compared to STZ + saline group ( $P < 0.001$ ). In contrast, treatment with gabapentin reduced levels of TNF- $\alpha$  was 9 days post-treatment ( $p < 0.001$ ).

The dosage of IL-10 showed that transplant Msc increased spinal levels of this cytokine in neuropathic animals 60 days after transplantation ( $p < 0.001$ ). The treatment with gabapentin did not modify IL-10 standard. In addition, neuropathic animals exhibited lower spinal levels of TGF- $\beta$ , in the times of 28 and 45 days after induction of the model when compared to control animals ( $p < 0.01$ ). The transplant Msc in neuropathic animals increased levels of this cytokine 15 days after transplantation ( $p < 0.001$ ). Treatment with gabapentin did not affect the TGF- $\beta$  levels.

### **Discussion**

In this study, we investigated the therapeutic potential of mesenchymal cells derived from bone marrow transplantation in experimental model of peripheral diabetic neuropathy. A single systemic administration of Msc was able to normalize the changes of mechanical and thermal sensitivity, NDP characteristics, and promote improved motor function and modify the pattern of

cytokine expression in the spinal cord. In addition, the transplants were able to reduce the morphological changes in the sciatic nerve, indicating the potential of this therapy to repair neuropathy conditions.

Around 40% of individuals with NDP have spontaneous pain, mechanical allodynia (4,32). Similarly, mechanical allodynia has also been identified in an animal model of diabetes induced by streptozotocin (33-36). In fact, in this study we observed that only 24 hours after administration of streptozotocin, a clear mechanical allodynia was installed in the diabetic animals, confirming the development of neuropathy. On the other hand, advanced NDP patients have loss of sensory perception, which is closely related to cases of ulceration and amputation of limbs (37-39). In this sense, the monitoring of the mechanical sensitivity of diabetic animals for ninety days allowed to detect that by the 75th day after the induction of the model, the initial mechanical allodynia led to a loss of tactile sensitivity, as evidenced by the dramatic increase in the mechanical nociceptive threshold the above baseline. Furthermore, together with the mechanical hypoalgesia, patients with advanced NDP also report the loss of sensitivity to thermal stimuli (40). In this study, 12 days after the induction of diabetes the experimental model, the animals showed marked thermal hypoalgesia.

Having established the mechanical and thermal sensitivity profile of neuropathic animals in the chosen experimental model, Msc transplantation was carried out four weeks after the induction of the model. Unlike results obtained with gabapentin, a single transplant Msc afforded progressive and long-lasting improvement of the thermal sensitivity and mechanical neuropathic animals. Full normalization of mechanical and thermal nociceptive thresholds was observed 16:06 days, respectively, after transplantation and remained at those levels until the end of the trial period. Similarly, previous studies had detected mesenchymal cells enhances the thermal and mechanical sensitivity diabetic rodents (41,42). However, the comparison of the effect with Msc reference drug used in the treatment of neuropathic pain of diabetic origin needed to be further investigated. Daily treatment with gabapentin contributed only transient and discreet way for the normalization of nociceptive thresholds of neuropathic animals. This has a well established role in the management of chronic pain in



patients with diabetic neuropathy with modest efficacy in relieving pain and a dose-dependent action, responsible for producing side effects such as dizziness, sleepiness, fatigue and weight gain, which hamper patient adherence to treatment (43-45). Additionally, it has been shown that hyperglycemic rats, besides their behavioral sensitivity changes also have deficits in motor function (46). In fact, we found that the performance of neuropathic animals in the rotarod test was committed against the non-neuropathic animals. Unlike the results obtained with gabapentin, in this study we could demonstrate firsthand the transplant Msc normalized engine performance of neuropathic animals, indicating that the benefit of this treatment covers different neuropathy parameters.

Many and varied mechanisms have been proposed to explain the changes in sensitivity and characteristic allodynia diabetic neuropathy. Among them, morphological and functional changes of nociceptive fibers, A $\delta$  and C, present in peripheral sensory nerves. To try to explain the development of hypoalgesia in diabetes, multiple authors have demonstrated that maintenance of hyperglycemia not controlled for a long period, can cause irreparable damage to sensory nerves of mice, producing a deficit in the transmission of information by nerve fibers and sensory loss sensitivity to painful stimuli (47-49). Thus, in this study, morphologic changes in the sciatic nerve of neuropathic mice were investigated, and the effects of Msc transplantation of such changes. We show here, from the morphological and morphometric analysis of the sciatic nerve, significant differences between the nerves of diabetic animals and control animals. Diabetic animals showed axonal atrophy, change in the amount and / or distribution of unmyelinated fibers in endoneural space, reducing the number of thick myelinated fibers, reduced thickness of the myelin sheath and a higher percentage of fine myelinated fibers (A $\delta$ ). The presence of axonal atrophy with loosening of the myelin sheath was more apparent in thick gauge fibers. This suggests that the kind of A $\beta$  fibers responsible for transmitting tactile, are more susceptible to damage caused by hyperglycemia. In addition, the apparent reduction of unmyelinated fibers, polymodal nociceptive fibers type C, may have related to the loss of thermal and mechanical sensitivity observed in behavioral assessment. In agreement with our data, Lennertz and colleagues (2011) (48)

found in an experimental model of diabetes, reducing the number of sensory fibers and decrease of their function, resulting in thermal and mechanical behavior hiposensibilidade in diabetic mice for 6 to 8 weeks. The induction of these morphological and functional changes could explain the appearance of thermal hypoalgesia described in this study, further suggesting that the unmyelinated fibers are the first to be affected by hyperglycemia, whereas the mechanical sensitivity reduction was delayed.

Shibata et al. (2008) (41) reported in their experiments that injecting Msc in skeletal muscle of mice with diabetic neuropathy was able to increase axonal circularity of myelin fibers of the sural nerve. Although morphological studies of the sciatic nerve were performed in experimental models of diabetic neuropathy (50-52), to date there is no information available on the effects of systemic treatment with stem cells on these parameters in the peripheral nerve. In the present study, we demonstrated for the first time that treatment with Msc was able to reduce the morphological changes found in the sciatic nerve of diabetic animals. Diabetic mice treated with Msc presented unmyelinated fibers distributed in endoneural space, myelin fibers of varying sizes and normal morphology. These results may explain the observed effects on the mechanical and thermal sensitivity, as a single administration of Msc produced normalization of nociceptive thresholds throughout the experimental period. Reinforcing this idea, daily treatment with gabapentin, did not modify the nerve morphology. Thus, these results may indicate that treatment with Msc may constitute a more effective approach to the control of neuropathy, by interfering with the pattern of changes associated with the disease.

