

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa

TESE DE DOUTORADO

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO TERAPÊUTICO DE
CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL**

AFRÂNIO FERREIRA EVANGELISTA

Salvador – Bahia

2019

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO TERAPÊUTICO DE
CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL**

AFRÂNIO FERREIRA EVANGELISTA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof(a). Dra. Cristiane Flora Villarreal

Co-orientadora: Prof(a). Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Salvador - Bahia

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

E92m Evangelista, Afrânio Ferreira.
Mecanismos envolvidos no efeito terapêutico de células mesenquimais de medula óssea em modelo experimental de neuropatia diabética sensorial / Afrânio Ferreira Evangelista. - 2019.
106 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dra. Cristiane Flora Villarreal, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Neuropatias diabéticas. 2. Células mesenquimais. 3. Vesículas extracelulares. 4. Neuropatia. I. Título.

CDU 616.379-008.64

"MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO TERAPÊUTICO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE
MEDULA ÓSSEA EM MODELO EXPERIMENTAL DE NEUROPATIA DIABÉTICA."

AFRÂNIO FERREIRA EVANGELISTA


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 11 de julho de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Joice Maria da Cunha
Professora Associada
UFPR



Dr. Bruno Solano de Freitas Souza
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Jaime Ribeiro Filho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTE DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

FIOCRUZ;

CNPQ;

FAPESB.

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 confiaram em mim e dedicaram todo amor, admiração, carinho e compreensão durante a minha formação.

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

À minha co-orientadora, Dra. Milena Botelho Pereira Soares, por todo apoio e confiança dedicados ao meu crescimento profissional. Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, pelo apoio acadêmico. Ao professor Dr. Marcos André Vannier dos Santos pelo auxílio e colaboração nos estudos de microscopia. Aos professores Dr. Marco Augusto Stimamiglio, Dr. Alejandro Correa Domingues e a toda a equipe do Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco, Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR, em especial Amanda Leitolis, por todo o carinho, atenção, colaboração e ensinamentos passados.

Aos professores Dr. Gúbio Soares Campos e a Dra. Silvia Inês Sardi por todo apoio e disponibilidade dispensados à mim durante o desenvolvimento do trabalho. À Rute Ribeiro Vivas, por sempre me ajudar com carinho e disponibilidade nas minhas dúvidas administrativas, juntamente com os profissionais da biblioteca do IGM-FIOCRUZ/BA pelo carinho e disponibilidade a mim dispensados. Aos pais que a Bahia me deu: 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, e a família LETI. Tenho grande apreço e admiração por todos, vocês são especiais.

Aos amigos do CBTC, especialmente Daniela, Girlaine, Roquelina, Caroline e Carine Azevedo pela colaboração e disposição em ajudar sempre que necessário.

À equipe dos biotérios do CBTC e do IGM e à espetacular equipe do Serviço de Microscopia Eletrônica do IGM, pela atenção e companheirismo dedicados a mim. Muito obrigado por tudo!

Aos amigos que conquistei nesta cidade e vou levar para sempre em minha vida, Anderson Suzart, Thaigo Cardoso, Hugo Vasconcelos, Fábio Vieira Vilela, Gisele Graça Leite dos Santos, Emanuele de Souza e Wagno Alcântara, sem esquecer de Candace Andrade, Carol da Guarda, Igor Ives, Jaqueline Góis, Maíra Silva, Marcus Vinicius, Regina Nascimento e Tayane Fernandes. Vocês são a família que escolhi para ter aqui, muito obrigado por tudo!

Por último, 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!

“Nada te perturbe, nada te espante.

Tudo passa, a paciência tudo alcança.

Quem Deus tem nada lhe falta.

Só Deus basta!”

EVANGELISTA, Afrânio Ferreira. Mecanismos envolvidos no efeito terapêutico de células mesenquimais de medula óssea em modelo experimental de neuropatia diabética sensorial. 2019. 105 f. Tese Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A neuropatia diabética sensorial (NDS) é uma das mais comuns complicações do diabetes que se manifesta por distúrbios sensitivos crônicos como dor neuropática e perda de sensibilidade, os quais contribuem para o desenvolvimento do pé diabético, podendo resultar em ulceração e amputação do membro afetado. Diante deste cenário, em função de suas propriedades regenerativas e analgésicas, células mesenquimais de medula óssea (CMsMO) têm sido consideradas promissoras no tratamento das neuropatias em relação a terapêutica atual disponível. **OBJETIVO:** Investigar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito terapêutico das CMsMO em modelo murinho de NDS. **MÉTODOS:** Quatro semanas após a indução do modelo por estreptozotocina (STZ), camundongos C57Bl/6 (CEUA L-IGM-025/11) receberam uma administração endovenosa de CMsMO (1×10^6), salina ou gabapentina (70 mg/kg, v.o., 12h/12h por 6 dias) e os limiares nociceptivos térmico (hargreaves) e mecânico (filamentos de von Frey) foram avaliados por 12 semanas. Na 12ª semana, segmentos do nervo isquiático foram coletados para avaliações histológicas por microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Amostras de nervo isquiático, medula espinal, gânglio da raiz dorsal (GRD), baço e fígado foram recolhidas para pesquisa das CMsMO transplantadas por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR), assim como a porção L4-L5 da medula espinal foi coletada para análise da expressão de fatores antioxidantes e quantificação de produtos do estresse oxidativo. O perfil de ativação de micróglia, astrócitos e níveis de expressão de galectina-3 na medula espinal foram avaliados por imunofluorescência. Para investigar a hipótese da ação paracrina, o efeito do meio condicionado obtido do cultivo de CMsMO (MC-CMsMO) ou vesículas extracelulares derivadas de CMsMO (VEs-CMsMO) sobre o limiar nociceptivo foi avaliado e VEs-CMsMO foram caracterizadas quanto a sua morfologia, tamanho, quantidade e conteúdo proteico. **RESULTADOS:** O tratamento com CMsMO reduziu a alodinia mecânica e a hipoalgesia térmica, igualando os limiares nociceptivos de animais neuropáticos. Os esqueletos do grupo naive. Por outro lado, o tratamento com gabapentina (70mg/kg) reduziu a alodinia e a hipoalgesia somente durante o protocolo de administração do fármaco. Análises por microscopia mostraram que animais com neuropatia apresentaram atrofia axonal, redução do número de fibras mielínicas, atipia mitocondrial e redução da área e densidade das fibras amielínicas no nervo isquiático e que o transplante com CMsMO preveniu o desenvolvimento de tais alterações histológicas no nervo, bem como o aumento dos níveis de expressão de fatores antioxidantes, nitrito e MDA na medula de animais com NDS. Animais neuropáticos apresentaram aumento no número de astrócitos e micróglia ativadas, assim como expressão de galectina-3 na medula espinal. Este efeito foi inibido pelo transplante de CMsMO, evidenciando a ação moduladora das CMsMO na neuroinflamação espinal. O rastreamento das células transplantadas demonstrou que estas possuem tendência em migrar para órgãos filtrantes e ainda assim produzir efeito, evidenciando uma ação paracrina. Em linha com esta hipótese, a infusão do MC-CMsMO em animais diabéticos conseguiu reverter os parâmetros comportamentais da neuropatia sensorial de forma semelhante ao tratamento com CMsMO. Resultados da caracterização das VEs-CMsMO mostraram vesículas com tamanho entre 100-500nm, porém a análise do seu proteoma revelou-se inconclusiva. Contudo, a administração de VEs-CMsMO foi capaz de produzir efeito antinociceptivo,

levando os limiares nociceptivos de animais com neuropatia a níveis similares ao de animais saudáveis. **CONCLUSÃO:** Este conjunto de resultados mostram que o transplante de CMsMO ou infusão do MC-CMsMO ou VEs-CMsMO foram capazes de reverter os parâmetros comportamentais indicativos de dor neuropática e que, além dos efeitos neuroprotetores de CMsMO no nervo periférico, sua ação parácrina pode ser responsável pela modulação da neuroinflamação espinal, podendo esta ser considerada como um importante mecanismo pelo qual as células mesenquimais induzem efeitos terapêuticos durante a neuropatia diabética sensorial.

PALAVRAS-CHAVE: Neuropatia diabética sensorial, Células mesenquimais, Meio condicionado, Vesículas extracelulares, Neuroinflamação.

EVANGELISTA, Afrânio Ferreira. Mechanisms involved in the therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal cells in an experimental model of diabetic sensory neuropathy. 2019. 105 f. Tese Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Sensory diabetic neuropathy (SDN) is one of the most common complications of diabetes manifested by chronic sensory disorders such as neuropathic pain and loss of sensation, which contribute to the development of the diabetic foot, which may result in ulceration and amputation of the affected limb. Given this scenario, due to their regenerative and analgesic properties, bone marrow mesenchymal cells (BM-MSC) have been considered promising in the treatment of neuropathies in relation to current available therapy. **AIM:** To investigate the possible mechanisms involved in the therapeutic effect of BM-MSC in a murine SDN model. **METHODS:** Four weeks after streptozotocin (STZ) model induction, C57Bl/6 mice (CEUA L-IGM-025/11) received intravenous administration of BM-MSC (1x10⁶), saline or gabapentin (70 mg / kg, vo, 12h / 12h for 6 days) and the thermal (hargreaves) and mechanical (von Frey filaments) nociceptive thresholds were evaluated for 12 weeks. At week 12, sciatic nerve segments were collected for histological evaluations by light and transmission electron microscopy. Samples of sciatic nerve, spinal cord, dorsal root ganglion (DRG), spleen, and liver were collected for quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) transplanted BM-MSC, as well as the L4-L5 portion of the spinal cord was collected. for analysis of the expression of antioxidant factors and quantification of oxidative stress products. The activation profile of microglia, astrocytes and levels of galectin-3 expression in the spinal cord were evaluated by immunofluorescence. To investigate the hypothesis of paracrine action, the effect of conditioned media obtained from culturing BM-MSC (CM-BM-MSC) or extracellular vesicles derived from BM-MSC (EVs-BM-MSC) on the nociceptive threshold was evaluated and VEs-BM-MSC were characterized for morphology, size, quantity and protein content. **RESULTS:** BM-MSC treatment reduced mechanical allodynia and thermal hypoalgesia by equalizing the nociceptive thresholds of neuropathic animals to those in the naive group. Conversely, gabapentin treatment (70mg/kg) reduced allodynia and hypoalgesia only during the drug administration protocol. Microscopic analysis showed that animals with neuropathy had axonal atrophy, reduced number of myelin fibers, mitochondrial atypia, and reduced area and density of myelinic fibers in the sciatic nerve and that transplantation with BM-MSC prevented the development of such histological changes in the nerve, as well as as increased levels of expression of antioxidant factors, nitrite and MDA in the marrow of animals with SDN. Neuropathic animals showed increased number of activated astrocytes and microglia, as well as expression of galectin-3 in the spinal cord. This effect was inhibited by BM-MSC transplantation, showing modulating action of BM-MSC on spinal neuroinflammation. Screening of transplanted cells showed that they have a tendency to migrate to filtering organs and still produce effect, showing a paracrine action. In line with this hypothesis, CM-BM-MSC infusion in diabetic animals was able to reverse the behavioral parameters of sensory neuropathy similarly to BM-MSC treatment. Results of the characterization of the EVs-BM-MSC showed vesicles with size between 100-500nm, but the analysis of their proteome proved inconclusive. However, the administration of EVs-BM-MSC was able to produce antinociceptive effect, bringing nociceptive thresholds of animals with neuropathy to similar levels to healthy animals. **CONCLUSION:** This set of results show that BM-MSC transplantation, CM-BM-MSC or EVs-BM-MSC infusion were able to reverse behavioral parameters indicative of neuropathic pain and that, in addition to the neuroprotective effects of

BM-MSC on the peripheral nerve, its paracrine action may be responsible. by modulation of spinal neuroinflammation, which can be considered as an important mechanism by which mesenchymal cells induce therapeutic effects during sensory diabetic neuropathy.

KEYWORDS: Sensory diabetic neuropathy, Mesenchymal cells, Conditioned medium, Extracellular vesicles, Neuroinflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Potenciais efeitos neuroprotetores e neuroregeneradores das CMsMO.	33
Figura 2: Delineamento experimental.	46
Figura 3: Cultura de CMsMO em diferenciação em células das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, observadas por microscopia óptica de contraste de fase	48
Figura 4: Variação do peso corporal e glicemia dos animais durante o período experimental	49
Figura 5: Efeito do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos em modelo de neuropatia diabética sensorial.	51
Figura 6: Efeito do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de neuropatia diabética sensorial.	53
Figura 7: Efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre aspectos morfológicos das fibras mielinizadas do nervo isquiático de camundongos diabéticos.	55
Figura 8: Efeito do transplante de CMsMO sobre a quantificação das alterações morfológicas encontradas nas fibras mielinizadas de camundongos com NDS.	56
Figura 9: Efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos com neuropatia diabética sensorial.	58
Figura 10: Efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre a morfologia de fibras amielínicas no nervo isquiático de camundongos com neuropatia diabética sensorial.	60
Figura 11: Efeito de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre a atipia mitocondrial em fibras mielínicas e amielínicas do nervo isquiático de camundongos no modelo de neuropatia diabética sensorial.	62

Figura 12: Efeito do transplante de CMsMO sobre o perfil de expressão de fatores antioxidantes na medula espinal de camundongos com neuropatia diabética.	63
Figura 13: Transplante de CMsMO reduz os níveis de nitrito e MDA na medula espinal de camundongos com neuropatia diabética.	64
Figura 14: Efeito de CMsMO sobre a ativação de astrócitos e micróglia no corno dorsal da medula espinal de camundongos no modelo de neuropatia diabética sensorial.	66
Figura 15: Efeito do transplante de CMsMO sobre a expressão de Gal-3 em células gliais no corno dorsal da medula espinal de camundongos no modelo de neuropatia diabética.	68
Figura 16: Rastreamento das CMsMO transplantadas.	69
Figura 17: Efeito do meio condicionado de células mesenquimais de medula óssea (MC-CMsMO) sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos em modelo de neuropatia diabética.	70
Figura 18: Efeito do meio condicionado de células mesenquimais de medula óssea (MC-CMsMO) sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de neuropatia diabética.	71
Figura 19: Caracterização e quantificação das VEs derivadas de células mesenquimais de medula óssea.	73
Figura 20: Efeito das vesículas extracelulares de células mesenquimais de medula óssea (VEs-CMsMO) sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos em modelo de neuropatia diabética.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Expressão de marcadores de superfície celular das CMsMO	47
Tabela 2: Lista das 42 proteínas identificadas no proteoma de VEs-CMsMO.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	<i>Advanced glycation end products</i>
ALA	<i>Alpha-lipoic acid</i>
ALC	<i>Acetyl-l-carnitine</i>
AMP	Adenosina 3',5'-monofosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAT	Catalase
CD29	<i>Cluster of Differentiation 117</i>
CD11b	<i>Cluster of Differentiation 11b</i>
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CD45	<i>Cluster of Differentiation 45</i>
CD73	<i>Cluster of Differentiation 73</i>
CD90	<i>Cluster of Differentiation 90</i>
CDMA	Corno Dorsal da Medula Espinal
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
CMsMO	Células mesenquimais de medula óssea
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
DAG	Diacilglicerol
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Gal-3	Galectina - 3
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GBP	Gabapentina

GDP	Trifosfato de guanosina
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFAT	<i>glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferas</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLUT4	Transportador de glicose 4
GPX-3	Glutationa Peroxidase 3
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
Iba1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
ICC- FIOCRUZ	Instituto Carlos Chagas – Fundação Oswaldo Cruz
IFD	International Federation of Diabetes
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL-10	Interleucina - 10
IL-1 β	Interleucina - 1 β
IL-6	Interleucina - 6
Kg	Quilogramas
ISRSN	Inibidor de recaptação de serotonina e noradrenalina
KDA	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
LAFTE	Laboratório de Farmacologia e Terapia Experimental
LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
MAG	<i>Myelin-associated glycoprotein</i>
MC-CMsMO	Meio condicionado de células mesenquimais de medula óssea
MDA	<i>3,4-Metilenodioxianfetamina</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg	Miligramas
Micro RNA	Pequenas moléculas endógenas de ácido ribonucléico não codificantes
mL	Mililitros
MMPs	Metaloproteinases
μ l	Microlitro
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>

ND	Neuropatia diabética
NDP	Neuropatia diabética periférica
NDS	Neuropatia diabética sensorial
NFκB	<i>Nuclear fator kappa B</i>
NGF	Fator de crescimento nervoso
NMDA	<i>N-metil D-Aspartato</i>
NO	Óxido nítrico
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
NTC	<i>Negative Temperature Coefficient</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PBM	Proteína básica da mielina
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldeído
pH	potencial Hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
PPGBSMI	Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
P0	Proteína zero da mielina
RT - qPCR	<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RAGEs	Receptor de produtos de glicação avançada
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SCA-1	<i>Stem cells antigen-1</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SOD-1	Cobre Zinco Superóxido Desmutase 1
SP	Substância P
SpI	<i>Specificity Protein 1</i>
STZ	Estreptozotocina
TBA	Tetrabutylammonium
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>

TGF- α	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis fator α</i>
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
UDPGlcNAC	Uridina difosfato N-acetilglucosamina
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VEs	Vesículas extracelulares
VE-CMsMO	Vesículas extracelulares de células mesenquimais de medula óssea
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	OBJETIVOS	20
2.1	GERAL	20
2.2	ESPECÍFICOS.....	20
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1	DIABETES MELITO.....	21
3.1.1	Neuropatia diabética.....	22
3.1.2	Neuropatia diabética sensorial	24
3.1.2	Tratamento da neuropatia diabética sensorial.....	26
3.2	TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO.....	28
3.2.2	Células mesenquimais e neuropatia sensorial	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	ANIMAIS	37
4.2	MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA 37	
4.3	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO - FILAMENTOS DE VON FREY	37
4.4	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO - HARGREAVES	38
4.5	ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	38
4.6	CITOMETRIA DE FLUXO	39
4.7	DIFERENCIAÇÃO IN VITRO.....	39
4.8	OBTENÇÃO DE MC-CMSMO.....	41
4.9	OBTENÇÃO DE VES-CMSMO.....	41
4.10	CARACTERIZAÇÃO DE VES-CMSMO	41
4.11	ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO NERVO ISQUIÁTICO	42
4.12	DETERMINAÇÃO DE NITRITO	44
4.13	DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA).....	44
4.14	ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	45
4.15	RT-qPCR	46
4.16	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	47

5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
6.	RESULTADOS	49
6.1	CARACTERIZAÇÃO DE CMSMO	49
6.2	EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL E GLICEMIA DOS CAMUNDONGOS NO MODELO DE NEUROPATIA DIABÉTICA	51
6.3	EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO DE CAMUNDONGOS COM NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL .	52
6.4	EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO	54
6.5	EFEITO DE CMSMO SOBRE A MORFOLOGIA DAS FIBRAS MIELINIZADAS DO NERVO ISQUIÁTICO DE CAMUNDONGOS COM NDS	56
6.6	EFEITO DE CMSMO SOBRE A MORFOMETRIA DAS FIBRAS MIELINIZADAS DO NERVO ISQUIÁTICO DE CAMUNDONGOS NEUROPÁTICOS	59
6.7	EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE AS FIBRAS AMIELÍNICAS DO NERVO ISQUIÁTICO DE ANIMAIS COM NDS	61
6.8	EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE A MORFOLOGIA E MORFOMETRIA MITOCONDRIAL EM FIBRAS MIELÍNICAS E AMIELÍNICAS	63
6.9	EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE A EXPRESSÃO DE FATORES ANTIOXIDANTES NA MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS NO MODELO DE NDS	65
6.10	EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE OS NÍVEIS ESPINAIS DE NITRITO E MDA EM CAMUNDONGOS NO MODELO DE NDS	66
6.11	EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE A ATIVAÇÃO DE ASTRÓCITOS E MICRÓGLIA NO CORNO DORSAL DA MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS NO MODELO DE NDS	67
6.12	EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE A EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 NO CORNO DORSAL DA MEDULA ESPINAL DURANTE A NDS EXPERIMENTAL	69
6.13	RASTREIO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA TRANSPLANTADAS EM ANIMAIS COM NDS	71
6.14	EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DE CMSMO SOBRE A ALODINIA MECÂNICA EM CAMUNDONGOS COM NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL	72
6.15	EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DE CMSMO SOBRE A HIPOALGESIA TÉRMICA EM CAMUNDONGOS COM NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL	73
6.16	CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA	74
6.17	CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E COMPARAÇÃO COM UM BANCO PÚBLICO DE DADOS.....	76
6.18	EFEITO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CMSMO SOBRE A ALODINIA MECÂNICA EM CAMUNDONGOS COM NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL	78

6	DISCUSSÃO	80
7	CONCLUSÃO	88
8	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICE: Produções científicas durante o período do Doutorado	106
	Artigo original publicado 1:	106
	Artigo original publicado 2:	106
	Artigo original publicado 3:	106
	Artigo original publicado 4:	106
	Artigo original publicado 5:	106

1. INTRODUÇÃO

O diabetes é uma das principais síndromes que acometem o ser humano. Com prevalência mundial estimada de 463 milhões e cerca de 16,8 milhões de brasileiros afetados (Federação Internacional do Diabetes – IDF, 2019), 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 sensorial (NDS), que acomete cerca de 50% dos pacientes diabéticos (BOULTON et al., 2005; EDWARDS et al., 2008). A NDS 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 (TESFAYE, 2007a; VINIK et al., 2008). Dos sintomas que apontam para o seu desenvolvimento, os mais encontrados são os sensoriais 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; DELI et al., 2014).

A dor neuropática pode se manifestar de várias formas, como por exemplo, dor paroxística, dor evocada por estímulos não nocivos (alodinia), aumento da intensidade da dor induzida por estímulos nocivos (hiperalgesia) ou como uma combinação paradoxal de perda sensorial e hiperalgesia (GALVÃO, 2005). Nesses casos, o tratamento farmacológico de primeira escolha é baseado no uso de medicamentos de ação central, como os anticonvulsivantes (como gabapentina, pregabalina, carbamazepina e lamotrigina) e antidepressivos (como amitriptilina e imipramina). Esses fármacos possuem eficácia moderada na redução da dor e em apenas 50% dos pacientes tratados. Além disso, não possuem ação curativa, atuando apenas como tratamento paliativo (PELTIER et al., 2014), e provocam uma série de efeitos adversos, comprometendo a adesão do paciente ao tratamento ou reduzindo sua qualidade de vida. Além da dor neuropática, a diminuição da sensibilidade cutânea em pacientes diabéticos também representa uma condição clínica debilitante, pois torna os pés vulneráveis a traumas, resultando em ulceração, a qual possui uma elevada taxa de infecção e consequentemente pode provocar a amputação do membro (IRAJ et al., 2013). Diante disso, o desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos e medicamentos visando o adequado controle da neuropatia sensorial de origem diabética torna-se prioritário.

Uma estratégia para a regeneração ou restabelecimento funcional do tecido nervoso lesionado é o uso de células-tronco (SYKOVÁ et al., 2006; JESUS et al., 2011; PAN et al., 2017; ZHANG, X. et al., 2017; ZHENG et al., 2019). Estas são células indiferenciadas que possuem a capacidade de autorrenovação e de se diferenciar em vários tipos celulares, podendo

ser de origem embrionária ou adulta (SANTOS et al., 2011). 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, por meio da reposição de células destruídas por lesões ou doenças, e pela liberação de fatores parácrinos que estimulam a regeneração (WAGERS e WEISSMAN, 2004; LI et al., 2014). Na última década, o potencial terapêutico de células-tronco nas neuropatias tem sido proposto. A administração de diferentes tipos de células-tronco reduz a dor neuropática comportamental em modelos experimentais (SINISCALCO et al., 2011; CHEN et al., 2017; SUN et al., 2017) e em pacientes (SHIN et al., 2015; VAQUERO et al., 2017). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram pela primeira vez o efeito antinociceptivo de células-tronco na neuropatia diabética experimental (GUIMARÃES et al., 2013a; EVANGELISTA, 2014). Esses trabalhos mostraram que o tratamento com CMsMO reverte a neuropatia sensorial comportamental e reduz as alterações morfológicas no nervo isquiático de camundongos com neuropatia diabética. Entretanto, os mecanismos envolvidos nos efeitos das CMsMO durante a neuropatia sensorial não são ainda bem compreendidos.