According to Xu et al. (2002) (53), many communications aspects involved in axon-Schwann cell are committed to diabetic neuropathy, which results in axonal degeneration. Among them, the increase of glucose metabolism by alternative routes as the polyol pathway that causes accumulation of sorbitol is responsible for generating hyperosmotic disorders affecting cell homeostasis and malfunction of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. In addition, the formation of advanced glycosylation end products (AGEs), the activation of the DAG / PKC and oxidative stress triggers an intracellular signaling cascade that promotes the activation of NF- $\kappa$ B and the transcription of pro-inflammatory cytokines such

as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  (54-57). In fact, the contribution of cytokines in the sensitivity changes observed in diabetic neuropathy has gained prominence in recent years (58-60). In diabetic patients, persistent hyperglycemia generates a chronic inflammatory process low grade with the release of cytokines, which trigger and modulate the allodynia and hyperalgesia associated with diabetic neuropathy (61,62). Similarly, studies with experimental models provide data support the hypothesis that the role of cytokines in spinal mechanisms of neuropathic pain (63-65). Kawasaki et al (2008) (66) demonstrated that activation of glial cells in the spinal cord can release pro-inflammatory cytokines, which initiate a signal transduction cascade and the release of excitatory neurotransmitters facilitating the transmission of pain. Considering the key role of cytokines in the pathophysiology of neuropathy, after the evaluation of Msc effect on the behavioral and morphological manifestations of neuropathy changes, this study aimed to investigate the effect of cell therapy on the pattern of cytokine expression in the spinal cord of mice neuropathic. ELISA data showed elevated levels of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the spinal cord of neuropathic mice compared to non neuropathic. These results are in agreement with published data have shown that increased spinal IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in diabetic animals (67,68). In rodents treated with neuropathic Msc observed a reduction of spinal IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , which persisted until the end of the experimental period. Have treatment with gabapentin induced a transient reduction in the levels of these cytokines in the bone marrow. Thacker et al., (2007) (69), showed that the release of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the spinal cord causes accumulation of free radicals, activation of COX-2 and iNOS, with consequent release of prostaglandins and nitric oxide, which are mediators involved in central sensitization and neuropathic pain. According to this idea, the reduction of spinal levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in diabetic animals may contribute to the beneficial effects of Msc in sensitivity disorders described in this work.

The inhibitory effect of Msc on the production of proinflammatory cytokines has been previously reported. Siniscalco et al. (2010) (25) demonstrated in sciatic nerve ligation model that MSCs injected into the lateral ventricle of the brains of mice were capable of inhibiting the gene expression of the interleukin - 1 $\beta$ . In

this work, the authors suggested that mesenchymal stem cells act neuropathy promoting regeneration of the interactions between neural tissue and glia via paracrine effect, that is, through the release of anti-inflammatory cytokines, which limit the production of cytokines and other mediators inflammatory. Later, in 2012 Waterman and colleagues (42) reinforced this idea by using mesenchymal cells genetically modified to overexpress anti-inflammatory factors, they realized that these modified cells were able to greatly reduce the serum levels of proinflammatory cytokines in mice with diabetic neuropathy , demonstrating its paracrine action.

In line with these studies, we demonstrated that Msc spinal transplant induces increased cytokine IL-10 and TGF- $\beta$  in neuropathic animals. Since treatment with gabapentin did not alter the pattern of expression of these cytokines. The IL-10 contribution to the therapeutic effects of mesenchymal cells has been proposed. In 2005, Lyushnenkova and collaborators (70) have demonstrated that MSCs exert immunosuppressive effects through production of soluble factors such as IL-10. Since then, the contribution of this cytokine to the therapeutic effects of stem cells has been widely demonstrated in different experimental models (71-73). The neuroprotective properties of mesenchymal cells have also been associated with IL-10. For a long time has already been described that the joint action of TGF- $\beta$  and IL-10 inhibits the immune response in the central nervous system, by regulating the microglia, preventing its activation and triggering of inflammation (74). Furthermore, IL-10 induces the increase of TGF- $\beta$  and stimulates axonal regeneration exerting neuroprotective effect (75). Creange et al. (1997) (76) showed that after axotomy neuroprotective cytokines such as IL-6 and TGF- $\beta$  are overexpressed and promote axonal growth and restoration of the connections to the Schwann cells. IL-10 is known to reduce levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (77). In research with stem cells, scientists found high levels of this interleukin in serum and spinal cord of mice with neuropathic pain due to injury of the sciatic nerve or diabetic origin, and attributed the reduction in the painful process of their action on such pro-inflammatory cytokines. (78, 42). Thus, as shown, it is possible that the benefit promoted by cell therapy in diabetic neuropathy has IL-10 as the protagonist of the modulation of inflammatory factors and consequent improvement in

sensitivity.

In conclusion, the present results demonstrate that a single injection of Msc was able to promote reversal of sensory and motor evoked by diabetes complications, and modify the spinal pattern of cytokine expression and promoting the reduction of morphological changes in the peripheral nerve. It is noteworthy that no drugs currently available for the control of diabetic neuropathy displays such effect profile, which was also evidenced by the results of gabapentin, presented in this study. This work reinforces the need and the importance of further research on the subject while pointing to high potential alternative for the treatment of complications that affect the peripheral nerves of diabetic.

## References

1. I.D.F. International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas**, Ed. 6, 2013.
2. Boulton, A. J. et al. American Diabetes Association Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 28, p. 4.956-4962, 2005.
3. Edwards, et al., Diabetic neuropathy: mechanisms to management. **Pharmacol. Ther.**, v. 120, p. 01 – 34. 2008.
4. Vinik et al., Diabetic Neuropathy in Older Adults. **Clin Geriatr Medicine**, v. 407, 24 ago. 2008.
5. Tesfaye S. Clinical features of diabetic polyneuropathy. In: Veves A, Malik R (eds). Diabetic neuropathy: clinical management. **Humana press**, ed.02, 2007.
6. Ziegler, D. Painful diabetic neuropathy. **Diabetes care**, v. 32, suplement. 2, Nov. 2009.
7. Feher, G. et al., Diabetic Neuropathies: Diagnosis and Management. **Neuroendocrinology**, v. 98, p. 267-280. 2013.
8. Galvão, A. C. R. Dor neuropática: Tratamento com anticonvulsivantes. **Segmento Farma**, 2005.
9. Ziegler, D. Diabetic peripheral neuropathy. In: Holt R, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein A (eds). Texto do livro Diabetes, **Wiley-Blackwell**, ed. 4, 2010.
10. Tesfaye, S. Advances in the management of diabetic peripheral neuropathy. **Curr Opin Support Palliat Care**. v.3, p. 136-143, 2009.
11. Prockop. D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. **Science**, v. 276 (5309), p. 71-74, 1997.
12. Akiyama, Y. et al. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow strom. **J. Neurosc.**, v. 22, n. 15, p. 6623-6630, 2002.

13. Syková, E.; Jendelová, P.; Urdžíková, L. et al. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels: two strategies for spinal cord injury repair. **Cellular and Molecular Neurobiology.**, v. 26(7-8), p. 1113-1129, 2006.
14. Santos, R. R. et al. Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico. **Dental Press J Orthod.** v.16 (6), p. 111-118, 2011.
15. Wagers, A.J. & Weissman, I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v. 116 (5), p. 639–648, 2004.
16. Togel, F. et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, p. F31–F42, 2005.
17. Rivera, F.J. Couillard-Despres, S. Ploetz, X.P.S. Caioni, M. Lois, C. Bogdahn, U. Aigner, L. Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 2209–2219, 2006.
18. Ball, M. L. et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. **Blood**, v.110, p. 2764–2767, 2007.
19. Gerdoni, E. et al., Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Ann. Neurol.**, v. 61, p. 219–227, 2007.
20. Prockop, D. J. Olson, S. D. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair. Let's not overlook some essential precautions. **Blood**, v.109, p. 3147–3151, 2007.
21. Urban, V. S. Kiss, J. Kovács, J. Gócza, E. Vas, V. Monostori, E. Uher, F. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. **Stem Cells**, v. 26, p. 244–253, 2008.
22. Eglitis, M. A. & Mezey, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, p. 4080-4085, 1997.
23. Mezey, E. et al., Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, v. 290, p. 1779-1782, 2000.
24. Chopp, M. & Li, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurology**, v. 1, p. 92-100, 2002.
25. Siniscalco, D. Giordano, C. Galderisi, U. et al. Intra-brain microinjection of human mesenchymal stem cells decreases allodynia in neuropathic mice. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 655-669, 2010.
26. Musolino, P.L., et al. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. **Neuroscience Letters**, v. 418 (1), p. 97-101, 05/2007.
27. Guimarães, E.T. Cruz, G.S. Almeida, T.F. Souza, B.S.F. Kaneto, C.M. Vasconcelos, J.F. Santos, W.L.C. Santos, R.R. Villarreal, C.F. Soares, M.B.P. Transplantation of Stem Cells Obtained from Murine Dental Pulp Improves Pancreatic Damage, Renal Function and Painful Diabetic Neuropathy in

- Diabetic Type 1 Mouse Model. **Cell Transplantation**, v. 22(12), p. 2345-2354, 2013.
28. Chaplan, S.R. Bach, F.W. Pogrel, J.W. Chung, J.M. Yaksh, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J. Neurosci. Methods**, v. 53, p. 55– 63, 1994.
29. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32(1), p. 77-88, 1988.
30. Kuribara, H. Higuchi, Y. Takadoro, S. Effects of central depressants on rotarod and traction performances in mice. **J. Pharmacol.**, v. 27, p. 117 - 126, 1977.
31. Nonato, F. B. Barros, T. A. A. Lucchese, A. M. Oliveira, C. E. C. Santos, R. R. Soares, M. B. P., Villarreal, C. F. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 102 – 107, 2009.
32. Bastyr, E. J.; Price, K. L.; Bril, V. The MBBQ study group. Development and validity testing of the neuropathy total symptom score-6: questionnaire for the study of sensory symptoms of diabetic peripheral neuropathy. **Clin. Ther.**, v. 27, p. 1278-1294, 2005.
33. Drel, V.R. Pacher, P. Vareniuk, I. et al. Evaluation of the peroxynitrite decomposition catalyst Fe(III) tetra-mesitylporphyrin octasulfonate on peripheral neuropathy in a mouse model of type 1 diabetes. **Int. J. Mol. Med.**, v. 20, p.783–792, 2007(a).
34. Drel, V.R. Pacher, P. Vareniuk, I. et al. A peroxynitrite decomposition catalyst counteracts sensory neuropathy in streptozotocind diabetic mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 569, p. 48 –58, 2007(b).
35. Obrosova, I.G. Xu, W. Lyzogubov, V.V. et al. PARP inhibition or gene deficiency counteracts intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain in advanced diabetic neuropathy. **Free Radic Biol Med.**, v. 44, p. 972–981, 2008.
36. Vareniuk, I. Pavlov, I.A. Obrosova, I.G. Inducible nitric oxide synthase gene deficiency counteracts multiple manifestations of peripheral neuropathy in a streptozotocin-induced mouse model of diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 2126 –2133, 2008.
37. Eldor, R. Raz, I. Ben Yehuda, A. Boulton, A.J. New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies. **Diabet. Med.**, v. 21, p. 116146. Abraham, P. M.; Paul, J.; Paulose, C. S. Down regulation of cerebellar serotonergic receptors in streptozotocin induced diabetic rats: Effect of pyridoxine and aegle marmelose. **Brain Res. Bull.**, v. 82, p. 87-94, 2010.
38. Pradhan, L. Nabzdyk, C. Andersen, N.D. Logerfo, F.W. Veves, A. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. **Expert Rev Mol Med**. v. 11, 2009.
39. Obrosova, I.G. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. **Neurotherapeutics**. v. 6, p. 638-647, 2009.