Em detrimento às teorias iniciais de diferenciação e fusão celular, tem sido amplamente aceito que os efeitos terapêuticos de células mesenquimais decorrem de sua ação parácrina (SEO e CHO, 2012). Em linha com essa hipótese, tem sido demonstrado que o secretoma de células mesenquimais induz efeitos terapêuticos similares aos das células *per se* em diferentes condições experimentais (MARTINS et al., 2017; OGATA et al., 2017; SEVIVAS et al., 2017), incluindo as propriedades neuroprotetoras (LIANG et al., 2014). O secretoma de células mesenquimais é constituído por fatores solúveis e vesículas extracelulares (VEs) que contém moléculas biologicamente ativas como fatores de crescimento, citocinas e RNAs (BEER et al., 2017). As VEs são classificadas em exossomas, corpos apoptóticos e microvesículas e estão envolvidas na comunicação, sinalização e morte celular. Estas podem ser liberadas na corrente sanguínea, chegar a órgãos distantes e alterar o metabolismo de células e tecidos (LÁZARO-IBÁÑEZ et al., 2014; BEER et al., 2017). Recentemente, a contribuição das VEs derivadas de células mesenquimais para as ações terapêuticas dessas células tem sido proposta (PHINNEY e PITTENGER, 2017). Seus efeitos terapêuticos foram observados em modelos experimentais de doença renal, lesão hepática aguda, infarto do miocárdio e lesão encefálica (HE et al., 2012; BIAN et al., 2014; ANGULSKI et al., 2017; CHEN et al., 2017; DROMMELSCHMIDT et al., 2017). Entretanto, a contribuição de VEs derivadas de CMsMO para os efeitos da terapia celular na neuropatia diabética ainda não foi estabelecida.

Diante do exposto acima, a presente tese foi delineada para investigar possíveis mecanismos de ação de CMsMO durante a neuropatia sensorial diabética, avaliando parâmetros bioquímicos, celulares e estruturais envolvidos na fisiopatologia da neuropatia diabética. Em adição, a hipótese do mecanismo da ação parácrino de CMsMO foi investigada, pela avaliação do efeito do secretoma e VEs derivados de CMsMO sobre a neuropatia sensorial comportamental.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar possíveis mecanismos de ação das CMsMO durante a neuropatia sensorial diabética em modelo murino.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efeito do transplante de CMsMO sobre as alterações de sensibilidade dos camundongos em modelo de neuropatia sensorial diabética;
- Verificar se o transplante de CMsMO reduz as alterações morfológicas e morfométricas no nervo isquiático de camundongos com neuropatia diabética;
- Avaliar se o transplante de CMsMO modula a ativação glial e expressão de galectina-3 na medula espinal de animais com neuropatia diabética;
- Demonstrar se o transplante de CMsMO modula o estresse oxidativo espinal presente na neuropatia diabética;
- Investigar a biodistribuição e tempo de permanência das CMsMO transplantadas nos tecidos dos camundongos tratados;
- Isolar e caracterizar as VEs derivadas de CMsMO;
- Verificar se o meio condicionado de cultura de CMsMO e VE derivadas de CMsMO são capazes de reduzir as alterações de sensibilidade dos camundongos com neuropatia diabética, comparando seus efeitos aos das CMsMO.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIABETES MELITO

O diabetes melito (DM) é uma das principais síndromes que acometem o ser humano, e compreende 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 Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), existem quatro tipos de DM. O DM do tipo 1 é caracterizado pela destruição das células β pancreáticas por processo autoimune; o tipo 2 decorre de alterações na ação ou secreção da insulina, estando intimamente relacionado com a obesidade; o DM gestacional, diagnosticado durante a gravidez; e tipos específicos de DM, causados por processos como infecção, defeitos genéticos na função das células β , induzida por medicamentos, agentes químicos, entre outros (DE OLIVEIRA et al., 2000).

De acordo com a OMS, uma pandemia de diabetes está em curso em virtude do envelhecimento da população, urbanização, má qualidade de vida e sedentarismo (OMS, 1999). Dados recentes da Federação Internacional do Diabetes indicam que a cada 11 adultos, 1 possui a doença. Isso corresponde a uma prevalência mundial estimada em 463 milhões de pessoas afetadas, sendo que cerca de 40% dos diabéticos residentes nas Américas central e do sul ainda não foram diagnosticados. Neste contexto, o Brasil é o quinto país com maior número de diabéticos, possuindo cerca de 16,8 milhões de pessoas afetadas, ficando em terceiro lugar no ranking dos países que mais possuem despesas referentes ao tratamento e prevenção de DM (IDF ATLAS, 2019).

Além de provocar altos custos financeiros 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., 2002), problemas renais (AL-RUBEAN et al., 2014) e vasculopatias (MUREA et al., 2012). Dentre essas complicações se destaca a neuropatia diabética sensorial, que acomete cerca de 50% dos pacientes que possuem diabetes há mais de 25 anos (CANDRILLI et al., 2007).

3.1.1 Neuropatia diabética

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 pacientes diabéticos (TESFAYE, 2007b; VINIK et al., 2008). Dentre os vários tipos, a polineuropatia simétrica e distal é a forma mais comum de neuropatia diabética, com uma prevalência que pode variar de 8% em pacientes diagnosticados precocemente, a mais de 50% em indivíduos diabéticos diagnosticados há mais de 25 anos. Esta pode ser caracterizada pela presença de anormalidades sensoriais crônicas como dor neuropática coexistente com perda de sensibilidade (EDWARDS et al., 2008; OBROSOVA, 2009; ZIEGLER, 2009; TEFAYE et al., 2010).

Já é conhecido que a hiperglicemia persistente é o principal fator de risco para o desenvolvimento da neuropatia diabética, porém fatores como idade avançada, duração da doença e sedentarismo também contribuem para seu agravo (EDWARDS et al., 2008). Neste sentido, vários mecanismos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas à neuropatia diabética, entre eles: o aumento do fluxo da glicose para a via do polioliol e das hexosaminas, ativação excessiva ou inapropriada da proteína quinase C (PKC), o acúmulo de produtos finais de glicação avançada e o estresse oxidativo (YAGIHASHI et al., 2011).

O aumento da concentração de glicose intracelular em tecidos insulino-independentes pode ativar vias acessórias do metabolismo da glicose, tais como a via do polioliol, a qual envolve a redução da glicose em sorbitol pela aldose redutase e sua reoxidação em frutose. O excesso de sorbitol e frutose podem promover aumento do influxo de água comprometendo a osmolaridade celular. No sistema nervoso periférico, o acúmulo de sorbitol, por apresentar semelhança estrutural com o mio-inositol, reduz a captação deste importante regulador da bomba sódio-potássio ATPase neuronal, provocando diminuição da velocidade da condução do nervo. Além disso, esta via é capaz de inibir a produção de potentes vasodilatadores pelas células endoteliais como o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina, contribuindo para a redução do fluxo sanguíneo no nervo (YAGIHASHI et al., 2011; FELDMAN et al., 2017).

O aumento de glicose intracelular pode ainda ativar a via das hexosaminas. Neste processo, o excesso de frutose-6-fosfato, um metabólito intermediário da via glicolítica, pode ser desviado e convertido através da enzima glutamina-frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT) em glicosamina-6-fosfato. Esta é posteriormente processada em uridina difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), a qual pode aumentar a atividade do fator de transcrição SpI

e consequente aumento da expressão de proteínas envolvidas na patogênese das complicações vasculares encontradas no nervo diabético, tais como aumento do fator transformador do crescimento- α (TGF- α) e TGF- β 1, além do inibidor da ativação do plasminogênio (PAI-1) (LEINNINGER et al., 2004; BUSE, 2006; OYENIHI et al., 2015)

O excesso de glicose pode também promover a formação de um mensageiro lipídico ativador da PKC, o diacilglicerol (DAG). A ativação da PKC promove a fosforilação da NADPH-oxidase culminando na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e início de uma cascata de sinalização intracelular que resultará em ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da atividade da endotelina-1, potente vasoconstritor, contribuindo para redução do fluxo sanguíneo e hipóxia do nervo (HOSSEINI; ABDOLLAHI, 2013; VOLPE et al., 2018).

Outro fator de grande importância para a fisiopatologia da neuropatia diabética é a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês – advanced glycation end-products), resultantes da glicação não-enzimática de proteínas, nucleotídeos e lipídios (BHATTACHARJEE et al., 2017). Estes podem modificar proteínas como a albumina, assim como moléculas intracelulares envolvidas na regulação gênica, ativando o seu receptor celular e interferindo na sinalização entre a matriz e a célula. A ativação dos receptores de AGEs (RAGEs), estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (BROWNLEE, 2005; CREAGER et al., 2006; DEWANJEE et al., 2018). Nos neurônios, a ativação destes receptores também podem induzir a produção de EROs via NADPH oxidase, promovendo distúrbios bioquímicos prejudiciais para o suporte neurotrófico do nervo (SUGIMOTO et al., 2008). Em conjunto, estes eventos contribuem para produção de um estresse oxidativo, considerado crucial para o desenvolvimento e manutenção da neuropatia diabética (OYENIHI et al., 2015).

Além dos fenômenos citados acima, radicais livres podem provocar danos no DNA e ativar proteínas da membrana mitocondrial provocando a liberação de citocromo C e ativação da caspase 3, resultando em apoptose. Estes radicais podem ativar o NF- κ B nas células de Schwann, células endoteliais e neurônios, promovendo a transcrição de moléculas pró-inflamatórias que levam à ativação de macrófagos. Os macrófagos podem contribuir para a neuropatia diabética por vários mecanismos, como liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, produção de EROs e proteases, que juntos, produzirão lesão celular oxidativa e degeneração da bainha de mielina (YAGIHASHI et al., 2011).

Como resultado, estes mecanismos podem contribuir de forma significativa para o processo de lesão neuronal e degeneração dos nervos periféricos, comprometendo

drasticamente a função dos neurônios sensoriais através da redução do limiar de ativação e da velocidade de condução do nervo, os quais são clinicamente expressos por sintomas como alteração da sensibilidade e dor neuropática, quadro conhecido como neuropatia diabética sensorial (DELI et al., 2014).

3.1.2 Neuropatia diabética sensorial

A NDS é caracterizada pela presença de dor, parestesia e perda sensorial (DELI et al., 2014) e apesar de possuir mecanismos fisiopatológicos pouco conhecidos, acredita-se que as descargas anormais dos neurônios sensoriais afetados pela hiperglicemia, seja o principal mecanismo responsável pelo seu desenvolvimento (BROCK et al., 2014; CHEN et al., 2015). Este fenômeno resulta em degeneração e perda axonal que pode vir acompanhada de desmielinização segmentar e redução da capacidade de regeneração do nervo, ocasionando dor neuropática e perda de sensibilidade, na maioria dos casos, com localização simétrica e distal (POLYDEFKIS et al., 2004; LENNERTZ et al., 2011; FATEHI et al., 2013).

Dentre os sintomas que apontam para o desenvolvimento da NDS, a dor neuropática é um dos mais encontrados na literatura. Estima-se que a prevalência de dor neuropática em pacientes com NDS possa variar de 3 a 25%, de acordo com o critério de diagnóstico utilizado (BOULTON et al., 2004; KAMENOV e TRAYKOV, 2013). Na prática, esta condição é clinicamente caracterizada pela ocorrência de dor espontânea associada a distúrbios sensitivos, tais como parestesias, hiperalgesia e alodinia, bem como fenômenos subjetivos descritos como "queimação" e sensações de "choque elétrico" geralmente com exacerbação noturna. Esta condição dolorosa pode persistir por anos e é frequentemente refratária ao tratamento medicamentoso convencional e que não modifica o padrão da doença (TESFAYE et al., 2010).

Além da dor neuropática, a perda gradual da sensibilidade a estímulos táteis e térmicos é sintoma frequente em pacientes com neuropatia diabética sensorial (LENNERTZ et al., 2011). Neste processo, a diminuição da sensibilidade é consequência da cronicidade da neuropatia, a qual pode aumentar consideravelmente o risco de lesão provocada por queimaduras, aumento da pressão ou por objetos perfurocortantes (VOLMER-THOLE e LOBMANN, 2016). Estes fenômenos associados a neuropatia motora podem resultar em atrofia da musculatura do pé e consequente mau posicionamento dos dedos (pés em garra); distribuição desigual da pressão da pisada, marcha insegura e desenvolvimento de calosidades que, com a contínua deambulação pode provocar ulcerações e servir de porta de entrada para o desenvolvimento de infecção,

resultando em amputação do membro (CAIAFA et al., 2011; VOLMER-THOLE e LOBMANN, 2016)

Estudos demonstram que as células da glia, importantes na manutenção da homeostase do sistema nervoso, possuem papel crucial no desenvolvimento e progressão da neuropatia diabética sensorial (RAHMAN et al., 2016; GONÇALVES; VÆGTER; PALLESEN, 2018). A constante liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato e substância P), fatores neurotróficos como o BDNF (*brain derived-neurotrophic factor*), ATP e quimiocinas pelo neurônio aferente primário pode resultar em ativação das células gliais na medula espinal de animais com neuropatia diabética sensorial (MCMAHON e MALCANGIO, 2009; WEN et al., 2011; MIKA et al., 2013). Neste sentido, dentre as diversas vias de sinalização envolvidas na ativação glial, a via do NF- κ B tem ganhado lugar de destaque. Pesquisadores observaram que animais nocaute para NF- κ B não desenvolveram alodinia mecânica em modelo de neuropatia diabética induzida por STZ, assim como o tratamento com seu inibidor foi capaz de prevenir o aparecimento da dor neuropática em modelo experimental (QUAN et al., 2007; BERTI-MATTERA et al., 2008).

Estudos demonstram que o excesso de glicose, tanto em cultura de células microgлияis como a hiperglicemia em animais diabéticos, é um fator chave no desenvolvimento do estresse oxidativo, ativação do NF- κ B e liberação de citocinas pró-inflamatórias pela micróglia (QUAN et al., 2007; ZHANG et al., 2013). O excesso de açúcar induz alterações metabólicas e enzimáticas, que culminam com o aumento da peroxidação lipídica, formação de espécies reativas e AGEs, além de alterar a função de enzimas antioxidantes como glutathione redutase e superóxido dismutase. Esses eventos são provavelmente responsáveis por manter a neuropatia sensorial mesmo depois de realizado o controle adequado da hiperglicemia (WANG et al., 2014).

A relação entre a hiperglicemia e a inflamação no sistema nervoso, conhecido como neuroinflamação, abriu vertente para a pesquisa de substâncias que possam estar envolvidas na regulação deste processo. Diversos estudos tem demonstrado o envolvimento da galectina-3 (Gal-3) nas complicações oriundas do diabetes (MELIN et al., 2018; MENDONÇA et al., 2018; BRIANA e MALAMITSI-PUCHNER, 2019; CHEN et al., 2019; HODEIB et al., 2019). Esta é conhecida como uma proteína ligante de β -galactosídeos e que possui afinidade por glicoconjugados ricos em N-acetil-Lactosamina (LIU et al., 2002). Sua ampla função biológica depende da localização e tipo celular que a expressa, podendo ser encontrada no meio extracelular, no citoplasma e no núcleo das células, regulando processos como: apoptose, inflamação, ciclo, sinalização e adesão celular (LIU et al., 2002; IACOBINI et al., 2003;

KRZEŚLAK e LIPIŃSKA, 2004). Um estudo publicado por ARAGNO e colaboradores (2005) demonstrou que os níveis de Gal-3, RAGE e do fator de transcrição kappaB (p65) estão aumentados no hipocampo de ratos diabéticos induzidos por STZ e que a administração da dehidroepiandrosterona, um hormônio esteroide que possui propriedade antioxidante, foi capaz de reverter os níveis da expressão desses compostos, sugerindo que o estresse oxidativo é capaz de desencadear uma cascata de eventos, na qual a galectina-3 está envolvida, resultando em dano neuronal. Recentemente, estudos revelaram que pacientes com diabetes do tipo II apresentam níveis elevados de galectina-3 comparado com indivíduos saudáveis, podendo esta molécula ser considerada como um biomarcador do diabetes e pré-diabetes (WEIGERT et al., 2010; YILMAZ et al., 2015).

O envolvimento da Gal-3 na neuropatia diabética ainda não foi evidenciado. Porém, estudos recentes demonstraram que animais nocaute para Gal-3 e com neuropatia pós-herpética apresentaram alodinia diminuída, assim como a utilização de um inibidor da Gal-3 possibilitou a redução da hipersensibilidade mecânica e térmica em animais neuropáticos por ligadura do nervo espinal (TAKASAKI et al., 2012; MA et al., 2016), indicando que esta lectina contribui para a neuropatia sensorial. Assim, devido a sua natureza multifuncional, a Gal-3 pode estar envolvida em fenômenos fisiopatológicos distintos, incluindo resposta imunológica e inflamatória, neurodegeneração, aterosclerose, diabetes e reparo tecidual (revisado por (YANG et al., 2008), podendo também estar envolvida em mecanismos de ativação das células gliais contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da neuropatia diabética sensorial.

3.1.2 Tratamento da neuropatia diabética sensorial

Como descrito acima, a hiperglicemia e/ou a resistência ou déficit da insulina, são fatores primordiais para o desenvolvimento da NDS. Assim, o tratamento da neuropatia diabética muitas vezes está baseado no controle glicêmico. Uma vez normalizados os níveis de glicose no sangue, as alterações nervosas podem ser reduzidas e ativados mecanismos de regeneração (SHAKHER, JAYADAVE e STEVENS, MARTIN J., 2011). Porém, estudos indicam que o controle glicêmico possui menor eficácia em pacientes com diabetes tipo 2, demonstrando que, apesar das semelhanças, os diferentes tipos de diabetes possuem mecanismos e complicações diferentes, tais como o envolvimento de fatores como a dislipidemia e resistência à insulina (CALLAGHAN et al., 2012).

Tendo em vista que o controle glicêmico é a única forma de tratamento capaz de modificar o padrão da doença, estudos indicam que o uso da metformina, uma dimetilbiguanidina essencial para a regulação dos níveis glicêmicos no diabetes tipo 2, possui vantagens em comparação a outros hipoglicemiantes orais, tais como as sulfonilureias e as tiazolidinedionas. Dentre as vantagens, estão a ausência de ganho de peso, baixo risco de hipoglicemia e melhora do perfil lipídico (SCARPELLO e HOWLETT, 2008). Neste sentido, a metformina pode ser capaz de diminuir a oxidação de ácidos graxos, aumentar a translocação do transportador de glicose (GLUT4) e reduzir a gliconeogênese hepática, além de prevenir a transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) resultando em proteção contra a apoptose induzida pela hiperglicemia (ROMÁN-PINTOS et al., 2016). Porém, o controle glicêmico precisa ser associado a ferramentas terapêuticas capazes de promover analgesia em pacientes com NDS. Assim, vários medicamentos, entre eles os antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSN) e anticonvulsivantes, são frequentemente usados no tratamento sintomático da neuropatia diabética sensorial (PASNOOR et al., 2013).

Por muitos anos, o uso de antidepressivos tricíclicos como amitriptilina e imipramina, foi considerado o tratamento de primeira escolha para o alívio da dor neuropática de origem diabética (HOSSEINI e ABDOLLAHI, 2013a; FELDMAN et al., 2019). Além de bloquear a recaptação de monoaminas, este grupo de medicamentos podem inibir os canais de sódio e cálcio, além dos receptores para o N-metil D-aspartato (NMDA), inibindo a hiperexcitabilidade neuronal (HOSSEINI e ABDOLLAHI, 2013a). Porém, a grande quantidade de efeitos adversos, associada a sua cardiotoxicidade e ao longo período necessário para o ajuste da dose para o paciente, dificulta a adesão à estes fármacos no manejo da dor neuropática (DWORKIN et al., 2007). Nestes casos, uma alternativa seria o uso dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina e noradrenalina, tais como a duloxetina e venlafaxina. Porém, estes medicamentos também estão associados a uma gama de efeitos adversos (tontura, fadiga, náuseas e insônia), mais severos que os observados com anticonvulsivantes (FELDMAN et al., 2019).

Dentre os anticonvulsivantes, a gabapentina e a pregabalina podem ser utilizados como medicamentos de primeira escolha para o tratamento da dor neuropática, principalmente quando há resposta inadequada ou contraindicações aos antidepressivos (HOSSEINI e ABDOLLAHI, 2013a). Estes fármacos se ligam a subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio voltagem dependentes regulando a entrada de cálcio no neurônio pré-sináptico e diminuindo a liberação de neurotransmissores excitatórios (HENNEMANN-KRAUSE e SREDNI, 2016). Estudos indicam que a gabapentina tem sido eficaz na maioria dos ensaios clínicos realizados

para o tratamento da dor na neuropatia diabética sensorial (BRIL et al., 2011; FINNERUP et al., 2015; POP-BUSUI et al., 2017). Porém, dado o seu perfil farmacocinético, o tratamento com a gabapentina exige titulação gradual, começando com doses baixas e aumentando conforme o manejo da dor. Já a pregabalina, por apresentar farmacocinética linear, apresenta titulação mais fácil e rápida. No entanto, nem todos os ensaios clínicos demonstraram resultados positivos para o tratamento com estes dois fármacos, evidenciando ainda uma eficácia entre 30-50% na melhora da dor (MOORE et al., 2009; ABBOTT et al., 2011; PELTIER et al., 2014; POP-BUSUI et al., 2017; FELDMAN et al., 2019). Nestes casos, a gabapentina ganha vantagem por ser mais barata. Porém, ambos possuem efeitos adversos como confusão e tonturas que pioram com o aumento da idade, implicação que dificulta a adesão do paciente ao tratamento (CALLAGHAN e FELDMAN, 2014).

Como relatado anteriormente neste trabalho, numerosos mecanismos bioquímicos levam à danos vasculares e nervosos que estão associados ao desenvolvimento da neuropatia diabética sensorial. Porém o estresse oxidativo é considerado um dos fatores etiológicos mais relevantes (HOSSEINI e ABDOLLAHI, 2013a). Neste sentido, vários autores avaliaram a eficácia de substâncias antioxidantes, tais como a taurina, a acetil L-carnitina (ALC) e o ácido alfa lipóico (SHAKHER, JAYADAVE e STEVENS, MARTIN J, 2011; DEVITT, 2012), além de inibidores de vias bioquímicas como bloqueadores da ativação da PKC, da aldose redutase e dos AGEs (HAUPT et al., 2005; VINIK et al., 2005; BRIL et al., 2009), na neuropatia diabética sensorial. Porém, a eficácia clínica desses compostos ainda não foi bem caracterizada.

Diante deste cenário, é possível sugerir que as células-tronco mesenquimais podem contribuir para o tratamento de lesões teciduais oriundas de estresse oxidativo e inflamação. O uso de células-tronco no tratamento de doenças neurodegenerativas tem apresentado resultados animadores em modelos experimentais (XIAO et al., 2015; KAZUKI et al., 2019; CAO et al., 2019). Nestes estudos, os autores relatam que boa parte dos efeitos observados são atribuídos as propriedades antioxidantes e imunorregulatórias das células-tronco mesenquimais, podendo estas serem consideradas uma ferramenta promissora para o tratamento da NDS.