40. Dyck, P. J.; Dyck, P. J.; Larson, T. S.; O'brien, P. C.; Velosa, J. A. Patterns of quantitative sensation testing of hypoesthesia and hyperalgesia are predictive of diabetic polyneuropathy: a study of three cohorts. Nerve Growth Factor Study Group. **Diabetes Care**, v.23, p. 510–517, 2000.
41. Shibata, T. Naruse, K. Kamiya, H. Kozakae, M. Kondo, M. Yasuda, Y. et al. Transplantation of bone marrow–derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. **Diabetes**, v. 57, p. 3099-30107, 2008.
42. Waterman, R. Morgenweck, J. Nossaman, B. Scandurro, A. Scandurro, S. Betancourt, A. Anti-Inflammatory Mesenchymal Stem Cells (MSC2) Attenuate Symptoms of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy. **Stem Cell Transplantation Medicine**, v. 1, p. 557-565, 2012.
43. Backonja, M. et al. Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 280, p. 1831-1836, 1998.–1173, 2004.
44. Turan, A. White, P.F. Karamanlioğlu, B. Memis, D. Taşdoğan, M. Pamukçu, Z. Yavuz, E. Gabapentin: An Alternative to the Cyclooxygenase-2 Inhibitors for Perioperative Pain Management. **Pain medicine**, v. 102, p. 175-181, 2006.
45. Turk, D. Wilson, H. Cahana, A. Treatment of chronic non-cancer pain. **Lancet**, v. 377, p. 2226-2235, 2011.
47. Segaudo-Roussel, D. Fromy, B. Saumet, J.L. Diabetic neuropathy in animal models. **Drug Discov. Today Dis.**, v. 4, p. 39-44, 2007.
48. Lennertz, R.C. Medler, K.A. Bain, J.L. Wright, D.E. Stucky, C.L. Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetic neuropathy, **J. Neurophysiol.**, v. 106, p. 905-914, 2011.
49. Patel, S.S. Udayabanu, M. Effect of *Urtica dioica* on memory dysfunction and hypoalgesia in an experimental model of diabetic neuropathy, **Neuroscience Letters**, v.552, p. 114-128, 2013.
50. Fazan, V. P. S. Vasconcelos, C. A. C. Valença, M. M. Nessler, R. Moore, K. C. Diabetic Peripheral Neuropathies: A Morphometric Overview. **Int. J. Morphol.**, v. 28, p. 51-64, 2010.
51. Nishida, N. Yamagishi, S. Mizukami, H. Yagihashi, S. Impaired nerve fiber regeneration in axotomized peripheral nerves in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 4, p. 533-539, 2013.
52. Shi, X. Chen, Y. Nadeem, L. Xu, G. Beneficial effect of TNF- $\alpha$  inhibition on diabetic peripheral neuropathy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 02-09, 2013.
53. Xu, G. Pierson, C. R. Murakawa, Y. Sima, A. A. F. Altered tubulin and neurofilament expression and impaired axonal growth in diabetic nerve regeneration. **J. Neuropathol. Exp. Neurology**, v. 61, p. 164–175, 2002.
54. Sima, A. A. F. Diabetic neuropathy; polero genetic backgrounds, current and future therapies. **Expert Rev. Neurotherapeut.**, v. 1, p. 225–238, 2001.
55. Simmons, Z. Feldman, E. L. Update on diabetic neuropathy. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 15, p. 595–603, 2002.



56. Brownle, M. the pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 56, p.1615-25, 2005.
57. Goldin, B. A. A. Beckman, J. A. Schimdt, A. M. Creager, M. A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v.114, p. 597-605, 2006.
58. Toth, C. C. Jedrzejewski, N. M. Ellis, C. L. Frey II, W. H. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. **Molecular pain**, v. 6, p. 2-22, 2010.
59. Morgado, C. Pereira-Terra, P. Cruz, C. D. Tavares, I. Minocycline completely reverses mechanical hyperalgesia in diabetic rats through microglia-induced changes in the expression of the potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) at the spinal cord. **Diabetes Obes Metab.** v.13, p.150-159, 2011.
60. Wang, D. Couture, R. Hong, Y. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain. **Eur. Jour. Of Pharmacology**, v. 728, p. 59-66, 2014.
61. Vincent, A.M, Callaghan, B.C, Smith, A.L et al. Diabetic neuropathy: Cellular mechanisms as therapeutic targets. **Nat Rev Neurol.**, v. 7, p. 573–583, 2011.
62. Del Rey, A. Apkarian, A.V. Martina, M. Besedovsky, H.O. Chronic neuropathic pain-like behavior and brain-borne IL-1 $\beta$ . **Ann. NY Acad. Sci.** v. 1262, p. 101-107, 2012.
63. Sweitzer, S. Martin, D. Deleo, J. A. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 103, p.529–539, 2001.
64. Kim, D. et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. **J. Biol. Chem.** v. 282, p. 14975–14983, 2007.
65. Kim et al., NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. **PNAS**, v. 107, p. 14851-14856, 2010.
66. Kawasaki, Y. Zhang, L. Cheng, J. K. Ji, R. R. Cytokine mechanisms of central sensitization: Distinct and overlapping role of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 5189–5194, 2008.
67. Ledebor, A. et al., Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 115, p. 71–83, 2005.
68. Pabreja, K. Dua, K. Sharma, S. Padi, S.S. Kulkarni, S.K. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible

- antiinflammatory and anti-oxidant mechanisms. **Eur. J. Pharmacol.** v. 661, p. 15–21, 2011.
69. Thacker, M.A. Clark, A.K. Marchand, F. McMahon, S.B. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: Immune cells and molecules. **Anesth. Analg.**, v. 105, p. 838–847, 2007.
70. Lyushnenkova, E. Mosca, J.D. Zernetkina, V. Majumdar, M.D. Beggs, K.J. Simonetti, D.W. et al. T cell responses to allogenic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance and suppression. **J. Biomed. Sci.**, v. 12, p. 47-57, 2005.
71. Nemeth, K. Leelahavanichkul, A. Yuen, P.S.T. et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature Medicine**, v. 15, p. 42-49, 2009.
72. Liu, N. Chen, R. Du, H. et al. Expression of IL-10 and TNF-alpha in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells. **Cell Molecular Immunology**, v. 6, p. 207-213, 2009.
73. Li, J. Zhu, H. Liu, Y. et al. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in Macaca Fascicularis. **Brain Research**, epub ahead of print, 2010.
74. Lodge, P.A. Sriram, S. Regulation of microglial activation by TGF- $\beta$ , IL-10, and CSF-1. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, p. 502-508, 1996.
75. Walsh, S. Midha, R. Use of stem cells to augment nerve injury repair. **Neurosurgery**, v. 65, p. A80-86, 2009.
76. Creange, A. Barlovatz-Meimon, G. Gherardi, R. K. Cytokines and peripheral nerve disorders. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 8, p. 145–151, 1997.
77. Fiorentino, D. F. Zlotnik, A. Mosmann, T. R. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, v. 147, p. 3815–3822, 1991.
78. Siniscalco, D. Giordano, C. Galderisi, U. et al. Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular and biomolecular modifications in neuropathic mice. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 5, p. 01-10, 2011.