3.2 TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO

A terapia celular consiste no uso de células no reparo de tecidos danificados por lesão mecânica ou doenças como diabetes, câncer, doenças cardíacas e neurodegenerativas, por exemplo (MADONNA et al., 2016; REDDY et al., 2016; HAMADA et al., 2017; JAIN et al.,

2018). Neste contexto, por naturalmente contribuírem no reparo de lesões teciduais endógenas, as células-tronco são uns dos tipos celulares mais utilizados. Estas são células indiferenciadas que possuem uma alta capacidade de autoduplicação e de se diferenciar em tipos celulares específicos, podendo serem embrionárias, quando obtidas nos estágios iniciais de desenvolvimento do embrião; adultas, encontradas no indivíduo adulto com a função de servir de suporte para manutenção e regeneração dos tecidos diferenciados; ou induzidas, obtidas por reprogramação genética de células somáticas (DA SILVA MEIRELLES et al., 2006; TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006; JESUS et al., 2011; DUSCHER et al., 2016).

De acordo com o seu potencial de diferenciação, as células-tronco podem também serem classificadas em toti, pluri, multi, oligo ou unipotentes. Células-tronco totipotentes são encontradas no embrião no estágio de mórula e constituem as células com maior poder de diferenciação, podendo dar origem a células dos tecidos embrionários e dos anexos embrionários como placenta e cordão umbilical, enquanto que as pluripotentes são encontradas no embrião na fase de blástula e possuem a capacidade de se diferenciar apenas em células dos tecidos embrionários. As multipotentes podem ser obtidas de diversas regiões do corpo, tais como o tecido adiposo, medula óssea, polpa do dente de leite e cordão umbilical, e dar origem a células de vários tecidos. Já as células-tronco oligo e onipotentes possuem potencial para se diferenciar em poucos ou apenas um tipo celular específico (WAGERS e WEISSMAN, 2004).

Devido a sua capacidade de auto-renovação, habilidade em se diferenciar em diversos tipos celulares distintos, facilidade de obtenção e possibilidade de serem obtidas do próprio paciente, as células-tronco adultas tem despertado o interesse da comunidade científica (MURPHY et al., 2013). Estas podem ser obtidas de órgãos provenientes dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), sendo as células oriundas de tecidos derivados do mesenquima, conhecidas como células-tronco mesenquimais, as mais popularizadas (DA SILVA MEIRELLES et al., 2006). Neste sentido, as células-tronco mesenquimais da medula óssea (CMsMO) são as mais estudadas (SOUZA et al., 2010). Essas células possuem a função fisiológica de manter o estado de homeostase do organismo através da reposição ou liberação de fatores que promovam a recuperação de células destruídas por lesões ou doenças (BURDON et al., 2010).

CMsMO foram descobertas em 1966 por Alexander Friedenstein. Ao investigar a interação entre o osso e o tecido hematopoiético, ele observou que a medula óssea possuía uma população de células clonogênicas aderentes diferentes das células-tronco hematopoiéticas e semelhante a fibroblastos com alta capacidade de replicação *in vitro* e que foram capazes de se

diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e no estroma de suporte hematopoiético *in vivo* (AFANASYEV et al., 2009).

Tomando como base as descobertas do Friedenstein, a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu que a caracterização da células-tronco mesenquimais devem obedecer os seguintes parâmetros: (1) capacidade de aderência ao plástico quando mantida em cultura; (2) expressão de marcadores que as caracterizem imunofenotipicamente, tais como: CD90, CD44 e SCA-1, e baixa expressão de CD45, CD34, CD11b, entre outros, e; (3) capacidade de se diferenciar *in vitro* em linhagens do mesmo folheto embrionário, como linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas (DOMINICI et al., 2006).

A partir da sua identificação e caracterização das suas propriedades, o potencial terapêutico das CMsMO vem sendo amplamente proposto (BORGES et al., 2018). Um dos primeiros estudos com células mesenquimais da medula óssea em animais foi realizado por LUCAS e colaboradores em 1996. Eles observaram que o transplante de CMsMO em ratos submetidos a cirurgia abdominal preveniu a formação de adesões na cavidade abdominal durante o processo de cicatrização. A partir daí, diversos pesquisadores comprovaram os efeitos benéficos das CMsMO em modelos experimentais de diferentes doenças e afecções, como falência renal aguda, encefalomielite autoimune, e também em pacientes com infarto agudo do miocárdio, diabetes do tipo 2 (TÖGEL et al., 2005; GERDONI et al., 2007; PROCKOP e OLSON, 2007; DE MACEDO BRAGA et al., 2008; STOCK et al., 2014; GUAN et al., 2015).

Diferentes mecanismos já foram propostos para explicar as ações terapêuticas de células-tronco. 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. A transdiferenciação diz respeito 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. Entretanto, devido à baixa frequência de ocorrência desses fenômenos, atualmente parece consenso que estes mecanismos não são responsáveis pelo reparo tecidual (WANG et al., 2003). A hipótese do efeito parácrino das células-tronco tem sido amplamente aceita e validada. Em 2005, Gneccchi e cols. relataram que CMsMO geneticamente modificadas para o gene Akt secretaram fatores citoprotetores em cardiomiócitos expostos a hipóxia e que a administração do meio do cultivo das CMsMO na sua forma concentrada pode exercer efeito protetor em modelo animal de infarto agudo do miocárdio, validando a hipótese do efeito parácrino (GNECCHI et al., 2005). De acordo com esta ideia, CMsMO exercem suas ações terapêuticas

por meio da secreção de fatores solúveis, como citocinas e fatores de crescimento, que ativam mecanismos endógenos de reparo e controle da homeostase e que, a administração dos produtos secretados pelas CMsMO em meio de cultivo pode ter grande importância terapêutica (GNECCHI et al., 2008; BURDON et al., 2010; SEO e CHO, 2012; MASTRI et al., 2014).

3.2.1 Terapia *cell-free*

A hipótese do efeito parácrino abriu perspectiva para uma inovadora abordagem na medicina regenerativa, que é a utilização de células-tronco como fonte de substâncias bioativas e não como o agente terapêutico *per se*. Esse tipo de abordagem, denominada terapia *cell-free* tem se mostrado efetiva em condições experimentais e em ensaio clínico (ABMAN e MATTHAY, 2009; BRUNO et al., 2015; KATAGIRI et al., 2016). O primeiro agente terapêutico da abordagem *cell-free* investigado foi o secretoma de células-tronco. Secretoma é definido como um conjunto de fatores, como proteínas solúveis (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento), ácidos nucleicos, lipídios e vesículas extracelulares, que são produzidos pela célula e liberados no meio extracelular (BEER et al., 2017). O meio condicionado obtido a partir da cultura de células-tronco mesenquimais representa a fonte mais completa dos secretomas liberados por essas células (VISHNUBHATLA et al., 2014). Seguindo o estudo pioneiro de Gneccchi et al., 2005, muitas outras pesquisas vêm demonstrando os efeitos benéficos do secretoma em diferentes condições, como displasia broncopulmonar, na angiogênese e na doença cardiovascular (ABMAN e MATTHAY, 2009; ESTRADA et al., 2009; RANGANATH et al., 2012). Além disso, efeitos neuroprotetores e regenerativos do secretoma em doenças e afecções do sistema nervoso vem sendo também demonstradas (DENG et al., 2014; AHMED et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2017; CUNNINGHAM et al., 2018). Em nosso laboratório, em um estudo pioneiro realizado por Gama et al., 2018, conseguimos demonstrar que o secretoma de CMsMO foi capaz de produzir efeito antinociceptivo e modular o balanço de citocinas anti e pró-inflamatórias no nervo isquiático e medula espinal de forma semelhante ao transplante com as células mesenquimais, mostrando que o secretoma possui substâncias capazes de modular a dor neuropática a níveis periférico e central na dor neuropática por ligadura do nervo isquiático.

O secretoma de células mesenquimais possui uma fração solúvel que pode ser separada dos componentes vesiculares, e ambos têm potencial terapêutico e podem promover reparo tecidual (JUSTEWICZ et al., 2012; MAGUIRE, 2013). Um estudo realizado em 2007 demonstrou que o tratamento com o meio condicionado de células-tronco reduz a área do

infarto do miocárdio em animais e, ao analisar os componentes bioativos presentes no meio condicionado, os autores atribuíram esse efeito terapêutico a estruturas esféricas membranares, com tamanho entre 50 e 200 nm, conhecidas como vesículas extracelulares (VEs) (TIMMERS et al., 2008). A partir deste estudo, vários trabalhos têm investigado os efeitos benéficos de VEs em diferentes modelos experimentais (LI, Z. et al., 2017; MONDAL et al., 2017; NEWTON et al., 2017; SANCHEZ et al., 2017). VEs podem ser classificadas de acordo com a composição lipídica, proteica e local de origem na célula (derivadas da membrana plasmática ou de organelas intracelulares), em: exossomas (40-150nm), os quais são liberados a partir de corpos multivesiculares derivados do endossoma tardio; e microvesículas (200-1000nm) formadas a partir do brotamento da membrana plasmática (BÖRGER et al., 2017). Uma característica comum das VEs é que elas são compostas por moléculas biologicamente ativas importantes no processo de comunicação celular, tais como proteínas, lipídios, DNA, RNA mensageiro (RNAm), RNA transportador (RNAt), microRNAs e outros RNAs não-codificantes (WITWER et al., 2013; LÁZARO- IBÁÑEZ et al., 2014). Ao serem liberadas no meio extracelular VEs são capazes de interagir com as células-alvo por meio da ativação de seus receptores ou ligantes de lipídios ou por meio da fusão das membranas, transferindo seu conteúdo molecular para a célula-alvo. Essa transferência de moléculas bioativas, principalmente de RNAs funcionais que podem ser incorporados pelas células receptoras, tem papel chave na comunicação celular (KIM et al., 2017b).

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado a ação das VEs derivadas de células-tronco mesenquimais em lesões neurodegenerativas, como acidente vascular encefálico, lesão da medula espinal (SARKO e MCKINNEY, 2017) e no déficit cognitivo em camundongos diabéticos (NAKANO et al., 2016), porém o efeito de VEs derivadas de CMsMO nas neuropatias ainda não foi avaliado.

Dentro da perspectiva de ampliação da aplicabilidade clínica, a abordagem *cell-free* possui algumas vantagens em relação a terapia com células-tronco. Entre elas, pode-se considerar: (1) o uso de secretomas melhora aspectos de segurança quanto a administração de populações celulares vivas, que podem ser capazes de gerar tumores, embolia e infecções; (2) o secretoma pode ser avaliado quanto a sua segurança, potência e dosagem de maneira análoga ao que é feito para os fármacos convencionais; (3) secretomas podem ser coletados e armazenados por longos períodos e sem o uso de substâncias crioprotetoras potencialmente tóxicas; (4) seu uso é mais econômico e prático, e por fim, (5) podem ser produzidos em grandes escalas a partir de linhagens celulares mantidas em cultura (VIZOSO et al., 2017).

3.2.2 Células mesenquimais e neuropatia sensorial

Embora a ação de reparo tecidual exercidas pelas células-tronco mesenquimais já tenha sido demonstrada, sua participação na regeneração de lesões do sistema nervoso ainda é pouco conhecida. Os primeiros indícios de que as células-tronco poderiam exercer ação neuroregenerativa surgiram no final do século passado com a descoberta de células-tronco no parênquima neural adulto (MORSHEAD et al., 1994; MCKAY, 1997; WU et al., 2002). Pouco tempo depois, Eglitis e Mezey demonstraram em seus experimentos que as CMsMO são capazes de se diferenciar em neurônios *in vivo*, abrindo vertente para a possibilidade do uso das células-tronco mesenquimais em doenças do sistema nervoso (MEZEY et al., 2000). Mais tarde, diferentes estudos demonstraram que células mesenquimais exerceram propriedades neuroprotetoras em modelos experimentais de encefalite e doença desmielinizante inflamatória (UCCELLI et al., 2006; KARUSSIS et al., 2008). Nos anos seguintes, pesquisas conseguiram demonstrar o efeito neuroprotetor de CMsMO no tratamento de diversas doenças degenerativas e lesões do sistema nervoso (STEMBERGER et al., 2011; HAYASHI et al., 2013; STONE et al., 2013).

A idéia de que os efeitos neuroprotetores das CMsMO decorrem de sua diferenciação em células do tecido lesionado, ao longo do tempo foi substituída pela hipótese da ação parácrina. Dentro do tecido nervoso lesionado ou na sua microvasculatura, estas células podem funcionar como fábricas de pequenas moléculas bioativas como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), os quais em conjunto são capazes de promover reparo funcional do tecido lesionado (CHEN et al., 2002). É importante salientar que as células mesenquimais respondem expressando quantidades e fatores diferentes quando cultivadas em meios com concentrações iônicas distintas, sugerindo que a quantidade e qualidade de seu secretoma depende do grau de comprometimento do tecido (CHEN et al., 2002; CHOPP e LI, 2002).

A literatura demonstra que as CMsMO, por meio da sua ação parácrina, secretam uma variedade de substâncias funcionais que promovem o crescimento neuronal endógeno, a angiogênese, a neurogênese, melhoram a conexão sináptica e remielinização axonal, além de diminuir a apoptose e regular a inflamação (SEO e CHO, 2012). De fato, estudos demonstram que CMsMO podem promover a plasticidade de neurônios lesionados e induzir a liberação de neurotrofinas como BDNF e NGF por astrócitos e micróglia (LI et al., 2002), além de liberar componentes da matriz extracelular essenciais para o crescimento e regeneração axonal (MALTMAN et al., 2011). Em adição a estes fatores, em 2009 Kim e cols demonstraram em

modelo animal de doença de Parkinson que o transplante de CMsMO foi eficaz em reduzir a neuroinflamação via regulação da atividade microglial e proteção de neurônios dopaminérgicos (CHAO et al., 2009). Outros pesquisadores demonstraram que a administração endovenosa de células mesenquimais não somente reduziu os níveis de IL-1 β e a proporção de micróglia ativada com aumentou os níveis de IL-10, sugerindo que uma ação imunomoduladora pode estar por trás da recuperação funcional encontrada em animais com lesão medular (SEO et al., 2011). Desta forma, como proposto por CASTILLO-MELENDEZ e colaboradores (2013) e resumido na figura 1, as CMsMO podem exercer neuroproteção através da liberação de fatores que modulam a inflamação, promovem a neuro, angio e sinaptogênese, promovem a remielinização axonal, além de ajudar na proliferação de astrócitos e possuir efeito antiapoptótico.

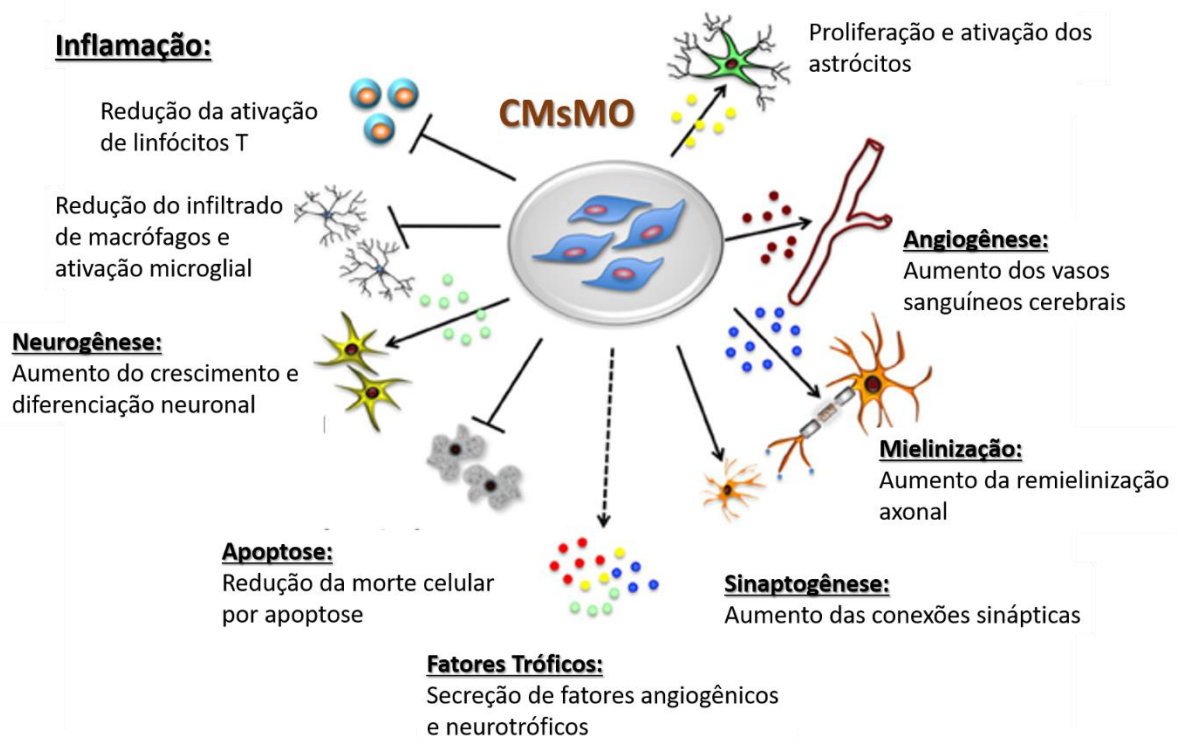


Figura 1: Potenciais efeitos neuroprotetor e neuroregenerador das CMsMO. As ações benéficas das células mesenquimais são mediadas principalmente por ações parácrinas. As CMsMO secretam uma variedade de fatores neurotróficos e angiogênicos que promovem o crescimento e diferenciação neuronal, induzem a angiogênese, neurogênese e ativação dos astrócitos, melhorando a conexão sináptica e remielinização axonal, além da diminuição da apoptose, do infiltrado de macrófagos, da ativação dos linfócitos T e ativação microglial. Adaptado de CASTILLO-MELENDEZ et al. (2013).

Apesar de, como descrito acima, as propriedades neuroprotetoras e regenerativas das células-tronco serem bem estabelecidas, o potencial dessas células no controle das neuropatias sensoriais, foi proposto pela primeira vez há pouco mais de dez anos. O primeiro estudo que

abordou esse tema, demonstrou que, em modelo murino de dor neuropática por lesão mecânica do nervo isquiático, o tratamento com CMsMO preveniu o aparecimento do comportamento doloroso (MUSOLINO et al., 2007). Pouco tempo depois, SHIBATA e colaboradores (2008) desenvolveram o primeiro estudo com células-tronco na neuropatia diabética experimental. Neste trabalho, 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 CMsMO melhoram a velocidade de condução no nervo paralelamente ao aumento da vascularização do nervo periférico e ao aumento da expressão de fatores neurotróficos e angiogênicos, 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 ideia, estudo realizado por nosso grupo de pesquisa demonstrou que células-tronco mesenquimais da polpa do dente induzem efeito antinociceptivo na neuropatia diabética dolorosa experimental (GUIMARÃES et al., 2013a). Corroborando esses dados, outros estudos demonstraram que células-tronco mesenquimais induzem efeito antinociceptivo em diferentes tipos de neuropatia (SCHÄFER et al., 2014; YOUSEFIFARD et al., 2016), incluindo seu efeito analgésico em estudos clínicos em diferentes síndromes dolorosas (JIANG et al., 2013; VICKERS et al., 2014).

Embora o efeito antinociceptivo de células-tronco mesenquimais venha sendo consistentemente demonstrado, os mecanismos relacionados aos efeitos dessas células na neuropatia sensorial são ainda pouco compreendidos. Os trabalhos que abordaram esse tema têm relacionado as ações terapêuticas das células mesenquimais aos seus efeitos angiogênicos e neurotróficos no nervo periférico (FORTINO et al., 2013; SACERDOTE et al., 2013; HOSSEINI et al., 2015). Por outro lado, como exposto acima, a contribuição de eventos na medula espinal para a manutenção das neuropatias sensoriais, incluindo a neuropatia diabética, é amplamente descrita. De fato, a liberação de mediadores químicos como citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos durante uma resposta inflamatória pode sensibilizar os nociceptores e seus alvos sinápticos na medula espinal contribuindo para iniciação e manutenção da dor neuropática (ELLIS e BENNETT, 2013). Considerando as propriedades neuroprotetoras, reguladoras e regenerativas das células mesenquimais no sistema nervoso central, é possível que esses efeitos contribuam para as ações terapêuticas de CMsMO na neuropatia diabética, entretanto, essa hipótese não foi ainda avaliada. Com base no exposto acima, o presente trabalho foi delineado para investigar possíveis mecanismos envolvidos nas

ações terapêuticas de CMsMO na neuropatia diabética experimental, com ênfase em mecanismos espinais.

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 IGM, FIOCRUZ – BA. Os doadores de medula óssea foram da mesma linhagem, porém transgênicos do tipo que expressam a proteína verde fluorescente em suas células somáticas (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*). Os camundongos foram mantidos em sala climatizada a $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 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 IGM, FIOCRUZ – BA (CEUA: L-IGM - 022/2015).

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. 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, 4 e 12 semanas 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 (12 semanas).

4.3 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 (δ), 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:

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

4.4 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.

4.5 ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA

As CMsMO foram obtidas segundo protocolo descrito por Krampera et al. (2003). Células totais de medula óssea foram isoladas dos ossos longos das patas traseiras de camundongos, eutanasiados por deslocamento cervical. Usando-se técnicas estéreis, a pata foi

amputada na altura da articulação coxo-femural, as epífises removidas e a medula lavada usando-se uma seringa com agulha a fim de coletar as células totais da medula em um tubo com meio DMEM suplementado 50 µg/ml de gentamicina. As células foram separadas por gradiente Ficcol, submetidas ao teste de viabilidade com azul de *trypan* e contadas em câmara de *Newbauer*. As células foram então cultivadas em frascos de cultura a uma densidade de 10^6 células/cm² em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, sendo as células não aderentes removidas por lavagens em meio DMEM após 3 dias de cultura. Após atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e semeadas em novos frascos para expansão. As células-tronco mesenquimais foram caracterizadas por citometria de fluxo e pela sua capacidade de diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. O cultivo celular foi monitorado por microscopia de contraste de fase e o meio trocado três vezes por semana até atingir confluência celular de 80 a 100%. Ao alcançarem a 6ª passagem, CMsMO foram contadas em câmara de *Newbauer* e preparadas para a administração endovenosa (1×10^6 ; veia lateral da cauda) nos animais ou incubadas com meio sem soro fetal bovino por 24 horas para coleta do meio condicionado (MC-CMsMO) e obtenção das vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais de medula óssea (VES-CMsMO).

4.6 CITOMETRIA DE FLUXO

A caracterização de CMsMO foi realizada 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%. Um total de 5×10^5 células foram incubada a 4°C por 30 minutos com os seguintes anticorpos na concentração 1/50: CD90PE (CALTAG, Buncingham, Inglaterra), Sca1PE-Cy5 (CALTAG), CD45APC (CALTAG), CD34PE (CALTAG), CD44PE (CALTAG), CD11b (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), CD117PE (BD) e CD73PE (BD). Anticorpos isótipos idênticos foram utilizados como controles. Após incubação, foram realizadas mais duas lavagens com solução salina 0,9% e, em seguida, realizada a aquisição dos dados e análise no citômetro de fluxo LRS Fortessa (BD). Pelo menos 50.000 eventos foram coletados e analisados.

4.7 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO*

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 oitava passagem. Para a diferenciação adipogênica, CMsMO foram cultivadas

em placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo (104 células/poço). Após atingirem 50-60% de confluência (cerca de quatro semanas), todo o meio foi removido e substituído por meio de indução adipogênica StemPro *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, foi adicionada 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, 5×10^5 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 pela 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, foram 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).