Figure 1

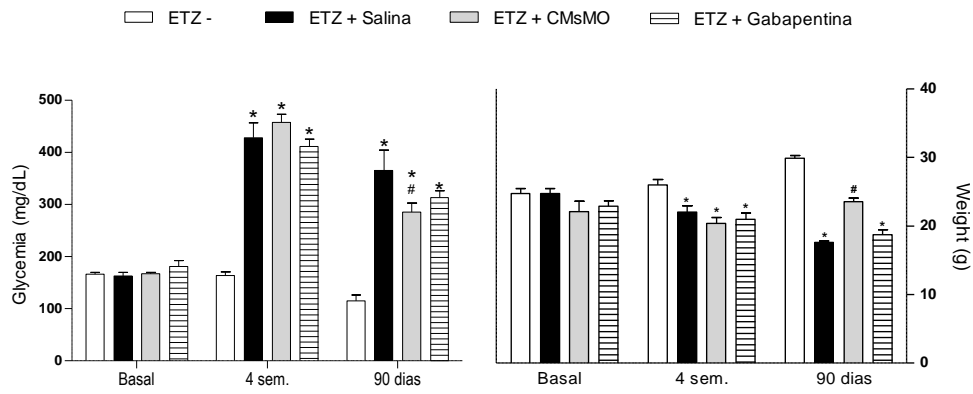


Figure 2

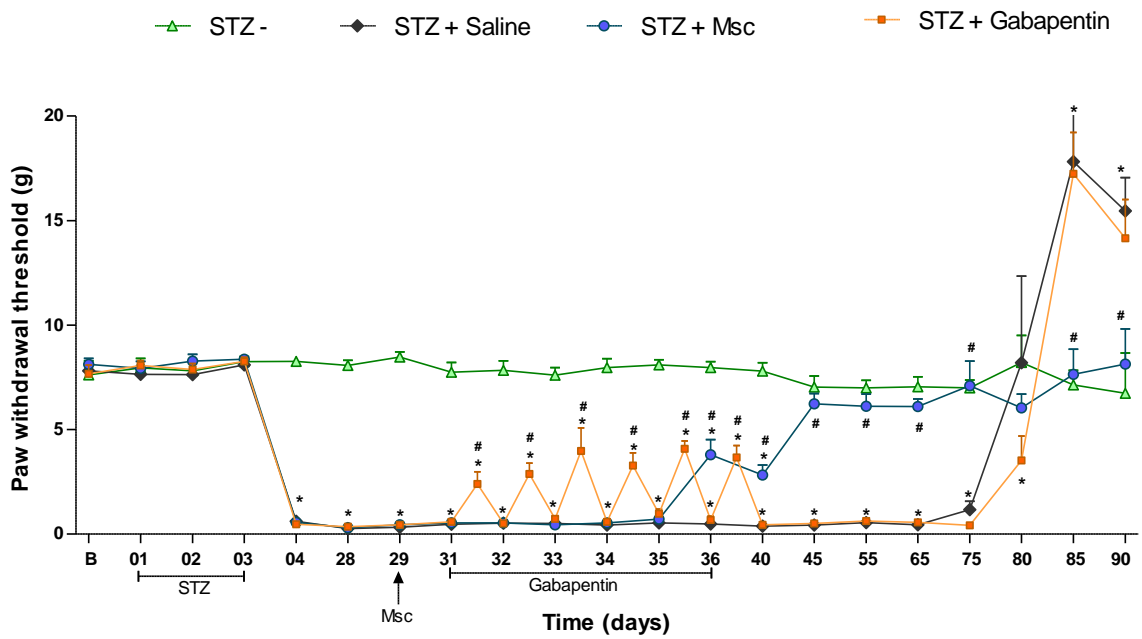


Figure 3

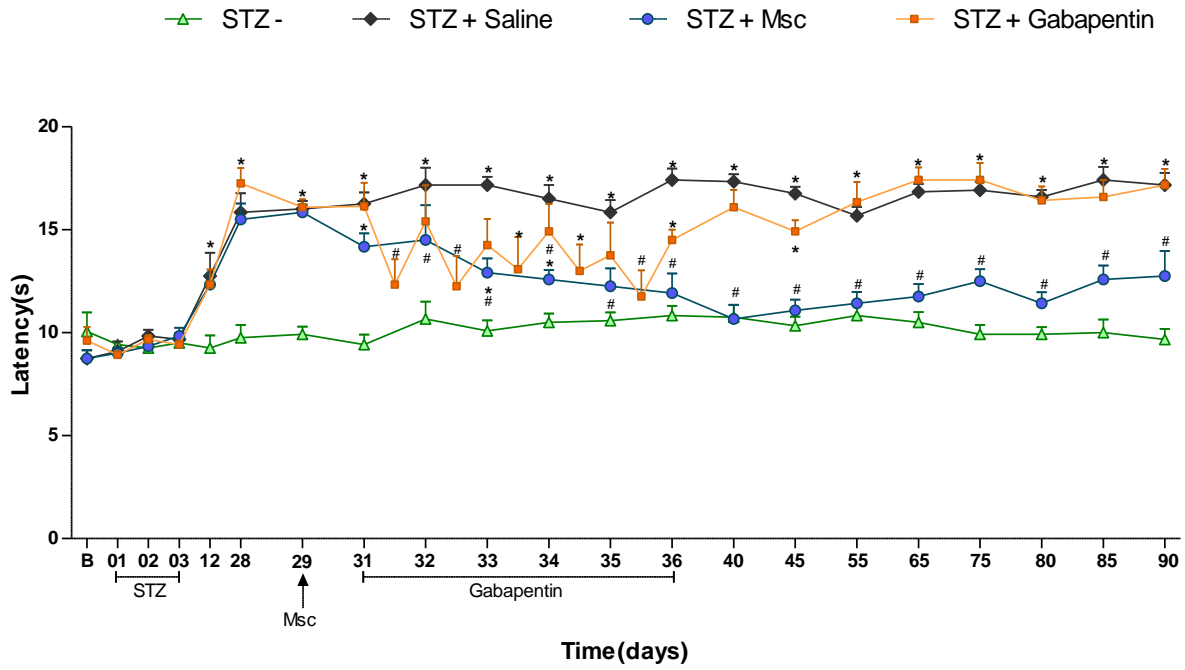


Figure 4

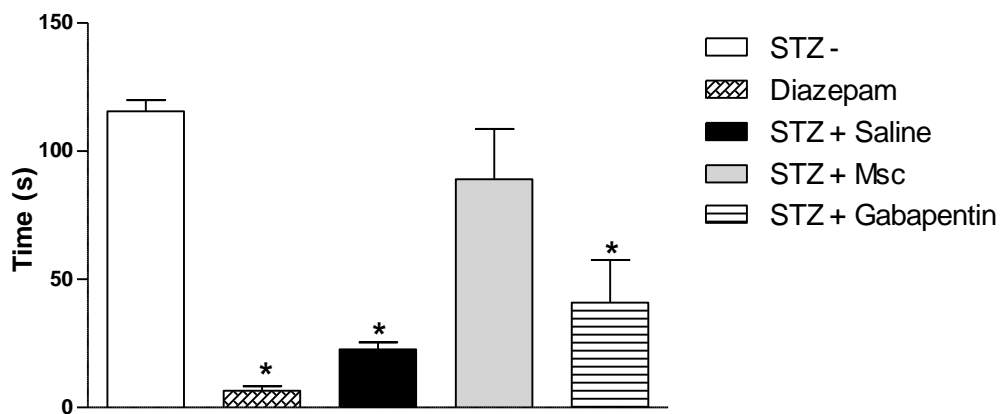


Figure 5