4.8 OBTENÇÃO DE MC-CMSMO

Para obtenção do meio condicionado, após as células atingirem a confluência na 6ª passagem, as culturas foram incubadas com meio sem soro fetal bovino por 24 horas e o sobrenadante da cultura, contendo o secretoma das células, foi processado para obtenção do meio condicionado. Para isto, o sobrenadante da cultura das células mesenquimais foi retirado da garrafa e concentrado cerca de 15 vezes com unidades de filtração (Centriprep e Amicon Ultra – Merck Millipore, Irlanda) de 10 KDa (peso molecular de corte). As frações concentradas foram coletadas e submetidas a um novo processo de filtração usando o mesmo sistema de ultrafiltração. Um volume total de 100 uL (com 10% de heparina sódica) de meio condicionado, equivalente ao secretoma de 1×10^6 CMsMO, foi infundido pela veia lateral da cauda dos animais.

4.9 OBTENÇÃO DE VES-CMSMO

O sobrenadante da cultura de CMsMO foi coletado e centrifugado a $700 \times g$ por 5 minutos a 8°C para eliminar os detritos celulares. Em seguida, foi realizada ultracentrifugação a $4.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C em ultracentrífuga (Himac CP 80wx – Hitach, rotor P28S) para eliminar corpos apoptóticos. Após passar por duas centrifugações diferenciais, o sobrenadante obtido foi ultracentrifugado a $100.000 \times g$ por 1h20m a 4°C para sedimentar as VEs-CMsMO. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de vesículas ressuspendido com a adição de três volumes de 100 μL de PBS, sendo que a cada volume adicionado, o *pellet* foi agitado vigorosamente em vórtex para proporcionar máxima recuperação das VEs-CMsMO. As vesículas obtidas foram armazenadas no ultrafreezer -80°C até posterior utilização.

4.10 CARACTERIZAÇÃO DE VES-CMSMO

Os estudos de caracterização das VEs-CMsMO foram realizados no Laboratório de Pesquisa Básica em Células-Tronco do Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ Paraná, parceiro desse projeto. VEs-CMsMO foram caracterizadas e quantificados indiretamente pelo seu conteúdo proteico no equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies™, Invitrogen,

NY, EUA) e diretamente pela análise de partículas em suspensão usando a técnica *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) no equipamento Nanosight, de acordo com métodos previamente descritos por Spies, 2017. No método de quantificação indireto, as VEs-CMsMO foram quantificadas pela marcação fluorescente das proteínas de sua superfície, uma vez que as VEs-CMsMO não foram lisadas para esta quantificação. Para detecção das proteínas, foram utilizados os reagentes do kit *Qubit® Protein Assay* (Molecular Probes, Life Technologies™) de acordo com as instruções do fabricante, e foram obtidos os valores em µg/mL de proteína para cada amostra. O método de quantificação direta de partículas em suspensão utilizando o NTA proporcionou uma análise direta e em tempo real das nanopartículas em meio líquido baseado no movimento browniano das partículas e nas suas propriedades de dispersão da luz. Por meio do NTA foi possível visualizar, contar e medir o tamanho de cada nanopartícula separadamente e em tempo real. As amostras de VEs-CMsMO foram inseridas no equipamento Nanosight (LM14C, Malvern Instruments) com uma diluição de 1:50.

As VEs-CMsMO foram caracterizadas também por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e proteômica. A MET fornece informações sobre a morfologia e tamanho das vesículas extracelulares e a análise proteômica das VEs-CMsMO foi realizada por espectrometria de massas na Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR. As amostras foram preparadas e submetidas à eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE. O gel foi corado e as bandas cortadas em pedaços com cerca de 1x1 mm. Este material foi sucessivamente processado até a obtenção da amostra de peptídeos, a qual foi injetada no cromatógrafo e no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific). Os arquivos gerados foram analisados na plataforma MaxQuant versão 1.5.2.8. e as identidades das proteínas determinadas contra um banco de dados *Uniprot*. A completa descrição dos métodos pode ser obtida em XU *et al.*, 2016.

4.11 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO NERVO ISQUIÁTICO

Ao término das 12 semanas, os camundongos foram eutanasiados e amostras do nervo isquiático (± 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 5mM 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 μ 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 com o uso do microscópio Olympus BX51, em aumentos de 10x para observação da área total do nervo e 100x para avaliação morfológica e morfológica. A avaliação morfológica e a contagem de alterações morfológicas foram realizadas no *software Image Pro-Plus 7.1* (Media Cybernetics®). Primeiro foi realizado o procedimento de amostragem aleatória sistemática, que consistiu em dividir a imagem do corte transversal do nervo em quadrantes com dimensões conhecidas, selecionar o primeiro quadrante a ser avaliado e a partir daí, estabelecido um intervalo de amostragem, que neste caso foi de um quadrante. Como critério de inclusão, foram quantificados os axônios que cruzavam as linhas superior e direita do quadrante e excluídos da contagem aqueles que cruzaram as margens inferiores e esquerdas do campo de contagem. Os parâmetros morfológicos avaliados, foram expressos em porcentagem de: fibras normais, anormais, fibras com formato irregular, alteração na compactação da bainha de mielina e invaginação da bainha de mielina para o espaço axonal (*infolding*).

O cálculo utilizado para se obter a porcentagem da amostra foi realizado pela multiplicação do somatório da área dos campos por cem e dividido pela área total do nervo. Já para se obter o número total de axônios, o somatório dos axônios quantificados foi multiplicado por cem e dividido pela porcentagem da amostra. Os parâmetros medidos foram: diâmetro do axônio, diâmetro da fibra, espessura da bainha de mielina e razão G, determinada pela razão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra.

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 para quantificação da área e densidade das fibras amielínicas, assim como avaliação da morfologia mitocondrial. Para isto as fotomicrografias foram obtidas em aumento de 4.000X e 25.000X, como previamente descrito por FLATTERS, S. J. L. & BENNETT, G. J. (2006). O número total de fibras C foi contado em todo nervo. Para isto, foi fotografado todo corte transversal em aumento de 4.000X e calculada a densidade e a área média dos axônios das fibras C. A densidade foi calculada dividindo o número total de axônios pela área do corte transversal do nervo (nº/ μ m²). O percentual de mitocôndrias foi obtido em fibras A e fibras C, para isto inicialmente foram contabilizadas 60 fibras A e 60 fibras

C em cada nervo (n=3) e em seguida foi quantificado o número total de mitocôndrias presentes nos dois tipos de fibras. A atipia mitocondrial foi evidenciada pelo aumento do tamanho da organela (comprimento maior que 265 nm), formação de vacúolos maiores que 50% que a área mitocondrial e/ou o acúmulo de material amorfo elétron-denso nos polos da mitocôndria devido a vacuolização. As mitocôndrias atípicas em fibras A e fibras C foram dadas em valor percentual (%).

4.12 DETERMINAÇÃO DE NITRITO

Os níveis de nitrito foram quantificados como uma medida indireta da produção de NO. Para tal, os segmentos L4-L5 da medula espinal foram coletados e homogeneizados em 100 µL tampão fosfato (pH 7,4) no *TissueLyser* II (Gentech Bio) por 3 minutos, de modo a obter o homogenato do tecido a 10% (m/v). Para que não houvesse variação da quantidade de proteínas de uma amostra para a outra, foi realizada a dosagem de proteínas totais pelo método de fluorescamina, que foi posteriormente utilizada na normalização dos dados. A determinação de nitrito foi realizada de acordo com metodologia anteriormente descrita (GREEN *et al.*, 1982). Inicialmente, 40 µL de ácido sulfossalicílico a 4% foram utilizados para reagir com 40 µL do homogenato de nervo durante 1h a 4°C. Logo após foi realizada centrifugação desse material por 15 minutos a 1200g a 4°C, e então foi coletado o sobrenadante formado. O reagente de Greiss (solução 1:1 de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e ácido di-hidroclórico de naftalamina-diamina a 0,1% em água) serviu como indicador dos níveis de nitrito. Para isto foi adicionado 70 µL do reagente de Greiss em 70 µL do sobrenadante e foi realizada leitura da absorbância em 546 nm. O nitrito de sódio foi utilizado para cálculo da curva padrão e os níveis de nitrito na amostra foram expressos em µL/mg de proteína total.

4.13 DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

O nível de peroxidação lipídica foi estimado pela dosagem do teor de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBA) no tecido homogeneizado, conforme método previamente descrito (MCKNIGHT & HUNTER, 1965). Esta técnica é bastante utilizada para medir a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos oxidados, entre eles o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos. O ensaio indica o nível de peroxidação lipídica, pela medida indireta da quantidade de MDA, um subproduto da ação de radicais livres. Para tal, 20 µL de homogenato da medula espinal e 20 µL de Tris-HCl 0.02M em pH 6.4 foram incubados a 37°C por 2 horas. Após incubação foi adicionado 40 µL de

ácido tricloroacético a 10% seguido de centrifugação a 1000g por 10 min. Para cada 70 µL de sobrenadante 70 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,67% foi acrescido, e em seguida os tubos foram mantidos em banho seco a 100°C por 10 min para obtenção da reação colorimétrica. Após resfriamento das amostras, 70 µL de água destilada foi acrescida e a absorbância foi mensurada a 532 nm. As substâncias reativas ao TBA foram quantificadas sendo expressas como µmol de MDA / mg de proteína (µmol/mg).

4.14 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

A ativação de células da glia e os níveis de galectina-3 na medula espinal foram investigados por imunofluorescência. Os camundongos foram terminalmente anestesiados e perfundidos transcardialmente com solução salina a 0,9%, seguido de solução de paraformaldeído a 4% (PFA) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) em tampão de fosfato 0,01 M (PBS). A medula espinal foi coletada, pós-fixada *overnight* sob temperatura de 4 °C em 4% de PFA, colocada em solução de sacarose a 30% por 48 horas a 4°C em PBS, emblocada em *Tissue-Tek* (O.C.T., Sakura Tissue-Tek) e congelada a -80 °C. Logo após, foram obtidas secções transversais da medula espinal (4 µm de espessura), fixadas em PFA 4% durante 15 minutos e lavadas em PBS duas vezes por 5 minutos cada. Em seguida, a amostra foi bloqueada usando o kit de bloqueio Vector Avidin/Biotin (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), e depois incubada *overnight* com solução de anticorpos primários anti- GFAP (proteína ácida fibrilar glial) de rato (1:200, Zymed, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), anti-Iba1 de cabra ou anti-galectina-3 de coelho, diluídos em PBS/BSA 1%. No dia seguinte, as seções foram incubadas com os anticorpos secundários, IgA anti-rato AlexaFluor 594 conjugado para GFAP (1:600, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA), IgG Alexa Fluor 488 anti-cabra conjugado para Iba1 (1:600, Molecular Probes) ou anti-coelho IgG Alexa Fluor 568 conjugado para Gal-3 durante 1 hora à temperatura ambiente. Os núcleos foram submetidos solução de montagem *Vectashield* corado com DAPI, 4', 6-diamidino-2-fenilindole (Vector Laboratories). As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio confocal FluoView 1000 (Olympus, Tokyo, Japão) e uma caixa de 1500 µm × 1500 µm foi colocada na área correspondente ao corno dorsal da medula espinal (3 seções por animal) e o percentual da área marcada foi calculado. As imagens foram analisadas utilizando um microscópio de varredura laser confocal A1R (Nikon, Tóquio, Japão) e Image-Pro Plus versão 7.01 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA) e os dados foram expressos em porcentagem de área positiva para Iba1, GFAP ou Gal-3.

4.15 RT-qPCR

A expressão de fatores antioxidantes na medula espinal de camundongos dos diferentes grupos experimentais foi avaliada por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR). Os camundongos foram sacrificados por decaptação e o segmento L4-L5 da medula espinal de cada animal foi coletado e acondicionado em tubos livres de RNase, sendo imediatamente armazenado em freezer -80°C. Os tecidos foram homogeneizados em 1 mL de reagente Trizol (Gibco - BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.), a extração do RNA total foi realizada de acordo com as orientações do fabricante e a concentração foi determinada por medição fotométrica utilizando o aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Em seguida, o RNA total foi transcrito por ação da enzima transcriptase reversa utilizando-se o kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems). A condição de ciclagem utilizada foi: 1º ciclo (25°C – 10 minutos), 2º ciclo (37°C – 1 hora), 3º ciclo (37°C – 1 hora) e 4º ciclo (4°C - ∞) no termociclador MasterCycle gradiente (Eppendorf, EUA). O cDNA sintetizado foi armazenado à -20°C até o momento de uso. O cDNA obtido foi usado para análise da expressão quantitativa dos genes NRF-2 (Mm 00477784_m1), SOD-1 (Mm 01344233_g1), CAT (Mm 00437992_m1) e GPX-3 (Mm 00492427_m1) em reações de PCR. À reação de amplificação de qRT-PCR contendo 4,5 µL da amostra de cDNA e 5,5 µL de MIX formado por Taqman Master Mix (Applied Biosystems), sondas Taqman (Applied Biosystems) acima indicadas e água ultrapura foram realizadas em duplicata no Sistema de Detecção ABI Prism 7500 Sequence (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sob condições do padrão de ciclagem térmica. Os valores médios de *Cycle threshold* (Ct) foram usados para calcular a expressão do gene estudado, com normalização ao controle interno (GAPDH - Mm 9999915_g1) usando o método $2^{-\Delta Ct}$. Amostras com coeficiente de variação maior que 5% foram excluídas. Um controle sem amostra (NTC) e outro sem a enzima para transcrição reversa (No-RT) também foram incluídos.

Para rastreamento das CMsMO transplantadas, a transcrição do gene GFP foi avaliada na medula espinal, nervo isquiático, gânglio da raiz dorsal, baço e pulmão de camundongos 24 h, 1 e 3 semanas após o transplante. Os valores médios de Ct (do inglês – *cycle threshold*) foram usados para calcular a expressão de GFP, com normalização para GAPDH (Mm 9999915_g1).

4.16 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. 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 $p < 0,05$.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nesse estudo, os camundongos foram induzidos ao diabetes com três administrações consecutivas de STZ (80 mg/kg via intraperitoneal) e os limiares nociceptivos mecânico e térmico, assim como o peso e a glicemia, foram avaliados por 12 semanas a partir da indução do modelo. Os grupos experimentais (n=6) foram definidos da seguinte forma:

- **Naive:** Grupo de animais que não foram induzidos ao modelo de diabetes nem receberam a administração de CMsMO. O objetivo deste grupo foi avaliar a resposta do animal não doente, em situação de homeostase.
- **STZ+Salina:** Animais que foram induzidos ao modelo de diabetes por STZ, porém não foram transplantados com CMsMO. O objetivo desse grupo é evidenciar a resposta do animal doente ao longo do tempo.
- **STZ+CMsMO:** Animais submetidos ao transplante de 1×10^6 CMsMO no final da quarta semana após a indução do diabetes. O objetivo desse grupo foi avaliar o efeito do tratamento com CMsMO sobre diferentes parâmetros de neuropatia.
- **STZ+GBP:** Animais diabéticos e que no final da quarta semana após indução do modelo, foram submetidos ao tratamento com 70 mg/kg da gabapentina por via oral a cada 12 horas durante seis dias consecutivos. O objetivo deste grupo foi avaliar a resposta do animal frente ao fármaco de referência.
- **STZ+MC-CMsMO:** Animais submetidos a infusão do meio condicionado proveniente do cultivo de CMsMO no final da quarta semana após a indução do diabetes. O objetivo desse grupo foi avaliar o efeito do tratamento com MC-CMsMO sobre os parâmetros comportamentais da NDS.
- **STZ+VEs-CMsMO:** Animais submetidos a infusão de vesículas extracelulares liberadas durante o cultivo de CMsMO no final da quarta semana após a indução do

diabetes. O objetivo desse grupo foi avaliar o efeito do tratamento com MC-CMsMO sobre os parâmetros comportamentais da NDS.

As leituras dos limiares nociceptivos foram realizadas uma vez por semana, no horário compreendido entre as 07 e 17 horas e, no final do período de avaliação comportamental (12 semanas), foi realizada a coleta dos segmentos do nervo isquiático para análises por microscopia óptica e MET e da medula espinal para análises por qRT-PCR, imunofluorescência e dosagens bioquímicas de MDA e peroxidação lipídica. Foram coletados também, segmentos do nervo isquiático, medula espinal, gânglio da raiz dorsal (GRD), fígado e pâncreas de animais 24h, 1 e 3 semanas após o transplante para o rastreo de CMsMO.

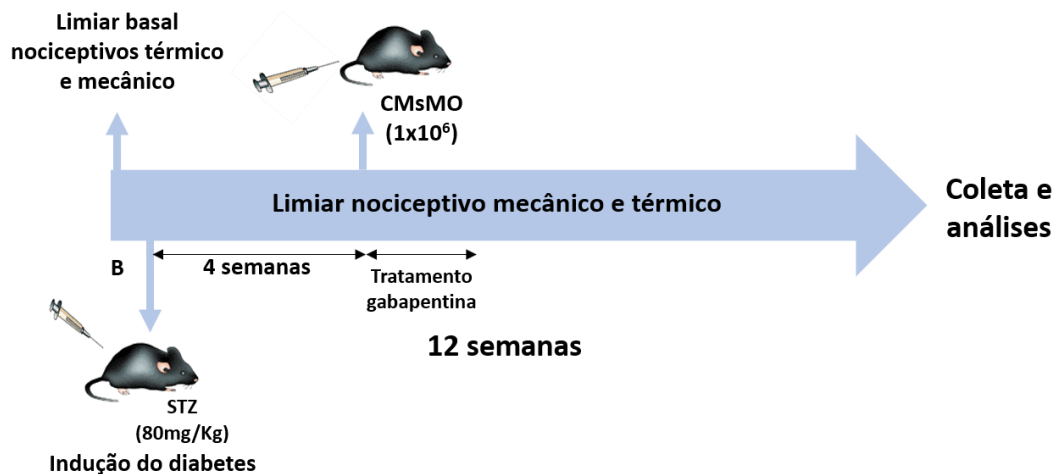


Figura 2: Delineamento experimental.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DE CMSMO

Visando a caracterização das CMsMO utilizadas neste estudo, a análise dos marcadores de superfície das células foi feita por citometria de fluxo (tabela 1). As CMsMO apresentaram uma alta expressão de marcadores de superfície característicos de células mesenquimais, como SCA-1, CD44, CD90, CD29 e GFAP, e baixa expressão de CD11b, CD45 e CD73.

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

Marcador	% Células positivas
GFP	73,3
CD29	99,8
CD44	99,6
SCA-1	99,4
CD90	55,7
CD45	4,5
CD73	6,6
CD11b	0,6

A capacidade de diferenciação de CMsMO *in vitro* em linhagens adipogênicas, condrogênica e osteogênica também foi avaliado (Figura 3). As culturas de CMsMO foram capazes de se diferenciar *in vitro* na linhagem adipogênica, como evidenciado pelo acúmulo de lipídios no meio intracelular de células coradas com *oil red* após quinze dias de cultivo com meio de diferenciação (figura 3A). CMsMO indiferenciadas, coradas com *oil red*, nãoapresentaram coloração (figura 3B). Ao término de quinze dias do cultivo de CMsMO com meio de diferenciação osteogênica, a observação microscópica evidenciou a presença de cálcio intracelular após coloração com vermelho de alizarina. Esse achado sugere diferenciação em linhagem osteogênica (figuras 3C e *inset*). As células utilizadas como controle também foram coradas, porém como evidenciado na figura 3D, 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 3E) e as células utilizadas como controle também foram submetidas à coloração, porém

não foi evidenciado diferenciação em condrócitos, permanecendo negativas para proteoglicanos (figura 3F).

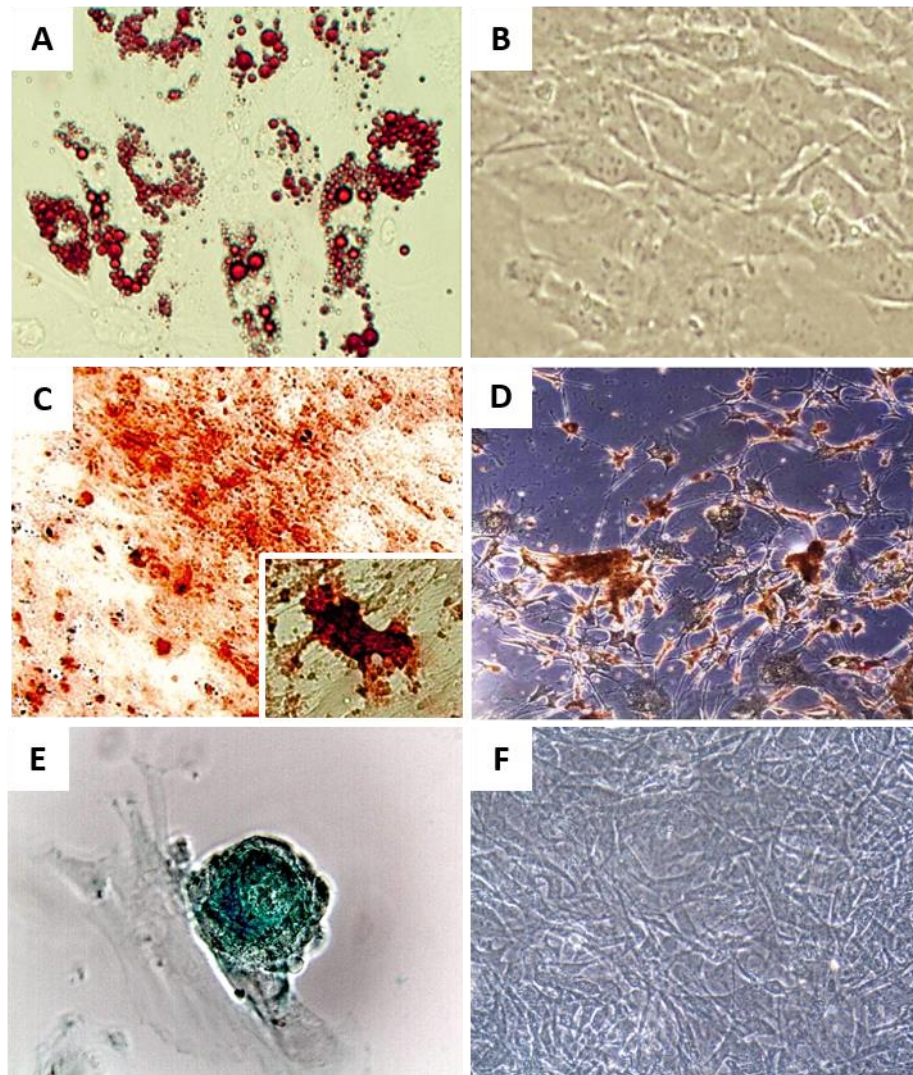


Figura 3: Cultura de CMsMO em diferenciação em células das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, observadas por microscopia óptica de contraste de fase. Painel A. Diferenciação adipogênica, acúmulo de lipídios intracelulares, corado com *oil red*. Magnificação= 200X. Painel B. CMsMO indiferenciadas submetidas a coloração com *oil red*. Magnificação= 200X Painel C. Diferenciação osteogênica, células com acúmulo de cálcio coradas com alizarina vermelha 2%. Magnificação= 200X. *Inset* - Célula em diferenciação osteogênica em maior aumento Magnificação= 400X. Painel D. CMsMO indiferenciada submetida a coloração com alizarina vermelha a 2%. Magnificação= 200X. Painel E. Diferenciação em condrócitos evidenciada pelo acúmulo de proteoglicanos corado por *Alcian blue*. Magnificação= 400X. Painel F. CMsMO indiferenciada submetida a coloração por *Alcian blue*. Magnificação= 200X.

6.2 EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL E GLICEMIA DOS CAMUNDONGOS NO MODELO DE NEUROPATIA DIABÉTICA

Durante todo o período experimental, o peso corporal e a glicemia dos camundongos foram monitorados e os dados estão representados na figura 04. Ao final de quatro semanas após a indução do diabetes, antes dos tratamentos, os camundongos que receberam STZ apresentaram redução de peso e aumento da glicemia ($p < 0,01$) em relação ao grupo de camundongos que não foram induzidos ao diabetes (grupo naive). Este mesmo perfil foi mantido até o fim do período experimental (12 semanas), entretanto, no fim do período experimental, animais tratados com CMsMO apresentaram menor perda de peso corporal em relação ao grupo salina ($p < 0,05$).

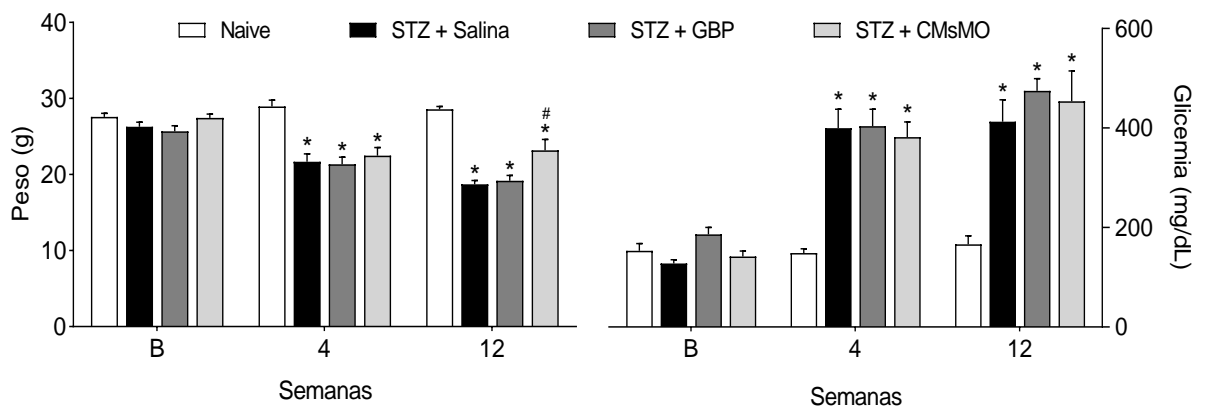


Figura 4: Variação do peso corporal e glicemia dos animais durante o período experimental. B – Representa a medida do peso corporal e da glicemia antes da indução do modelo. Dados expressos como média \pm EPM, para $n = 06$ animais. * Significância estatística em relação ao grupo naive ($p < 0,001$). # Significância estatística em relação ao grupo STZ+Salina ($p < 0,001$). Análise estatística determinada pelo teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

6.3 EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO DE CAMUNDONGOS COM NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL

O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado com o objetivo de confirmar o desenvolvimento da neuropatia sensorial no modelo de diabetes, e avaliar o efeito dos tratamentos. Quatro semanas após o fim do período de indução do modelo uma consistente redução do limiar de resposta a estímulo mecânico ($p < 0,001$) estava estabelecida, caracterizando o desenvolvimento da NDS (Figura 5). O tratamento com a gabapentina (70 mg/kg via oral) duas vezes ao dia durante seis dias consecutivos, realizado na quinta semana após a indução do modelo (figura 5B), induziu um efeito antinociceptivo transitório, retornando ao estado de alodinia mecânica 12 horas após sua administração. Por outro lado, uma única administração intravenosa de 1×10^6 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 significativo ($p < 0,01$) 1 semana após o transplante, aumentando progressivamente até a normalização completa do limiar nociceptivo. É importante ressaltar que a partir da 11ª semana, os camundongos com NDP tratados com salina e com a gabapentina, apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) do limiar de nocicepção, caracterizando perda de sensibilidade ao estímulo mecânico. Esse fenômeno não foi observado nos animais tratados com CMsMO, os quais permaneceram com limiares semelhantes aos dos camundongos do grupo naive até o final do estudo.

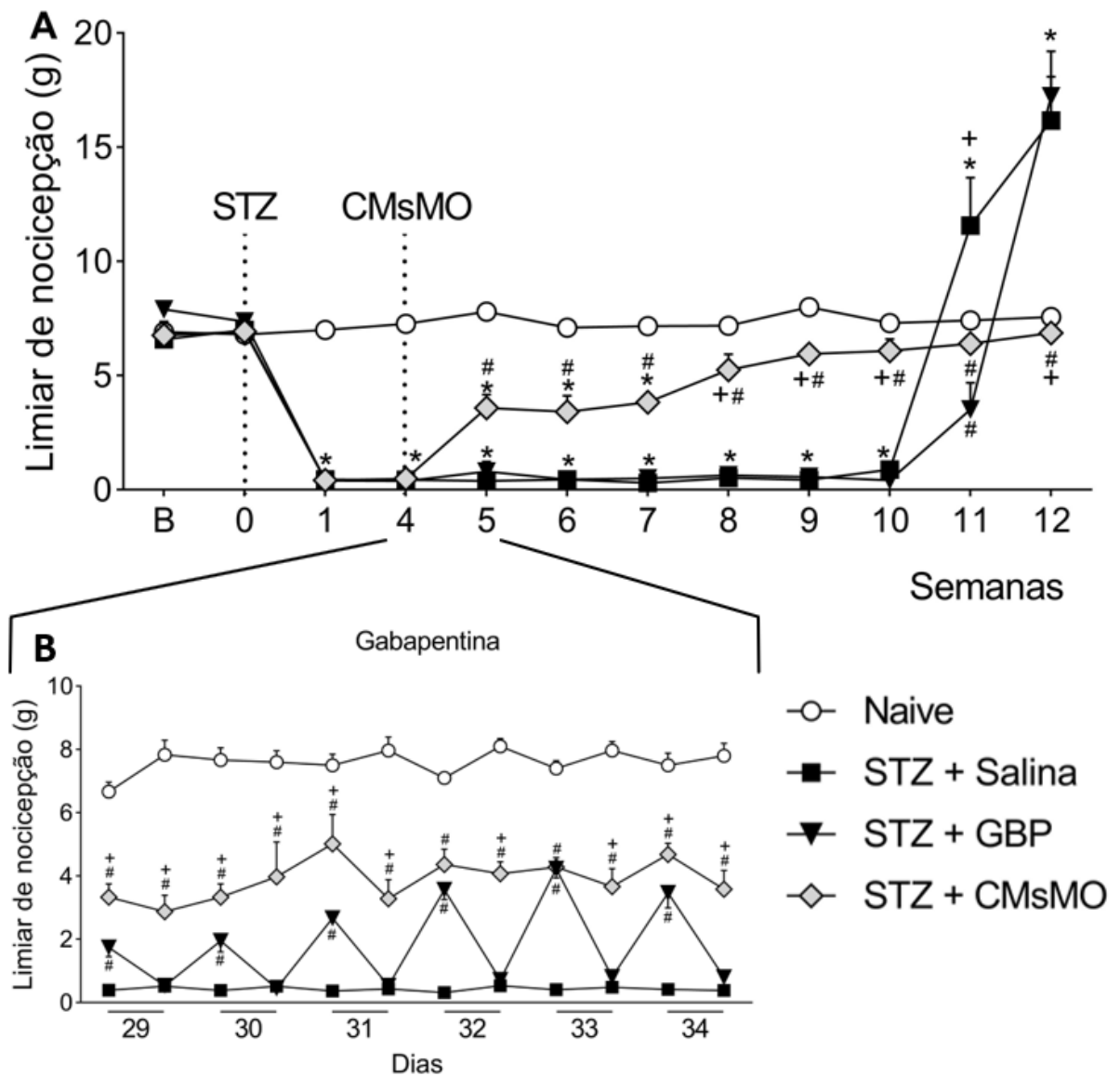


Figura 5: Efeito do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos em modelo de neuropatia diabética sensorial. Painel A. O eixo das ordenadas representa o limiar de nociceção em gramas. B - Representa o período antes da indução do modelo de diabetes. 0 – representa uma leitura realizada momentos antes do início da indução do diabetes. A linha pontilhada em 0 indica o início do período de indução do modelo de neuropatia diabética. A linha pontilhada no ponto de 4 semanas indica o momento da administração endovenosa de CMsMO 1×10^6 (STZ+CMsMO) ou salina (STZ+Salina). **Painel B.** Representa o limiar nociceptivo mecânico de camundongos durante o período de administração das duas doses diárias da gabapentina (70mg/kg via oral a cada 12 horas) durante seis dias consecutivos (dias 29 a 34 após a indução do modelo). Dados foram expressos como média e E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo naive ($p < 0,001$). # significância estatística em relação à STZ+Salina ($p < 0,001$). + significância estatística em relação ao grupo STZ + GBP. Teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

6.4 EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO

O limiar de resposta ao estímulo nociceptivo térmico foi avaliado com o objetivo de confirmar o desenvolvimento de NDS e avaliar o efeito dos tratamentos. Os resultados estão apresentados na figura 6. Quatro semanas após a indução do modelo observou-se aumento do limiar de resposta a estímulo térmico ($p < 0,001$), indicativo da perda de sensibilidade térmica, que caracteriza o desenvolvimento da NDP neste modelo. O tratamento diário com a gabapentina (70 mg/kg via oral a cada 12 horas) possibilitou redução parcial da hipoalgesia térmica apenas durante o período de administração do fármaco. Em contrapartida, a administração de CMsMO (1×10^6) mostrou-se eficaz na reversão da hipoalgesia térmica instalada, uma semana após o transplante ($p < 0,01$). Após esse ponto, o limiar nociceptivo dos animais neuropáticos tratados com CMsMO manteve-se nos mesmos patamares dos animais não neuropáticos durante todo o período experimental.

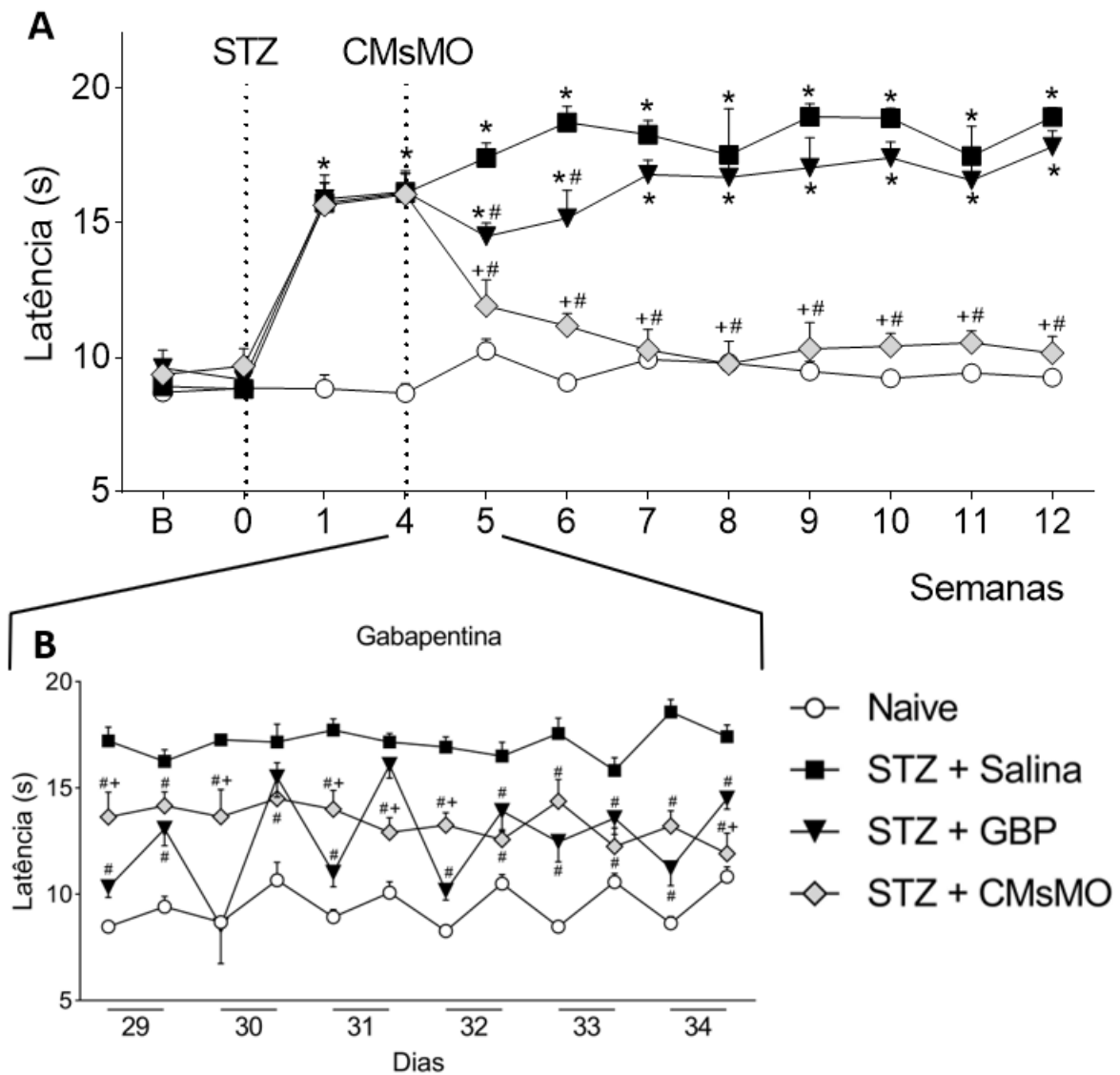


Figura 6: Efeito do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de neuropatia diabética sensorial. Painel A. O eixo das ordenadas representa a latência em segundos. B – Representa o período antes da indução do modelo de diabetes. 0 – Representa uma leitura realizada momentos antes do início da indução do diabetes. A linha pontilhada em 0 indica o início do período de indução do modelo de neuropatia diabética. A linha pontilhada no ponto de 4 semanas indica o momento da administração endovenosa de CMsMO 1×10^6 (STZ+CMsMO) ou salina (STZ+Salina). **Painel B.** Representa o limiar nociceptivo térmico dos camundongos durante o período de administração das duas doses diárias da gabapentina (70 mg/kg via oral a cada 12 horas) durante seis dias consecutivos (dias 29 a 34 após a indução do modelo). Dados foram expressos como média e E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo naive ($p < 0,001$). # significância estatística em relação à STZ+Salina ($p < 0,001$). + significância estatística em relação ao grupo STZ + GBP. Teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

6.5 EFEITO DE CMSMO SOBRE A MORFOLOGIA DAS FIBRAS MIELINIZADAS DO NERVO ISQUIÁTICO DE CAMUNDONGOS COM NDS

A análise histológica dos cortes transversais do nervo isquiáticos dos animais avaliados foi realizada no final do período experimental (12 semanas). A figura 7 mostra fotomicrografias do nervo isquiático de camundongos representativas de cada grupo experimental. A figura 7A representa o nervo isquiático de um animal do grupo naive, apresentando fibras mielínicas de calibres variáveis, contornos regulares, bainha de mielina íntegra e com espessura da bainha proporcional ao diâmetro dos respectivos axônios. No grupo STZ + Salina (figura 7B), nota-se a presença de: 1 - fibras com formato irregular; 2 – fibras com alteração na compactação da bainha de mielina e fibras mielínicas de grosso calibre em processo de atrofia axonal e invasão da bainha de mielina para o axoplasma (*infoldings*) (3). A figura 7C representa o aspecto morfológico do nervo isquiático de animais neuropáticos tratados com gabapentina e a figura 7D representa o aspecto morfológico das fibras mielinizadas do nervo isquiático de animais tratados com CMsMO. A análise morfológica dos nervos de camundongos dos grupos STZ+GBP e STZ+CMsMO evidenciou a presença de fibras mielínicas de diferentes calibres e com bainha de mielina íntegra.

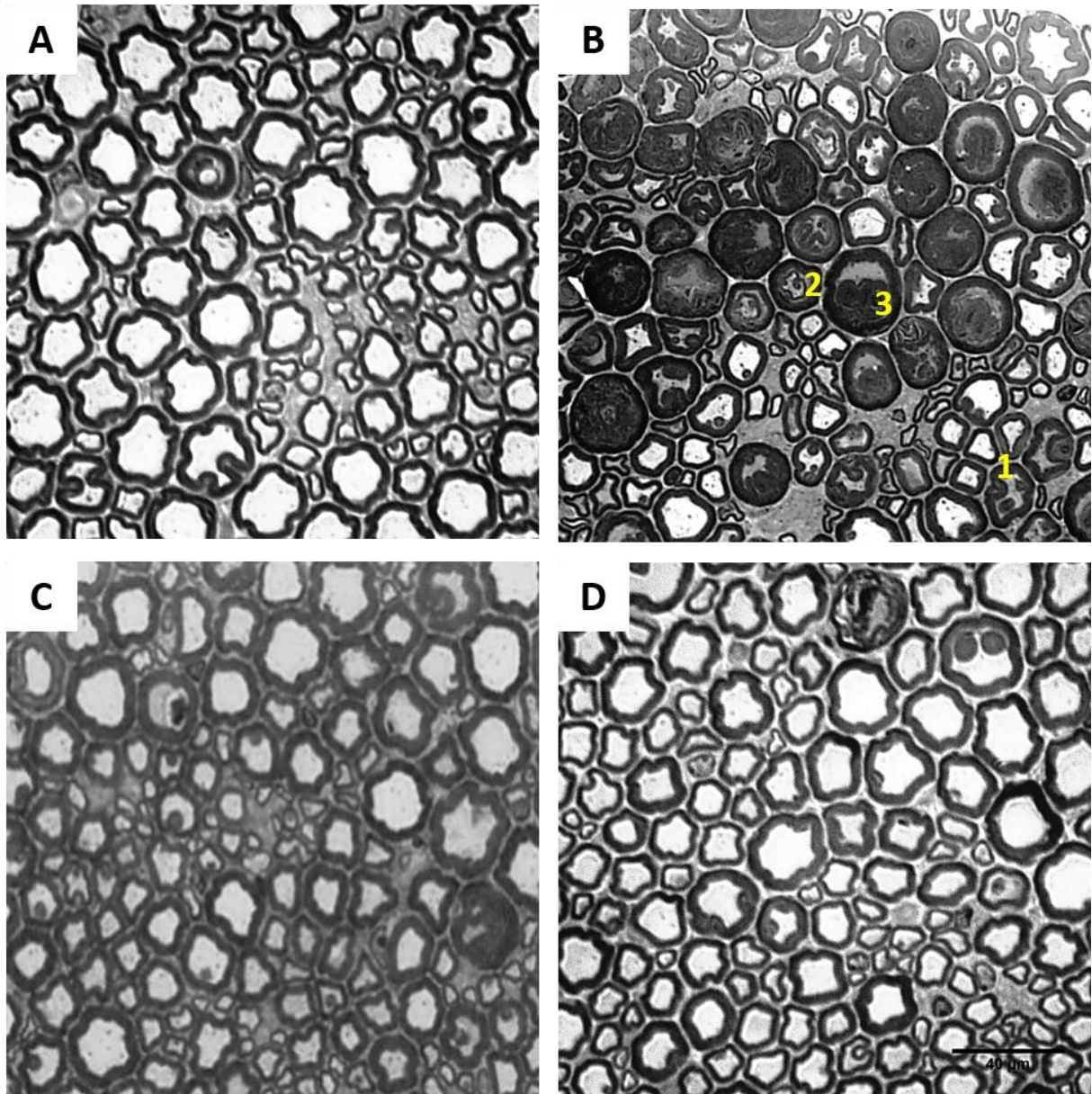


Figura 7: Efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre aspectos morfológicos das fibras mielinizadas do nervo isquiático de camundongos diabéticos. Fotomicrografias representativas do nervo isquiático de camundongos dos grupos naïve (A), STZ + Salina (B), gabapentina (C) e CMsMO (D) 12 semanas após a indução do diabetes. No painel B, os números indicam fibra mielínica com formato irregular (1), fibra com alteração na compactação da mielina (2) e fibras com invaginação da bainha de mielina (*infolding*) (3). Escala = 40 μ m.

A quantificação das alterações morfológicas mais encontradas na neuropatia diabética sensorial estão representadas na figura 8. A análise permitiu demonstrar, em porcentagem, que os animais do grupo STZ + Salina apresentaram maior percentual de fibras anormais, ou seja, fibras com formato irregular, alteração na compactação da bainha de mielina (bainha dupla) e *infolding* de mielina, em relação ao grupo naïve (figura A). Entre as alterações observadas, a invaginação da bainha de mielina (*infoldings*) foi a alteração mais prevalente (figura B) ($p < 0,05$). O transplante de CMsMO (1×10^6) reduziu a porcentagem de fibras mielínicas

anormais no nervo dos animais diabéticos (Figuras A). O tratamento diário com gabapentina (70 mg/kg via oral por seis dias consecutivos), assim como o transplante de CMsMO, diminuiu a porcentagem de fibras com *infoldings* de mielina no nervo isquiático de animais diabéticos (Figuras B). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos ao avaliar o percentual de fibras com alteração na compactação da bainha de mielina e no percentual de fibras com formato irregular (figuras C e D).

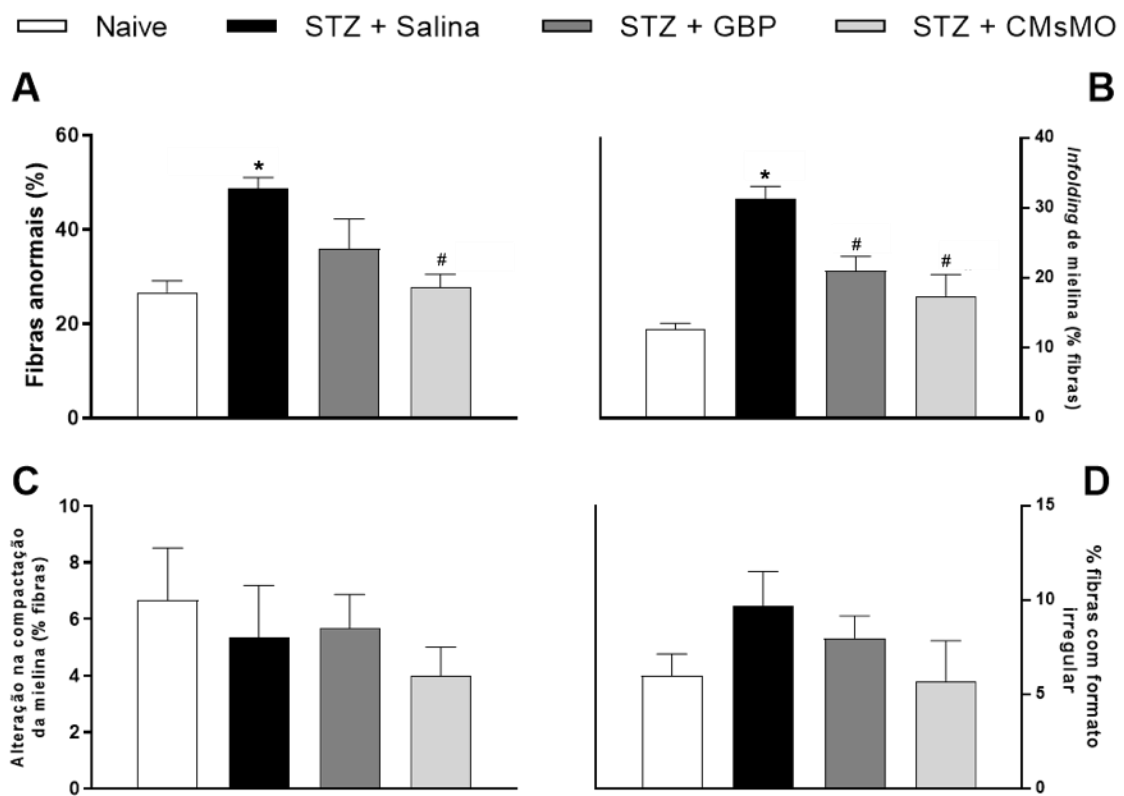


Figura 8: Efeito do transplante de CMsMO sobre a quantificação das alterações morfológicas encontradas nas fibras mielinizadas de camundongos com NDS. A. Porcentagem de fibras mielínicas anormais. B. Porcentagem de fibras com *infoldings* de mielina. C. Porcentagem de fibras com alteração na compactação da mielina. D. Porcentagem de fibras com formato irregular. Análise feita no tempo de 12 semanas após a indução do modelo experimental de diabetes. Os dados são expressos como médias \pm SEM; N = 6 camundongos por grupo. * Significativamente diferente do grupo naive ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo STZ + Salina. ANOVA seguido do teste de Tukey.