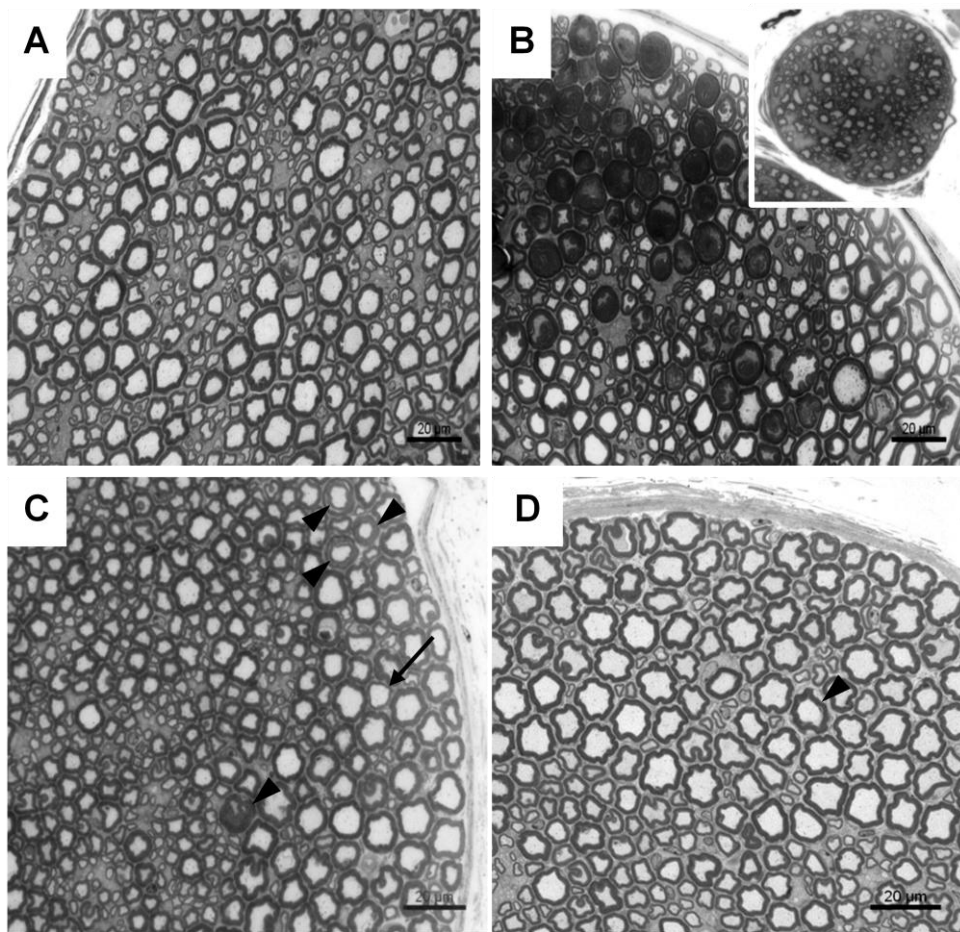


Figure 6

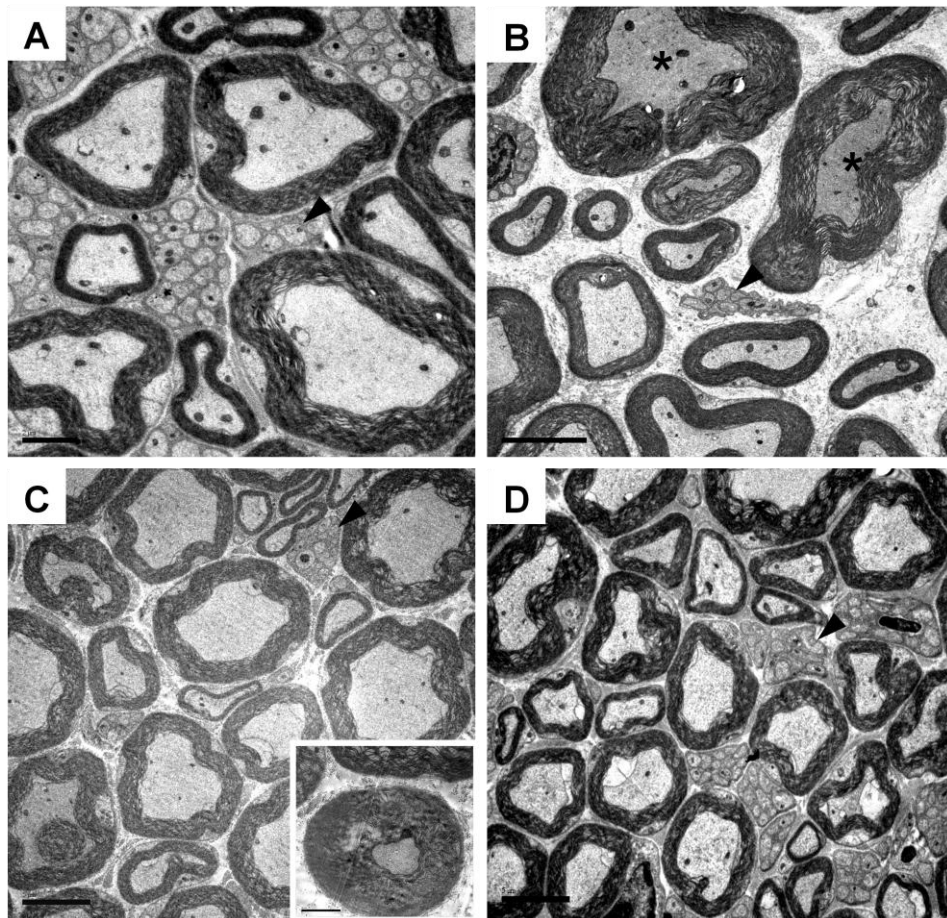


Figure 7

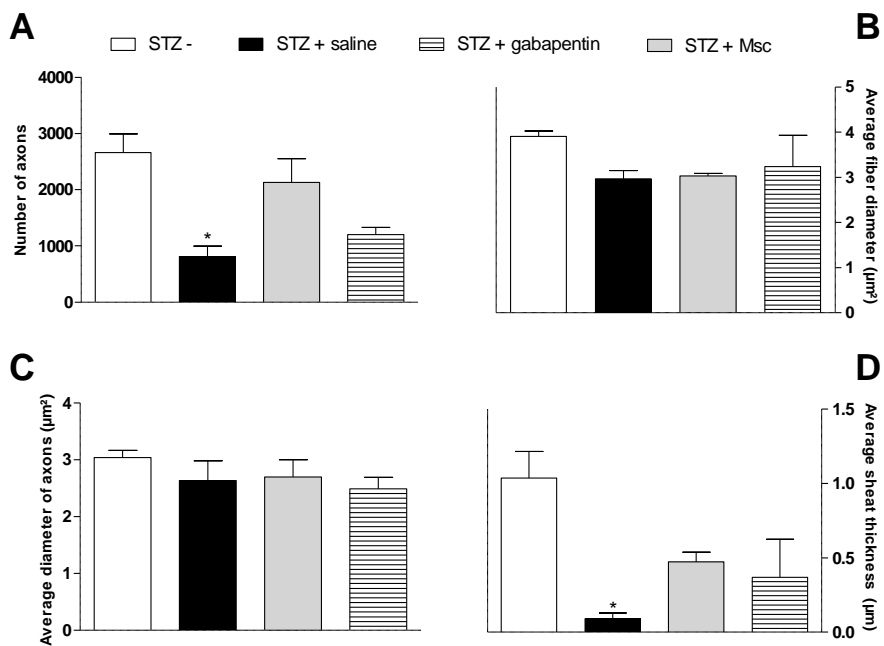


Figure 8

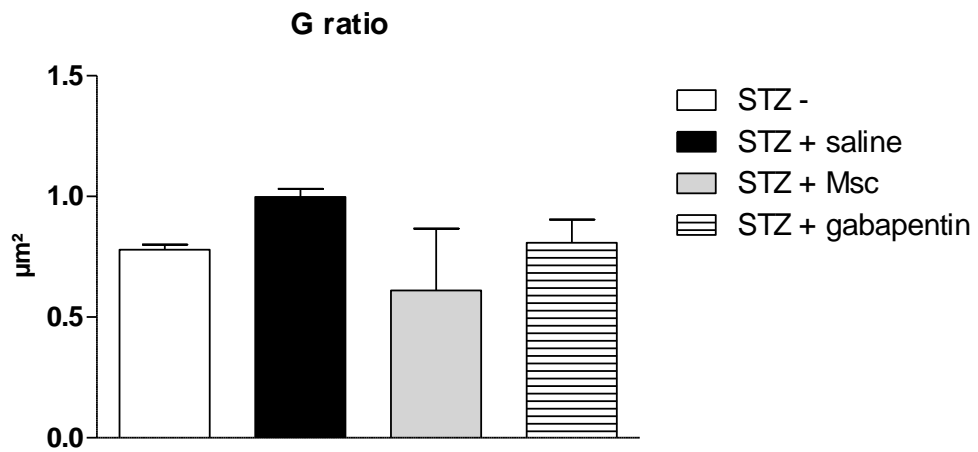
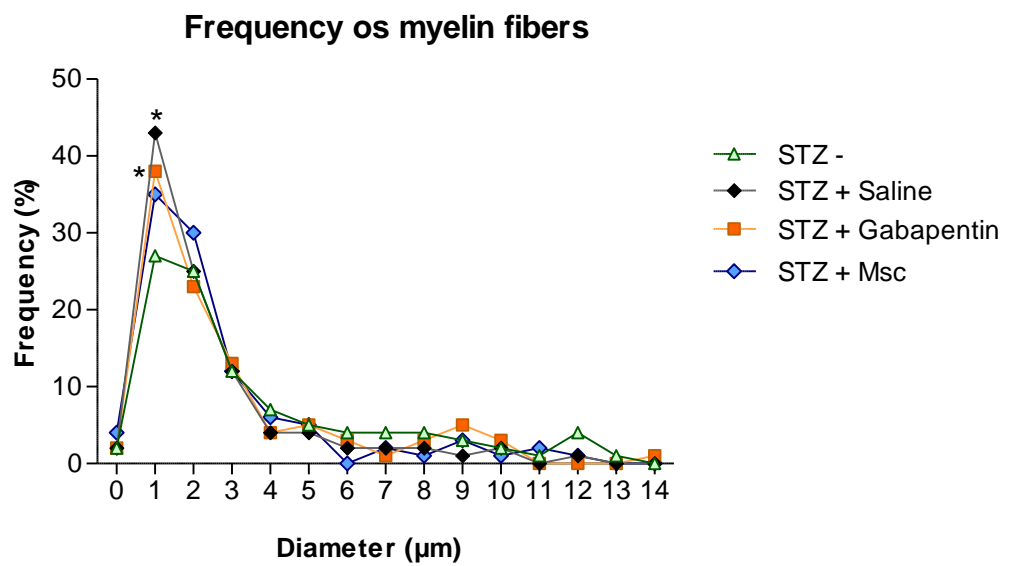