6.6 EFEITO DE CMSMO SOBRE A MORFOMETRIA DAS FIBRAS MIELINIZADAS DO NERVO ISQUIÁTICO DE CAMUNDONGOS NEUROPÁTICOS

A análise morfométrica das fibras mielinizadas do nervo isquiático de camundongos foi realizada com o objetivo de quantificar possíveis alterações imperceptíveis nas análises morfológicas. O número de fibras mielínicas (A), diâmetro médio dos axônios (B), diâmetro médio das fibras mielínicas (C) espessura da bainha de mielina (D) e razão G (E) estão representados na figura 9. Os resultados revelaram redução no número de fibras mielínicas no nervo de camundongos neuropáticos tratados com salina ou gabapentina, em relação aos do grupo naive ($p < 0,05$). Em contrapartida, nos animais neuropáticos tratados com CMsMO o número de fibras mielínicas no nervo isquiático foi similar ao encontrado nos camundongos não neuropáticos. Em adição, camundongos com neuropatia tratados com salina apresentaram redução no diâmetro dos axônios de fibras mielínicas em relação aos animais naive ($p < 0,05$). Nos animais tratados com CMsMO essa redução no diâmetro dos axônios não foi evidenciada. Esses dados evidenciam que o tratamento com CMsMO foi capaz de reduzir sinais de atrofia axonal nos animais diabéticos. Nenhuma diferença estatística entre os grupos experimentais foi encontrada na análise dos parâmetros: diâmetro das fibras mielínicas, espessura da bainha de mielina e da razão G.

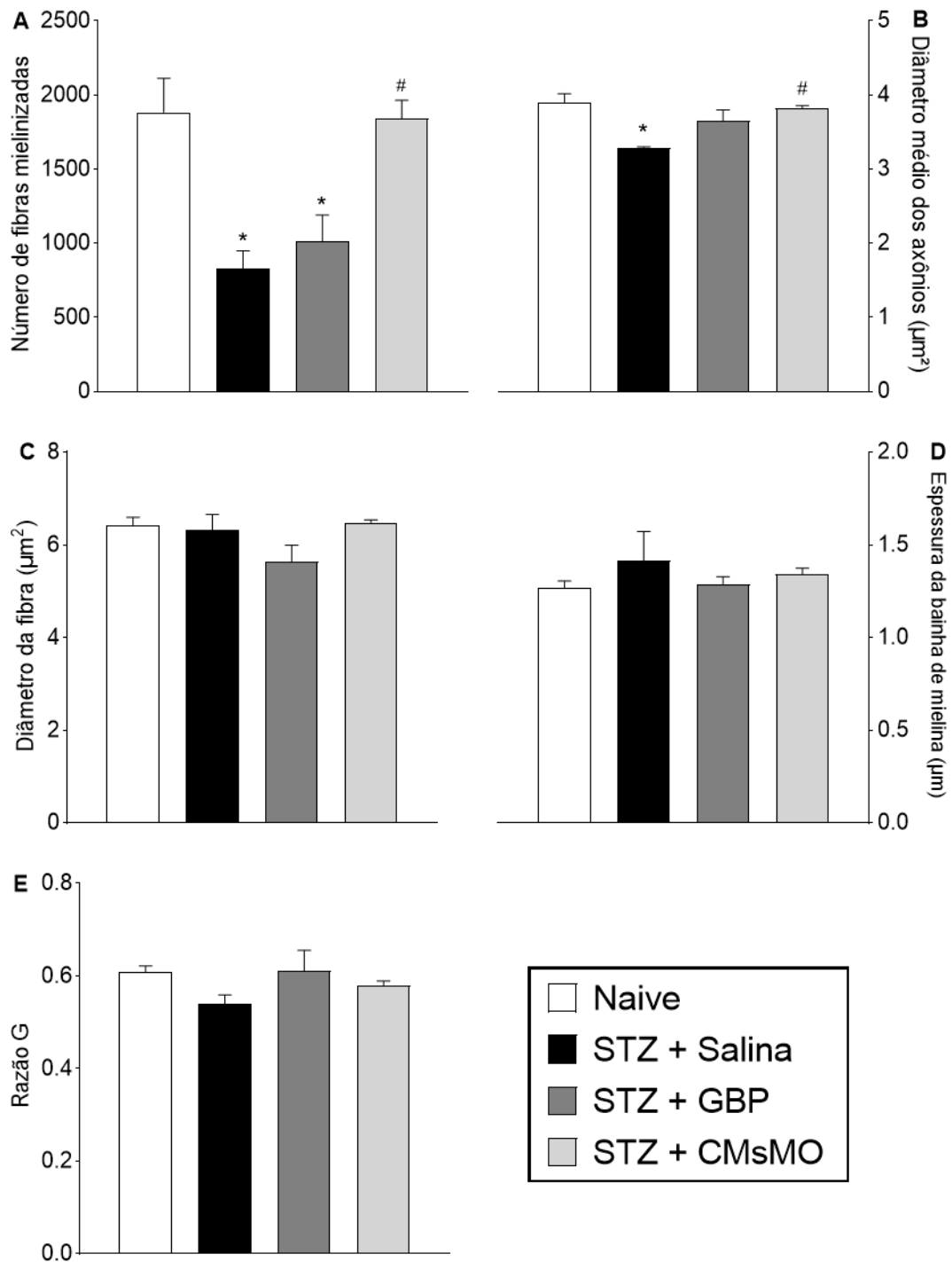


Figura 9: Efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos com neuropatia diabética sensorial. A. Número de fibras mielínicas. B. Diâmetro médio dos axônios. C. Diâmetro médio da fibra. D. Espessura da bainha de mielina. E. Razão G. Análise feita 12 semanas após indução do diabetes. Os dados são expressos como médias \pm SEM; N = 6 camundongos por grupo. * Significativamente diferente do grupo naive ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo do grupo STZ + Salina. ANOVA seguido do teste de Tukey.

6.7 EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE AS FIBRAS AMIELÍNICAS DO NERVO ISQUIÁTICO DE ANIMAIS COM NDS

Tendo em vista a participação das fibras amielínicas no desenvolvimento dos fenômenos de alteração de sensibilidade observados neste trabalho, foi realizada a análise morfológica e morfométrica destas fibras e os dados estão representados na figura 10. A análise qualitativa mostra eletromicrografias do feixe Remak nucleado representativa de animais dos diferentes grupos avaliados. Em animais não-diabéticos (naive), pôde-se observar a presença de feixe Remak contendo numerosas fibras amielínicas de aspecto arredondado e com o espaço endoneural preenchido por feixes colágenos (asterisco – figura 10A). Porém, a avaliação morfológica das fibras amielínicas dos animais STZ+Salina demonstrou presença de fibras com aspecto encolhido (seta branca) e ausência de feixes colágenos no espaço endoneural (estrela – figura 10B). Com relação a avaliação qualitativa das fibras amielínicas presentes no nervo isquiático de camundongos tratados com gabapentina (70 mg/kg), foi observada a presença de feixe Remak contendo área com aparente processo de desnervação (ponta de seta), além da presença de prolongamento da célula de Schwann envolvendo feixes colágenos (seta preta – figura 10C). Contudo, a figura 10D evidencia uma eletromicrografia representativa do corte transversal do nervo isquiático de animais com NDS e submetidos ao transplante com CMsMO, demonstrando a presença de fibras amielínicas arredondadas e com o espaço endoneural preenchido por feixes colágenos.

Com relação a análise morfométrica das fibras amielínicas do nervo isquiático de camundongos com neuropatia, foi observada uma redução da área e densidade das fibras amielínicas de animais dos grupos STZ+Salina e STZ+GBP em comparação com os animais não-diabéticos (naive) ($p < 0,01$). Por outro lado, o tratamento com CMsMO mostrou parâmetros morfométricos semelhantes aos animais do grupo Naive (figura 10E e F).

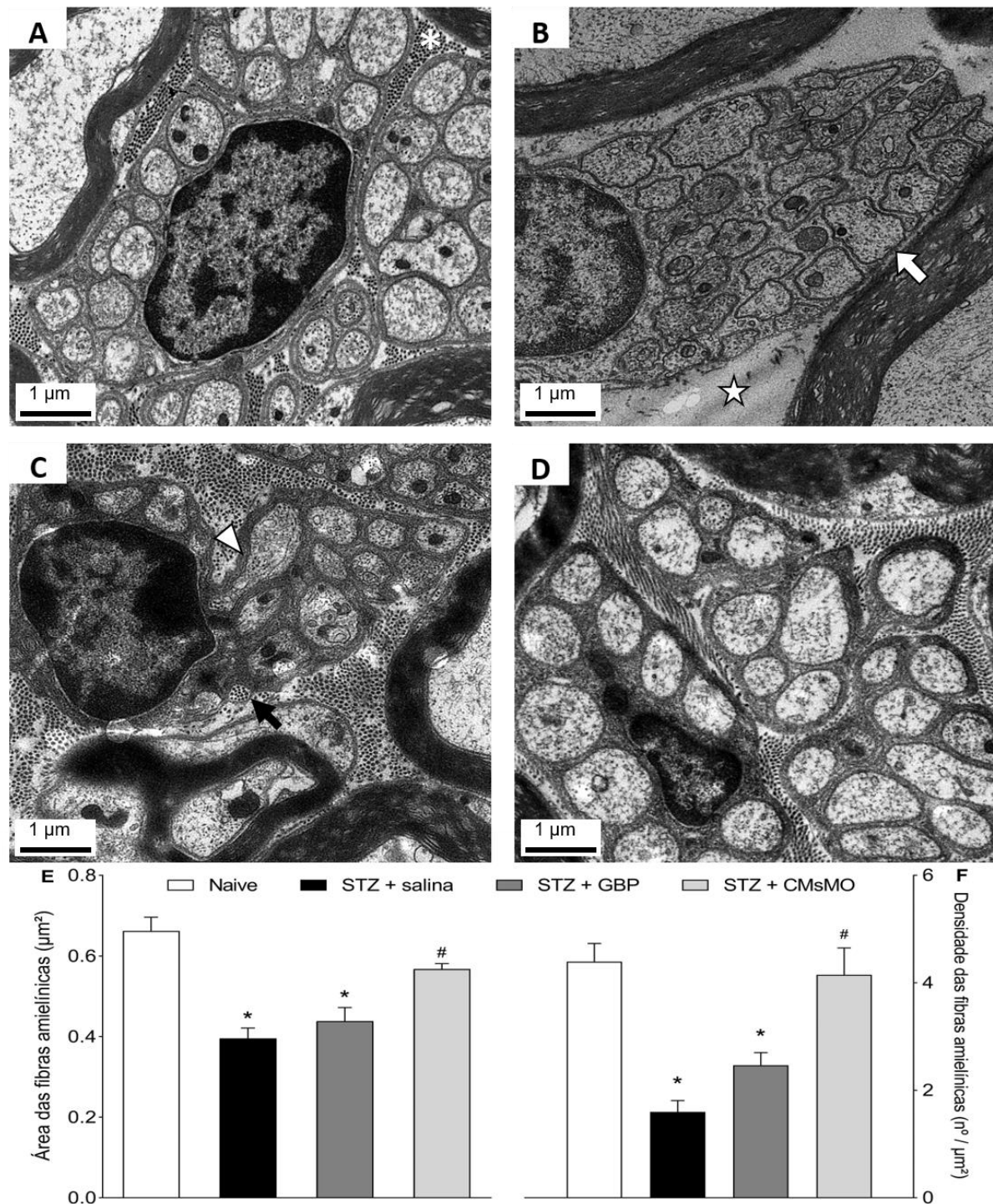


Figura 10: Efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre a morfologia de fibras amielínicas no nervo isquiático de camundongos com neuropatia diabética sensorial.

A-D. Eletromicrografias representativas da morfologia de fibras amielínicas do nervo isquiático de camundongos dos grupos naive (A), STZ + Salina (B), STZ+GBP (C) e STZ+CMsMO (D). O asterisco no painel A indica a presença de feixes colágenos no espaço endoneural e a sua ausência indicada pela estrela presente no painel B. A seta branca indica fibra amielínica de aspecto encolhido. No painel C, a ponta de seta indica a presença de aparente processo de desnevarção e a seta preta indica feixes de colágeno envolvidos por prolongamento da célula de Schwann. Escala = 1 μm . Painéis E e F mostram dados da morfometria das fibras amielínicas do nervo isquiático, representando área e densidade das fibra amielínicas, respectivamente. Os dados são expressos como médias \pm SEM; N = 6 camundongos por grupo. * Significativamente diferente do grupo naive ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo STZ + Salina. ANOVA seguido do teste de Tukey.

6.8 EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE A MORFOLOGIA E MORFOMETRIA MITOCONDRIAL EM FIBRAS MIELÍNICAS E AMIELÍNICAS

Considerando que a lesão mitocondrial pode contribuir para o processo de atrofia axonal, realizamos a avaliação qualitativa e quantitativa das mitocôndrias presentes nas fibras mielínicas e amielínicas de animais com NDS. A análise foi realizada através de microscopia eletrônica de transmissão, estando os resultados representados na figura 11. Os aspectos morfológicos e morfométricos atípicos foram evidenciados em comparação a parâmetros pré-estabelecidos como normais (FLATTERS, S. J. & BENNETT, G. J., 2006). As mitocôndrias atípicas foram diferenciadas por possuírem comprimento maior que 265 nm, presença de vacúolo maior que 50% da área mitocondrial com acúmulo de material amorfo eletro-denso nos polos da organela. As figuras 11A-D contêm imagens representativas de mitocôndrias presentes em fibras mielínicas de camundongos de todos os grupos experimentais, enquanto as figuras 11A'-D', representam eletromicrografias de mitocôndrias presentes em fibras amielínicas. A quantificação da atipia mitocondrial, tanto em fibras amielínicas quanto mielínicas, está expressa em porcentagem de atipia mitocondrial nas figuras 11E e F, respectivamente.

A análise dos dados qualitativos permitiu observar organelas com duplas membranas e cristas mitocondriais integras nas fibras mielínicas e amielínicas de animais não-diabéticos (naive) (seta - figura 11A e A'). Com relação ao grupo STZ+Salina, observamos a presença de mitocôndrias com tamanhos maiores que 265 nm (estrela - figura 11B) e com vacúolos superiores a 50% do seu tamanho, associado a presença de material amorfo eletro-denso em um dos polos das organelas (asterisco - figura 11B'). A análise qualitativa das mitocôndrias presentes em fibras mielinizadas e não-mielinizadas não permitiu observar diferenças entre os tratamentos com gabapentina (70 mg/kg, 12h/12h durante seis dias) ou com CMsMO no nervo isquiático de camundongos com neuropatia diabética sensorial (figuras 11C e C' / 11D e D'). Porém, a análise quantitativa da atipia mitocondrial demonstra que animais com neuropatia tratados com salina ou gabapentina apresentaram aumento da porcentagem de mitocôndrias atípicas em fibras amielínicas, efeito não observado no grupo de animais com NDS e tratados com CMsMO (figura 11E). Por outro lado, dados da quantificação de atipia mitocondrial em axônios mielinizados não permitiu observar diferenças estatísticas entre os grupos avaliados (figura 11F).

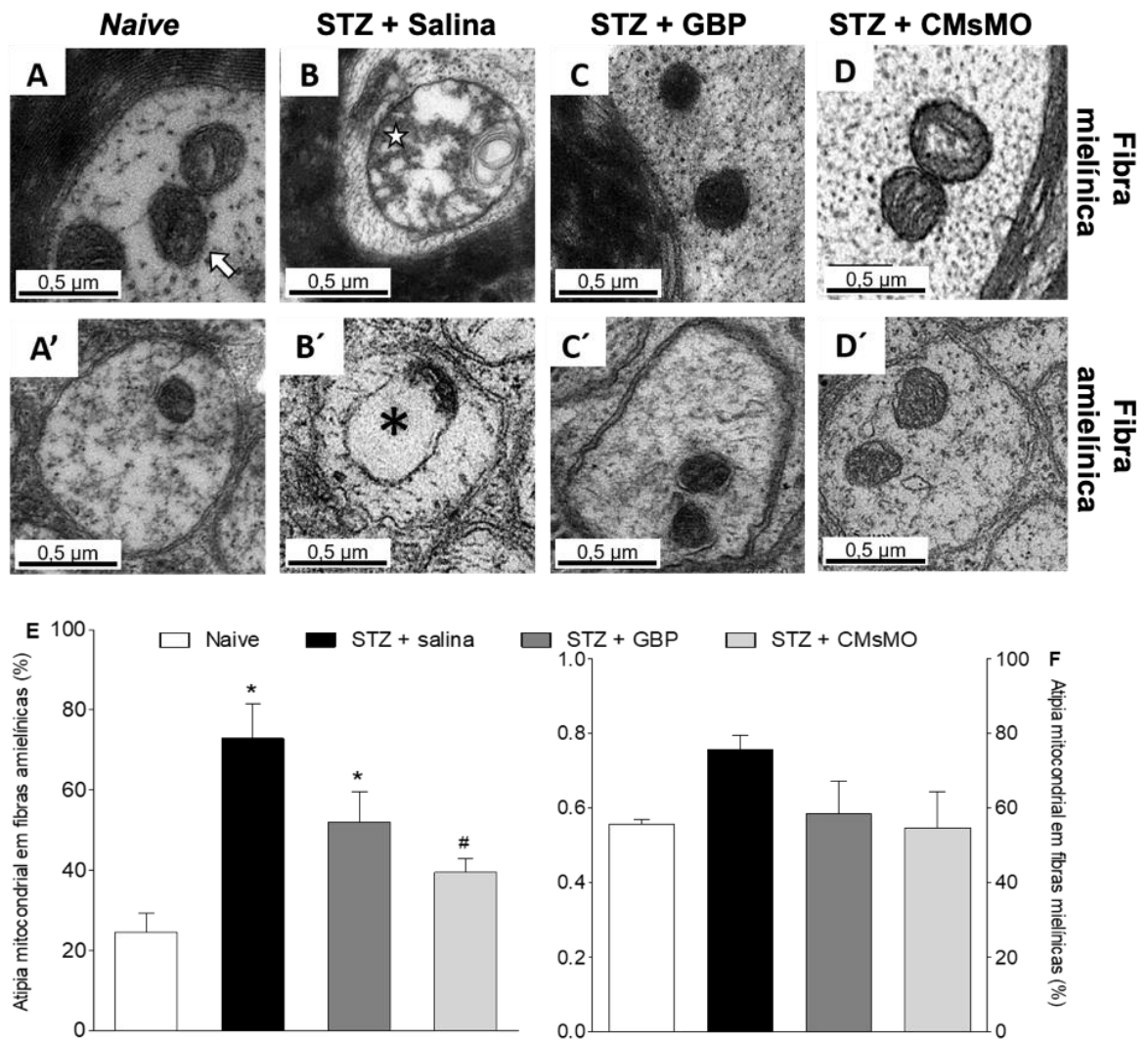


Figura 11: Efeito de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMsMO) sobre a atipia mitocondrial em fibras mielínicas e amielínicas do nervo isquiático de camundongos no modelo de neuropatia diabética sensorial. Painéis A-D. Eletromicrografias representativas da morfologia mitocondrial em fibras amielínicas do nervo isquiático de camundongos dos grupos naive (A), STZ+Salina (B), STZ+GBP (C) e STZ+CMsMO (D). Painéis A'-D' mostram imagens representativas de mitocôndrias dos mesmos grupos experimentais, mas em fibras amielínicas. A seta indica mitocôndria normal contendo membrana e cristas mitocondriais íntegras. A estrela indica uma mitocôndria com tamanho superior a 265 nm e o asterisco evidencia uma mitocôndria com vacúolo que ocupa mais de 50% do seu tamanho e presença de conteúdo eletro-denso na sua periferia. Escala = 0,5 μ m. Análises quantitativas da atipia mitocondrial em fibras amielínicas e mielínicas estão representadas nas figuras E e F, respectivamente. Os dados foram expressos como médias \pm SEM; N = 6 camundongos por grupo. * Significativamente diferente do grupo naive ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo STZ + Salina. ANOVA seguido do teste de Tukey

6.9 EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMsMO SOBRE A EXPRESSÃO DE FATORES ANTIOXIDANTES NA MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS NO MODELO DE NDS

Os níveis da expressão de RNAm de catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e Nrf2 foram avaliados na medula espinal de camundongos dos diferentes grupos, por PCR em Tempo Real, no fim do período experimental (figura 12). Os dados demonstram que os animais neuropáticos tratados com solução salina apresentaram valores elevados de RNAm do fator de transcrição Nrf2 e das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase, em relação ao grupo naive ($p < 0,01$). Em camundongos com NDS tratados com CMsMO (1×10^6) a expressão desses fatores antioxidantes na medula espinal foi reduzida a níveis equivalentes aos de camundongos não neuropáticos.

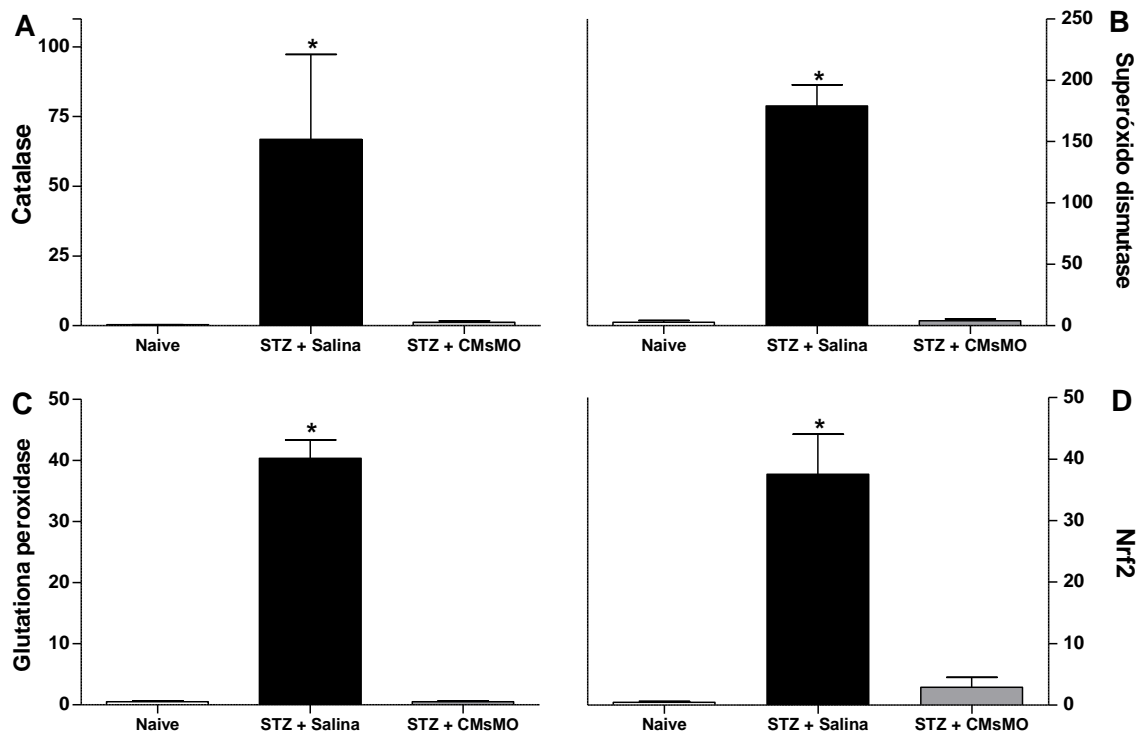


Figura 12: Efeito do transplante de CMsMO sobre o perfil de expressão de fatores antioxidantes na medula espinal de camundongos com neuropatia diabética. Quatro semanas após a indução de neuropatia, os camundongos foram tratados com CMsMO (1×10^6 ; STZ+CMsMO) ou solução salina (STZ+Salina) por via endovenosa. O grupo naive, representa camundongos não diabéticos, que receberam tampão citrato ao invés de estreptozotocina. Os níveis espinais de mRNA foram medidos por RT-qPCR, 8 semanas após os tratamentos. Os painéis mostram os níveis espinais de RNAm de catalase (A), superóxido dismutase (B), glutatona peroxidase (C) e Nrf2 (D). Os dados são expressos como médias \pm SEM; N = 6 camundongos por grupo. * Significativamente diferente dos restantes grupos ($p < 0,001$). ANOVA seguido do teste de Tukey.