Figure 9







## Legends

**Figure 1: Evaluation of glucose (A) and body weight (B) of the animals during the trial period.** Graphs express measurement of weight and blood glucose over time (0 - Period before inducing diabetes, 28 days after induction of diabetes and before transplantation with MSCs and 90 - final period of the behavioral assessments). Data expressed as mean  $\pm$  SEM for  $n = 06$  animals. \* Statistical significance compared to STZ- ( $p < 0.001$ ). # Statistically significant compared to STZ + saline ( $p < 0.001$ ). The statistical analysis determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

**Figure 2: Effect of MSCs on mechanical nociceptive thresholds of rats with diabetic peripheral neuropathy.** B - before the induction period diabetes, days 01, 02, 03 correspond to the induction period and the model 29 refers to the day of transplantation or with MSCs initiation of treatment with gabapentin, which ends at the 36th day. The ordinate represents the nociceptive threshold in grams. Data were expressed as mean and E.P.M;  $n = 6$  mice per group. \* - Statistical significance regarding the STZ - ( $p < 0.001$ ). # - Statistical significance compared with STZ + saline ( $p < 0.001$ ). Statistical analysis determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

**Figure 3: Effect of MSCs on the thermal nociceptive threshold in neuropathic mice.** B - Period before the diabetes induction, 01-03 period of STZ treatment. The arrow indicates the transplantation of MSCs or initiation of gabapentin treatment (dose once daily for 6 consecutive days). The ordinate represents the paw withdrawal latency in seconds. Data were expressed as mean and E.P.M;  $n = 6$  mice per group. \* - Statistical significance relative to STZ - ( $p < 0.001$ ); # - Statistical significance relative to STZ + saline ( $p < 0.001$ ), as determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

**Figure 4: Effect of MSC transplantation on motor function in mice with diabetic peripheral neuropathy on the rota rod test.** Diazepam (10 mg/kg) was administered intraperitoneally 30 minutes before testing. Data were expressed as mean time in seconds spent in the animal rota rod  $\pm$  SEM of 06 animals per group. \* Statistical significance compared to the STZ - group, determined by One way ANOVA followed by Tukey post-test.

**Figure 5: a cross-sectional photomicrographs of the sciatic nerve in mice.** A - Non-diabetic animal with normal morphological characteristics. B - Histological section of representative sciatic nerve STZ + saline group, there is myelin fibers with large caliber axonal atrophy and myelin sheath loose. Inset - sciatic nerve bundle in smaller increase with reduction of myelin fibers of large caliber density. C - photomicrograph of a representative sciatic nerve STZ + gabapentin group, the arrow tips indicate axonal atrophy and myelin sheath loose and the arrow shows an axon surrounded by a thin myelin sheath. D - Cross-section of mouse sciatic nerve of the STZ group + Msc, there is apparent atrophic process in axon (arrowhead) and the presence of myelin fibers of various calibers with normal morphology. Colour: toluidine blue, bar = 20 $\mu$ m.

**Figure 6: Electron micrographs representative of the sciatic nerve of mice of different groups assessed.** Figure A (STZ -), there is myelin fibers with varying sizes and proportional myelin sheath, including numerous unmyelinated fibers (bar = 2 microns). B - representative of the STZ + saline group Electromicrography with few unmyelinated fibers (arrowhead) and the presence of atrophic axons with loose myelin sheath (\*). C representative of the group - Eletromicrografia STZ + gabapentin with myelin fibers varied sizes and calibers with few unmyelinated fibers (arrowhead). Inset - Axon atrophic with loose myelin sheath. D - Electron

representative group STZ + Msc with myelinated fibers with myelin sheath of varying diameters and a large amount of unmyelinated fibers (arrowhead). Bar = 5 $\mu$ m.

**Figure 7: morphometric parameters of the sciatic nerve of mice in an experimental model of diabetic peripheral neuropathy.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for n = 03 animals. \* Statistical significance compared to STZ- group (p <0.05). Statistical analysis determined by the Kruskal-Wallis test followed by post-test Dunns.

**Figure 8: Mean values of the sciatic nerve G ratio of animals with diabetic peripheral neuropathy.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for n = 03 animals, p <0.05. Statistical analysis determined by the Kruskal-Wallis test followed by post-test Dunns.

**Figure 9: Frequency in percent diameter of myelin fibers.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for n = 03 animals. \* Statistical significance compared to STZ- group (p <0.001). Statistical analysis determined by test Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

**Figure 10: Msc effect on cytokine expression in the L4-L5 spinal cord segment in mice model of peripheral diabetic neuropathy.** Data were expressed as mean and SEM values of cytokine picograms per milligram of protein; n = 6 mice per group. The evaluations were made in the time of 28 days after the induction of the model (before transplantation), 45 days after the induction of the model (15 days after transplantation), and 90 days after induction of the model (60 days after transplantation and at the end of the trial period). \* Statistically significant as compared to the STZ group - (p <0.001). # Statistical significance in relation to the STZ + saline group (p <0.001) .test Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test.