6.10 EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMsMO SOBRE OS NÍVEIS ESPINAIS DE NITRITO E MDA EM CAMUNDONGOS NO MODELO DE NDS

Os efeitos de CMsMO sobre o estresse nitrosativo e a peroxidação lipídica foram investigados pela mensuração dos níveis de nitrito e MDA na medula espinal 8 semanas após o transplante. Os níveis de nitrito (Figura 13A) e MDA (Figura 13B) foram significativamente elevados na medula espinal de camundongos diabéticos em comparação com o grupo naive ($p < 0,05$). O tratamento com CMsMO (1×10^6) impediu completamente o aumento dos níveis de nitrito e MDA na medula espinal de camundongos diabéticos.

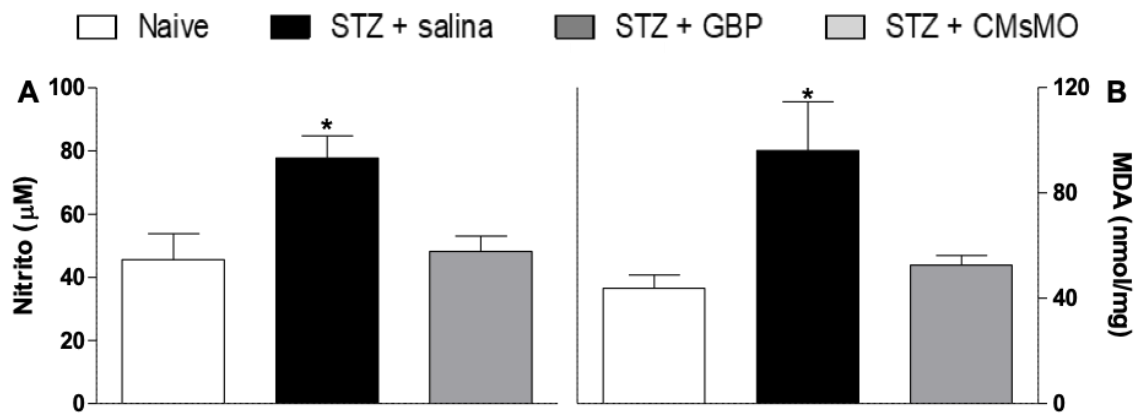


Figura 13: Transplante de CMsMO reduz os níveis de nitrito e MDA na medula espinal de camundongos com neuropatia diabética. Quatro semanas após a indução de neuropatia, os camundongos foram tratados com CMsMO (1×10^6 ; STZ+CMsMO) ou solução salina (STZ+Salina) por via endovenosa. O grupo naive, representa camundongos não diabéticos, que receberam tampão citrato ao invés de estreptozotocina. Os níveis espinais de nitrito (A) e MDA (B) foram medidos 8 semanas após os tratamentos. Os dados são expressos como médias \pm SEM; $N = 6$ camundongos por grupo. * Estatisticamente significativo em comparação ao grupo naive ($p < 0,05$). ANOVA seguido do teste de Tukey.

6.11 EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE A ATIVAÇÃO DE ASTRÓCITOS E MICRÓGLIA NO CORNO DORSAL DA MEDULA ESPINAL DE CAMUNDONGOS NO MODELO DE NDS

A ativação de células gliais na medula espinal é um evento chave no desenvolvimento e manutenção da neuropatia sensorial. Considerando que um único transplante de MSC induziu reversão completa da disfunção sensorial em camundongos diabéticos, uma possível ação moduladora das CMsMO sobre a ativação espinal de células gliais durante a neuropatia foi avaliada. A ativação de micróglia e astrócitos na medula espinal foi analisada por imunofluorescência quantificando, respectivamente, a marcação para Iba1 e GFAP. A figura 14, painéis A a F, mostra fotomicrografias representativas de secções histológicas da medula espinal de camundongos dos diferentes grupos experimentais. A análise qualitativa da marcação por GFAP mostrou uma maior quantidade de astrócitos ativados no corno dorsal da medula espinal de camundongos do grupo STZ+Salina em comparação aos animais dos grupos naive e tratados com CMsMO (figuras 14A-C). O mesmo perfil foi observado ao avaliar o perfil de marcação para micróglia ativada no corno dorsal da medula espinal de camundongos com NDS (figuras 14D-F).

A análise quantitativa dos dados revelou que camundongos diabéticos tratados com solução salina apresentaram maior percentual de área marcada para GFAP (painel G) e Iba1 (painel H) no corno dorsal da medula, em comparação com o grupo controle não diabético (naive) ($p < 0,05$). Em camundongos diabéticos tratados com CMsMO (1×10^6) esse aumento da marcação para GFAP e Iba1 não foi observado, indicando menor ativação de astrócitos e micróglia no corno dorsal espinal desses camundongos.

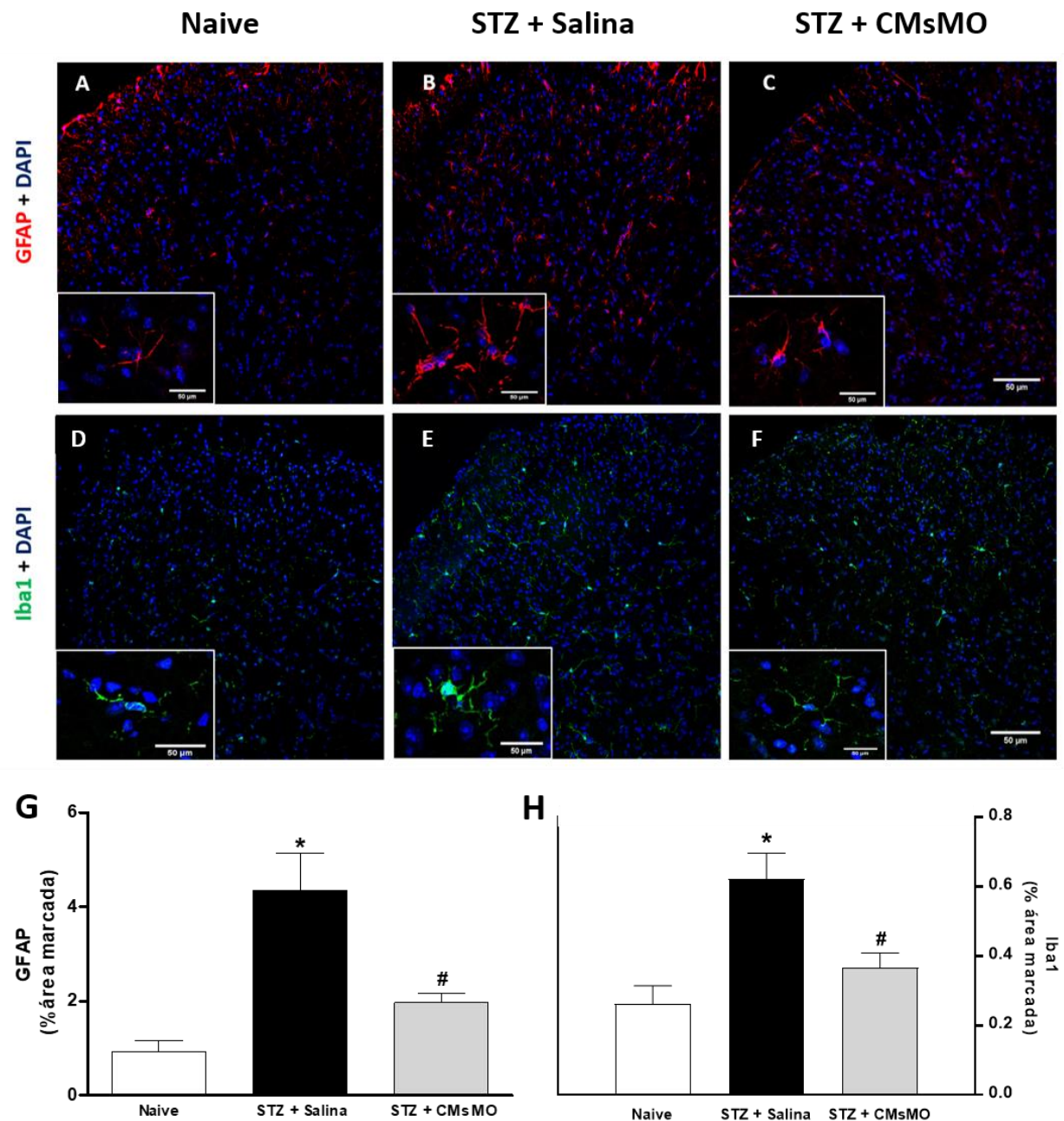


Figura 14: Efeito de CMsMO sobre a ativação de astrócitos e micróglia no corno dorsal da medula espinal de camundongos no modelo de neuropatia diabética sensorial. Oito semanas após o tratamento com CMsMO (1×10^6 ; STZ+CMsMO) ou solução salina (STZ+salina), avaliou-se a expressão de GFAP e Iba1, indicativos de ativação de astrócitos e micróglia, na medula espinal de camundongos dos diferentes grupos experimentais. O grupo naive, representa camundongos não diabéticos, que receberam tampão citrato ao invés de estreptozotocina. Painéis A-C: fotomicrografias representativas da marcação para GFAP no corno dorsal espinal de camundongos dos grupos naive (A), STZ+Salina (B) e STZ+CMsMO (C). Painéis D-F: fotomicrografia representativas da marcação para Iba1 no corno dorsal espinal de camundongos dos grupos naive (D), STZ+Salina (E) e STZ+CMsMO (F). Escala = 50 μm. Os insets evidenciam astrócitos (A-C) e micróglia (D-F) ativados no CDME sob magnificação de 400X. Painéis G e H mostram dados da análise quantitativa da imunomarcação, representados como o percentual da área com células positivas para GFAP e Iba1, respectivamente, no corno dorsal da medula espinal. Os dados são expressos como médias \pm SEM; N = 3 camundongos por grupo. * Significativamente diferente do grupo naive ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo STZ+Salina. ANOVA seguido do teste de Tukey.

6.12 EFEITO DO TRANSPLANTE DE CMSMO SOBRE A EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 NO CORNO DORSAL DA MEDULA ESPINAL DURANTE A ANDS EXPERIMENTAL

A investigação do perfil de expressão de galectina-3 (Gal-3) na medula espinal de camundongos diabéticos foi realizada por imunofluorescência. Na figura 15 estão as imagens representativas da co-marcação galectina-3 e GFAP (A-C), ou galectina-3 e Iba1 (D-F). O painel 15G mostra a análise quantitativa da marcação de galectina-3 no corno dorsal da medula espinal (CDME), sendo representada como porcentagem total de área marcada para galectina-3. Objetivando investigar se a galectina-3 estava expressa no CDME e qual tipo celular seria responsável pela sua expressão, o estudo de co-marcação com indicadores de ativação de astrócito (GFAP) e micróglia (Iba1) foi realizado. A análise qualitativa da marcação conjunta GFAP + Gal-3 não evidenciou astrócitos ativados marcados para a galectina-3 em todos os grupos avaliados (figura 15A-C, *insets*). Porém, o resultado da co-marcação entre Iba-1 e Gal-3 demonstrou células microgliais ativadas e marcadas para galectina-3 somente nos animais do grupo STZ-Salina (figura 15E – *inset*). No entanto, este perfil de co-marcação não foi observado nos animais transplantados com CMsMO, apresentando ausência de co-marcação de forma semelhante aos animais não-diabéticos (figura 15F).

A análise quantitativa da porcentagem de área marcadas para galectina-3 no corno dorsal da medula espinal, revelou que os animais diabéticos tratados com solução salina apresentaram aumento da expressão de Gal-3 no corno dorsal da medula espinal (G), e que um único transplante de CMsMO (1×10^6) reduziu a quantidade de área marcada para esta lectina ($p < 0,05$).

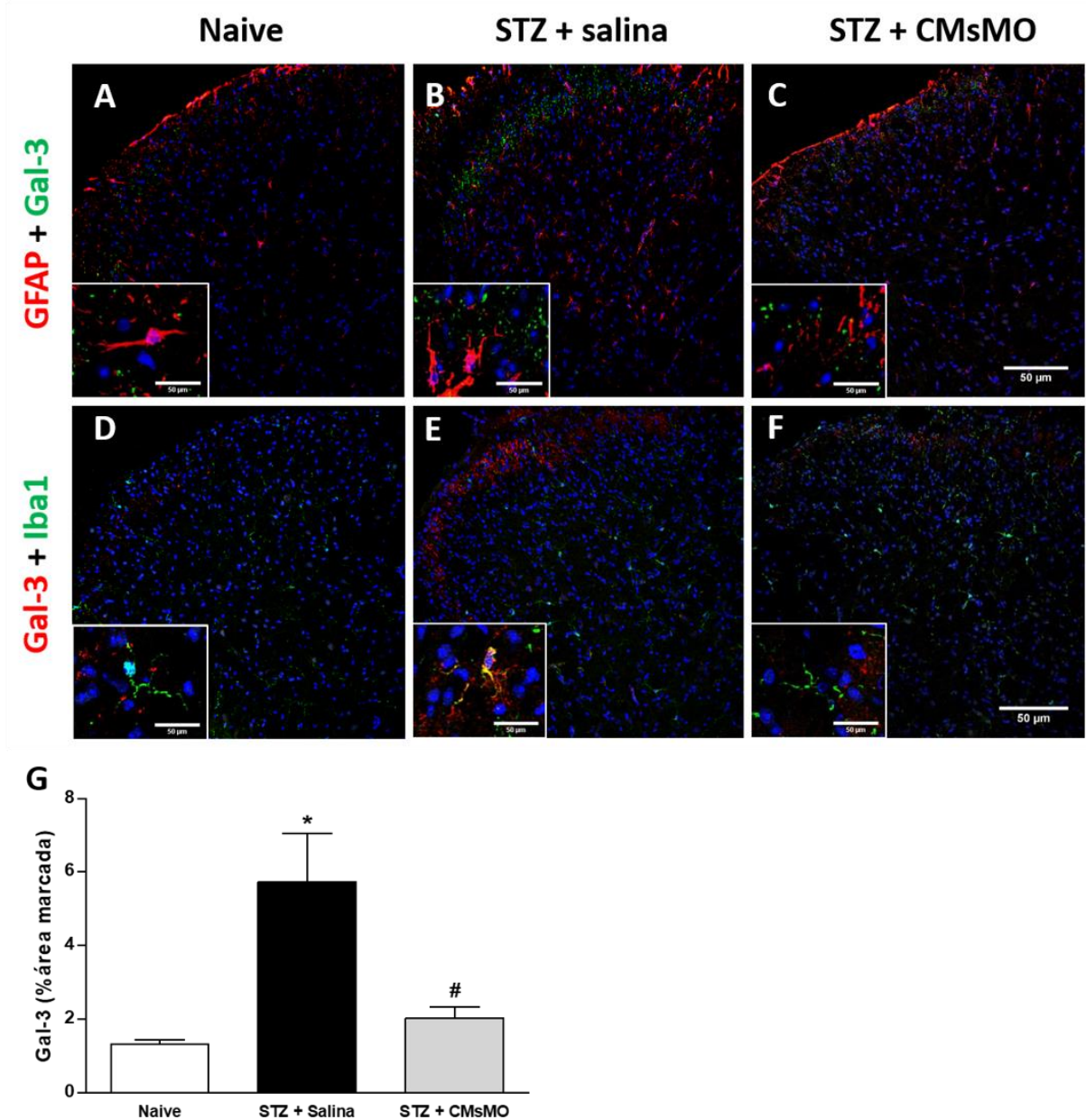


Figura 15: Efeito do transplante de CMsMO sobre a expressão de Gal-3 em células gliais no corno dorsal da medula espinal de camundongos no modelo de neuropatia diabética. (A-C) Fotomicrografias representativas para co-marcação de galectina-3 e GFAP para os diferentes grupos avaliados. (D-F) Imagens representativas para co-marcação de galectina-3 e Iba1 evidenciando a presença de co-marcação apenas não grupo STZ + Salina (*inset*). G - Análise quantitativa da porcentagem de área marcada para galectina-3 no corno dorsal da medula espinal de camundongos diabéticos ($p < 0,05$). Os dados são expressos como médias \pm SEM; N = 3 camundongos por grupo. * Significativamente diferente do grupo naive ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo STZ+Salina. ANOVA seguido do teste de Tukey.

6.13 RASTREIO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA TRANSPLANTADAS EM ANIMAIS COM NDS

Considerando que as CMsMO foram isoladas de doadores EGFP, as células transplantadas foram rastreadas nos tecidos dos camundongos tratados, pela identificação de RNAm de GFP, utilizando RT-qPCR. Amostras de gânglio da raiz dorsal (L4 e L5), nervo isquiático, medula espinal, baço e fígado dos camundongos transplantados foram coletadas 24 horas, uma e três semanas após o transplante (figura 16). Embora tenha sido encontrada uma baixa expressão de RNAm na maioria dos tecidos investigados, os dados mostram que a maior expressão foi detectada no fígado e no baço dos camundongos neuropáticos. A figura 16 revela que 24 horas após o transplante houve uma elevada expressão de GFP RNAm no baço dos camundongos ($p < 0,05$). Uma semana após o transplante foi observada maior expressão de GFP RNAm no fígado dos animais diabéticos. Porém, três semanas após o transplante, os níveis de expressão do GFP foram reduzidos em todas as amostras investigadas.

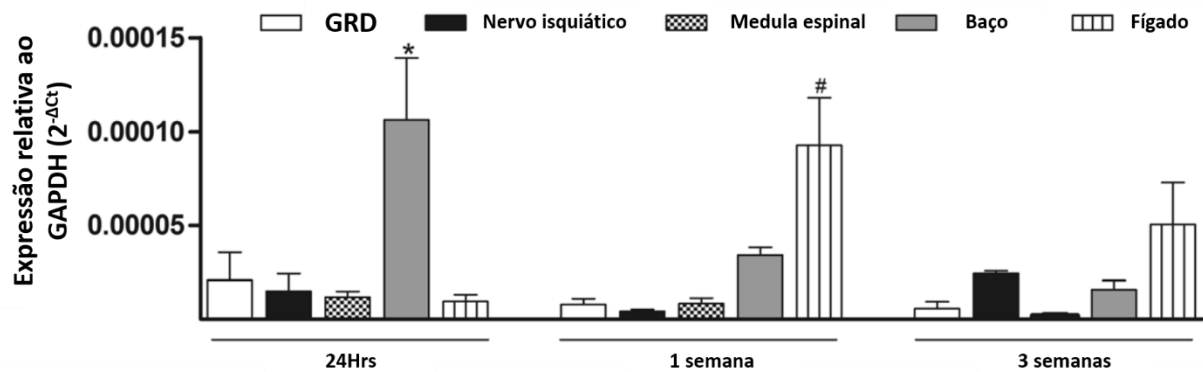


Figura 16: Rastreo das CMsMO transplantadas. Os níveis de RNAm para GFP foram mensurados por qRT-PCR, 24hrs, uma e três semanas após o transplante. O gráfico mostra a expressão de RNAm para GFP no GRD, nervo isquiático, medula espinal, baço e fígado dos animais neuropáticos. Os dados são expressos como médias \pm SEM; N = 5 camundongos por grupo. * Significativamente diferente dos demais grupos no ponto 24h ($p < 0,05$). # Significativamente diferente do grupo GRD, nervo isquiático e medula espinal no ponto 1 semana. ANOVA seguido do teste de Tukey.

6.14 EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DE CMsMO SOBRE A ALODINIA MECÂNICA EM CAMUNDONGOS COM NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL

Com o objetivo de investigar se o efeito parácrino de CMsMO contribui para sua propriedade antinociceptiva, o efeito do tratamento com MC-CMsMO sobre as alterações de sensibilidade durante a NDS foi a seguir avaliado. O MC-CMsMO foi administrado por via endovenosa, uma única vez, em animais com neuropatia diabética sensorial instalada, e o limiar de nociceção ao estímulo mecânico foi medido ao longo de todo o período experimental. Os resultados apresentados na figura 17 demonstram que duas semanas após a infusão do MC-CMsMO, houve completa reversão da alodinia mecânica nos animais com neuropatia diabética ($p < 0,01$). Após esse tempo, o limiar nociceptivo mecânico dos camundongos tratados permaneceu em níveis compatíveis aos de animais *naive* até o final do período experimental.

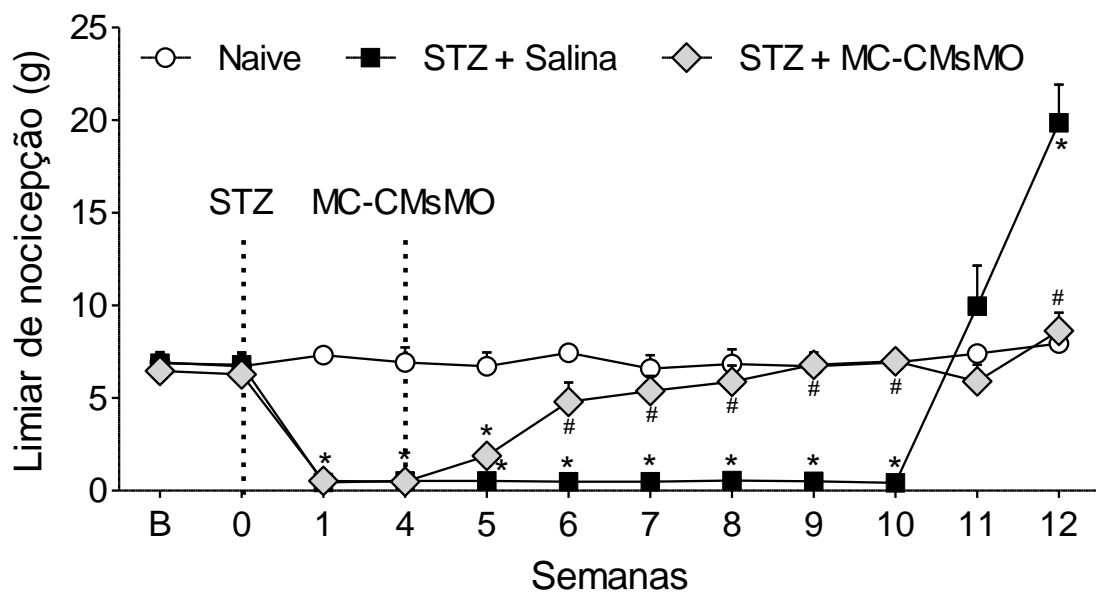


Figura 17: Efeito do meio condicionado de células mesenquimais de medula óssea (MC-CMsMO) sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos em modelo de neuropatia diabética. O eixo das ordenadas representa o limiar de nociceção em gramas. B - Representa o período antes da indução do modelo de diabetes. 0 - Representa uma leitura realizada momentos antes do início da indução do diabetes. A linha pontilhada em 0 indica o início do período de indução do modelo de neuropatia diabética. A linha pontilhada no ponto de 4 semanas indica o momento da administração endovenosa de MC-CMsMO (STZ+MC-CMsMO) ou salina (STZ+Salina). Dados foram expressos como média e E.P.M; $n = 6$ camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo naive ($p < 0,001$). # significância estatística em relação ao grupo STZ+Salina ($p < 0,001$). Teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

6.15 EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DE CMsMO SOBRE A HIPOALGESIA TÉRMICA EM CAMUNDONGOS COM NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL

Com o objetivo de avaliar o efeito da infusão dos produtos secretados pelas CMsMO em meio de cultivo, foi administrado o meio condicionado de CMsMO por via endovenosa, uma única vez, em animais com neuropatia diabética sensorial instalada, e o limiar nociceptivo térmico foi avaliado (figura 18). A infusão do MC-CMsMO reduziu a hipoalgesia térmica em camundongos com NDS uma semana após o tratamento, levando os limiares nociceptivos térmicos desses camundongos para patamares similares aos dos animais não-diabéticos até o fim do período experimental.

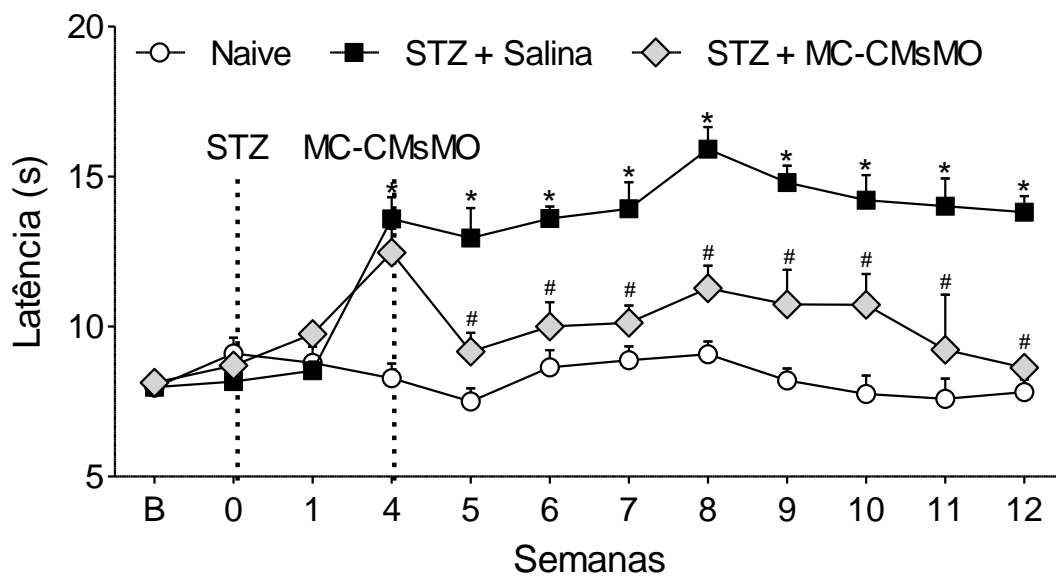


Figura 18: Efeito do meio condicionado de células mesenquimais de medula óssea (MC-CMsMO) sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de neuropatia diabética. O eixo das ordenadas representa a latência em segundos. B – Representa o período antes da indução do modelo de diabetes. 0 – Representa uma leitura realizada momentos antes do início da indução do diabetes. A linha pontilhada em 0 indica o início do período de indução do modelo de neuropatia diabética. A linha pontilhada no ponto de 4 semanas indica o momento da administração endovenosa de MC-CMsMO (STZ+MC-CMsMO) ou salina (STZ+Salina). Dados foram expressos como média e E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. * significância estatística em relação ao grupo naive ($p < 0,001$). # significância estatística em relação ao grupo STZ+Salina ($p < 0,001$). Teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

6.16 CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA

As vesículas extracelulares foram obtidas a partir do meio condicionado proveniente da cultura de CMsMO, e sua quantificação direta foi realizada por NTA, que permitiu a determinação do número e tamanho das partículas em suspensão. Foram realizadas três leituras e a média das leituras foi utilizada como valor absoluto referente à quantificação de partículas/mL (figura 19). O número total de VEs recuperadas a partir de 1×10^6 CMsMO expandidas em cultura foi de $1,65 \times 10^8$ partículas/mL, distribuídas numa faixa de tamanho entre 100 e 500 nm, com tamanho médio de 235,7 nm. A maior frequência do tamanho das partículas (moda) foi de 197,7 nm de diâmetro (Figura 19B).

Além da caracterização das VEs-CMsMO por NTA, as vesículas foram também analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Utilizando MET foi possível identificar vesículas com morfologia arredondada possuindo membrana íntegra e com diferentes tamanhos, corroborando os resultados obtidos no NTA (figura 19C e D). Em conjunto, os dados do NTA e da MET indicam sucesso no protocolo de obtenção de VEs a partir de CMsMO.

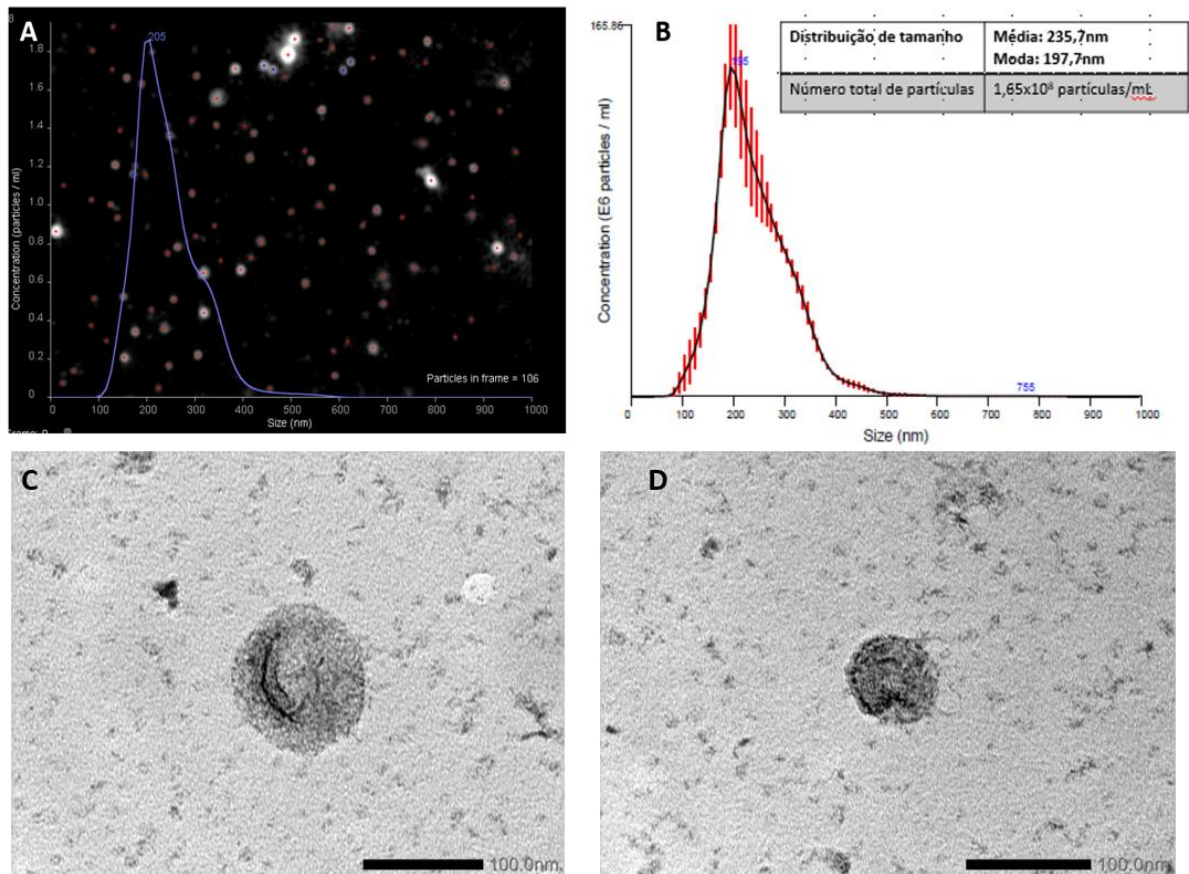


Figura 19: Caracterização e quantificação das VEs derivadas de células mesenquimais de medula óssea. A. Imagem ilustrativa capturada pelo NTA das vesículas extracelulares em suspensão. B. Quadro contendo média, moda e número total de partículas (VEs) e gráfico representativo mostrando a relação entre a quantidade de vesículas por mL (eixo Y) vs. tamanho das partículas (nm) (eixo X). C e D mostram eletromicrografias representativas das VEs-CMsMO.

6.17 CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E COMPARAÇÃO COM UM BANCO PÚBLICO DE DADOS

O conteúdo proteico das VEs tem sido amplamente avaliado a partir de amostras de vários tipos celulares e fluidos biológicos. Em virtude do extenso número de dados encontrados, nos últimos anos, bancos de dados têm sido criados com o objetivo de fornecer uma lista do conteúdo molecular das VEs de múltiplos organismos. Com o intuito de determinar a composição proteica das VEs-CMsMO, foi realizada a análise proteômica por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo scientific) e foi utilizado o banco público de dados *Vesiclepedia* para realizar o *download* do total de proteínas previamente encontradas em VEs. No total, foram identificadas 42 proteínas nas amostras de VEs-CMsMO, identificadas na tabela 2. Os dados de comparação das proteínas encontradas nas VEs-CMsMO com as já depositadas no *Vesiclepedia*, revelam que, das 42, quatro ainda não foram identificadas em vesículas extracelulares, as quais estão listadas em vermelho no final da tabela 2. Estes dados mostram que, entre o número de proteínas compartilhado com o *Vesiclepedia*, observou-se a presença de proteínas que estão conservadas em amostras de VEs, entre elas, proteínas chaperonas, integrinas e GTPases. Por outro lado, as quatro proteínas que ainda não estavam presentes no banco de dados estão correlacionadas a processos como ligação a ácidos nucleicos, atividades catalítica e proteolítica. Vale ressaltar que a análise proteômica feita neste estudo resultou em um número muito baixo de proteínas, fato que torna essa avaliação sobre o conteúdo proteico das VEs-CMsMO pouco informativa e confiável. Dessa forma, é fundamental a repetição da análise proteômica das VEs-CMsMO antes que se possa concluir sobre seu conteúdo proteico.

Tabela 2: Lista das 42 proteínas identificadas no proteoma de VEs-CMsMO.

Nº de acesso	Símbolo gênico	Nome da proteína
P61922	Abat	4-aminobutirato aminotransferase mitocondrial
Q8JZN5	Acad9	Acetil-CoA desidrogenase 9
P07830	Act	Actina
Q8BFZ3	Actb12	Proteína semelhante a beta-actina 2
P35585	Ap1m1	Adaptina complexo mu-1
P28653	Bgn	Biglicano
D3YXL0	Ccdc170	<i>Coiled-Coil Domain Containing 170</i>
Q5SS80	Dhrs13	Desidrogenase/reductase 13
Q8VCE1	Dnajc28	Membro C28 da subfamília DNAJ
Q6S7F2	E2F7	Fator de transcrição E2F7
P29391	Ftl1	Polipeptídeo de cadeia leve da ferritina 1
Q3V0G7	Garnl3	Proteína do tipo Rap / Ran-GAP ativadora de GTPase 3
P14432	H2-T3	<i>thimus leukemia antigen</i>
P62806	Hist1h4a	Histona H4
Q00547	Hmmr	Receptor de motilidade mediado por hialuronano
P62748	Hpcal1	Proteína semelhante a hipocalcina 1
P24815	Hsd3b1	Beta-hidroxisteroide desidrogenase/Delta5-4 isomerase tipo 1
P0055	Itgb1	Beta- integrina 1
Q8R4U7	Luzp1	Proteína zipper leucina 1
P17897	Lyz1	Lizozima C-1
Q99J21	Mcoln1	Mucolipina - 1
Q60974	Ncor1	Receptor nuclear co-repressor 1
O35516	Notch2	Proteína homóloga neurogênica do Notch, locus 2
Q8CEG0	Panx3	Panexina 3
P00762	Prss1	Tripsina 1 aniônica
P32261	Serpinc1	Antitrombina - III
P07214	Sparc	Osteonectina
Q99N48	Syt13	Sinaptogmina
E9PV87	Talpid3	Talpid3
Q8TDR4	Tcp10	Homólogo da proteína 10A do complexo T
Q9R0T7	Try4	MCG15085
P68369	Tuba1	Cadeia de tubulina alfa-1
P68368	Tubb4	Tubulina, cadeia beta-4A
P20152	Vim	Vimentina
Q924Z6	Xpo6	Exportina-6
P68254	Ywha4	Proteína teta 14-3-3
Q61329	Zfx3	Proteína zinc finger homeobox 3
B1ASA5	Zfp362	Proteína zinc finger 362

L7N248	Gm6871	Gene previsto 6871
Q8CD19	Lancl3	<i>LanC-like protein 3</i>
Não encontrado	SfnAnxa6	Não encontrado
Q792Z1	Try10	MCG140784

6.18 EFEITO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CMSMO SOBRE A ALODINIA MECÂNICA EM CAMUNDONGOS COM NEUROPATIA DIABÉTICA SENSORIAL

Para investigar a hipótese de mecanismo de ação parácrino de CMsMO, o efeito da administração de VEs-CMsMO sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos com neuropatia diabética sensorial, foi avaliado. Os dados expressos na figura 20 demonstram que uma única administração via endovenosa de VEs-CMsMO foi capaz de reverter a alodinia mecânica instalada em animais diabéticos ($p < 0,01$). O efeito antinociceptivo de VEs-CMsMO iniciou duas semanas após o tratamento e foi mantido ao longo de todo o período experimental. O tratamento VEs-CMsMO produziu o mesmo padrão de efeitos sobre a neuropatia sensorial comportamental que foi observado após o tratamento com MC-CMsMO e com CMsMO.

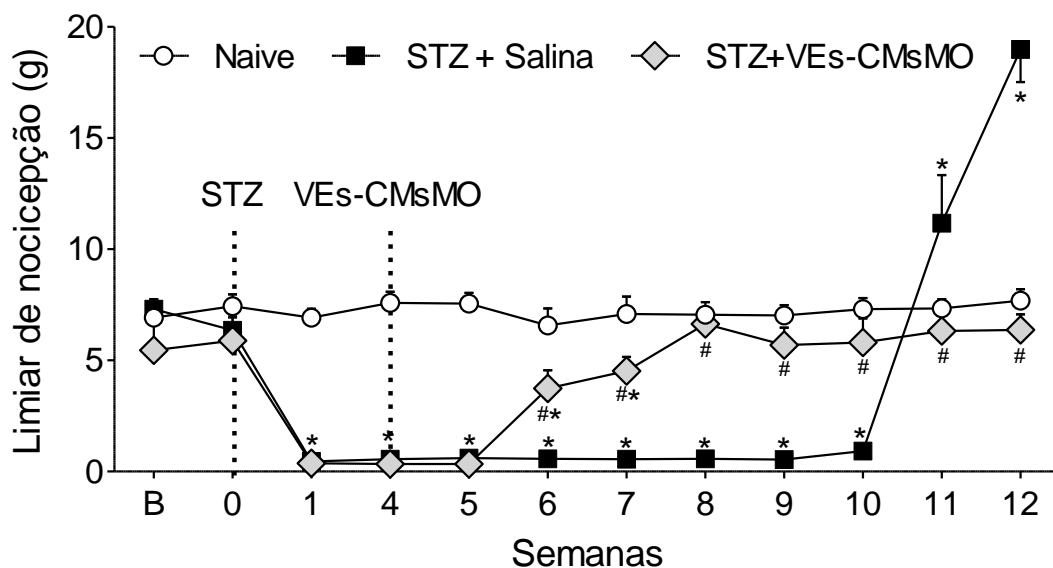


Figura 20: Efeito das vesículas extracelulares de células mesenquimais de medula óssea (VEs-CMsMO) sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos em modelo de neuropatia diabética. O eixo das ordenadas representa o limiar de nociceção em gramas. B - Representa o período antes da indução do modelo de diabetes. 0 - Representa uma leitura realizada momentos antes do início da indução do diabetes. A linha pontilhada em 0 indica o início do período de indução do modelo de neuropatia diabética. A linha pontilhada no ponto de 4 semanas indica o momento da administração endovenosa de VEs-CMsMO (STZ+VEs-CMsMO) ou salina (STZ+Salina). Dados foram expressos como média e E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. * significância

estatística em relação ao grupo naive ($p < 0,001$). # significância estatística em relação ao grupo STZ+Salina ($p < 0,001$). Teste de Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

7 DISCUSSÃO

A neuropatia diabética está associada a sintomas sensoriais controversos, como dor e perda de sensibilidade, para os quais não há terapia efetiva, reduzindo consideravelmente a qualidade de vida do paciente. O presente estudo demonstrou que uma única administração de CMsMO foi capaz de reverter a neuropatia diabética sensorial através da modulação de eventos cruciais para a manutenção da neuropatia no sistema nervoso periférico e central, destacando o potencial de terapia celular para o tratamento da neuropatia.

A estreptozotocina é um antibiótico tóxico para as células β -pancreáticas amplamente utilizado em modelos experimentais para indução diabetes. Neste sentido, vários protocolos utilizando a STZ têm sido adotados em estudos experimentais de diabetes do tipo I e II (FURMAN, 2015). Neste trabalho, utilizamos um protocolo de indução do diabetes tipo I estabelecido por nosso grupo, o qual foi capaz de desenvolver uma hiperglicemia duradoura, associada a complicações renais e neuropatia em camundongos, sendo considerado um bom modelo experimental para estudo das consequências patológicas do diabetes tipo I e avaliação de abordagens terapêuticas (GUIMARÃES et al., 2013b).

O desenvolvimento da neuropatia sensorial foi confirmado pelo uso de ensaios comportamentais estabelecidos, capazes de detectar alodinia mecânica e hipotalgesia térmica, que são sinais característicos de neuropatia diabética em camundongos (WATERMAN et al., 2012). Cerca de 40% dos indivíduos com ND relatam sentir alodinia mecânica primária (BASTYR et al., 2005), progredindo para a perda de percepção sensorial nos estágios tardios da doença, o que está intimamente relacionado aos casos de ulceração de membros e amputação (OBROSOVA, 2009). Além disso, a perda sensitiva, combinada com a perda de propriocepção pode acarretar desequilíbrio e instabilidade da marcha, aumentando a probabilidade de quedas que podem resultar em lacerações, fraturas ou traumatismo cranio-encefálico (SINCLAIR et al., 2012). No presente estudo, a alodinia mecânica foi completamente instalada 4 semanas após a administração de STZ e evoluiu para a perda de sensibilidade tátil 12 semanas após a STZ, indicando boa equivalência entre o modelo e a manifestação clínica. O transplante CMsMO reverteu completamente os sinais de neuropatia sensorial instalada em camundongos diabéticos induzidos pela STZ. De fato, a melhora da neuropatia sensorial comportamental em camundongos diabéticos tratados com células-tronco mesenquimais já tinha sido demonstrada (SHIBATA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2013; WATERMAN et al., 2012). Porém, a comparação do efeito com a droga de referência para o tratamento clínico da neuropatia, ainda precisava ser investigada. Em nossos experimentos, demonstramos que a administração diária

da gabapentina produziu efeito transitório dose-dependente na normalização dos limiares nociceptivos térmico e mecânico. Esta possui um papel bem estabelecido no controle da dor neuropática em pacientes diabéticos, porém com moderada eficácia, estando associada a múltiplos efeitos colaterais como tonturas, fadiga, ataxia, ganho de peso e sonolência, os quais dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento (MOORE et al., 2018; VINIOL et al., 2019).

Evidências indicam que as CMsMO podem atuar como fontes de compostos bioativos, liberando moléculas analgésicas responsáveis por mediar os efeitos terapêuticos dessas células na dor neuropática (SINISCALCO et al., 2007). No presente estudo, a reversão da neuropatia sensorial obtida após uma única injeção de CMsMO foi mantida ao longo do período de avaliação, um efeito que não é atingido pelos fármacos clinicamente disponíveis para o controle da dor. Este mesmo feito também foi observado por GUO e colaboradores (2011) ao demonstrar que um único transplante de CMsMO, por via endovenosa ou local, reverteu a hipersensibilidade a dor em modelo experimental de disfunção temporomandibular. Além disso, estes autores evidenciaram que o bloqueio farmacológico com naloxona reverteu a analgesia observada com o transplante, fornecendo evidências do envolvimento dos receptores opioides na analgesia mediada pelas CMsMO.

Os dados apresentados no presente trabalho, mostram que além de promover efeito analgésico, o transplante de CMsMO também preveniu a perda de sensibilidade. Este perfil de efeito sugere que uma ação protetora e/ou regenerativa, mais do que apenas um efeito analgésico, pode ser obtida após o tratamento com CMsMO. Este conceito é suportado por dados da literatura mostrando que o tratamento com CMsMO induz angiogênese, efeitos neuroprotetores e restauração da mielinização em nervos periféricos de animais diabéticos (SHIBATA et al., 2008; KIM et al., 2011). Neste sentido, as análises ultraestruturais de fibras mielinizadas e não mielinizadas do nervo isquiático, apresentadas aqui, corroboram essa hipótese. A análise morfológica e morfométrica do nervo isquiático mostrou diferenças significativas entre fibras sensoriais de camundongos diabéticos e não diabéticos, como presença de alterações degenerativas em axônios, alterações morfológicas na bainha de mielina, área, densidade e atipia mitocondrial em fibras não mielinizadas.

Dentre as alterações vistas neste trabalho, a atrofia axonal associada a deformidades da bainha de mielina foi a alteração morfológica encontrada em fibras mielinizadas de camundongos com neuropatia diabética sensorial. Em 1998, (YIN et al., 1998) demonstrou que a redução do calibre do axônio pode ser provocada pela diminuição do espaçamento e fosforilação dos neurofilamentos, resultando em degeneração axonal e colapso da bainha de mielina. Esta presença de atrofia axonal associada a alteração na compactação e dobramento da

bainha de mielina para o axoplasma (*infolding*) esta relacionada com mudanças nas proteínas da mielina, tais como a proteína básica da mielina (PBM), a glicoproteína zero (P0) e a glicoproteína associada a mielina (MAG – do inglês, *myelin-associated glycoprotein*) em animais com neuropatia diabética sensorial (AZCOITIA et al., 2003; VEIGA et al., 2006). Neste sentido, o envolvimento da célula de Schwann, reponsáveis por nutrir o axônio atuando na manutenção da estrutura e função neuronal é componente chave no desenvolvimento das alterações de mielina descritas acima. Já é documentado que a desregulação metabólica provocada pelo diabetes resulta em acúmulo de intermediários neurotóxicos que comprometem a produção de fatores de suporte neuronal, tais como BDNF, VEGF, NGF e neurotofina-3 (NT-3), contribuindo para degeneração axonal, disfunção endotelial e neuropatia diabética (GONÇALVES et al., 2017).

Durante o desenvolvimento, algumas células de Schwann se associam a um axônio e iniciam o processo de mielinização. Porém, outras células de Schwann não produzem mielina, mas continuam a aprisionar um ou mais axônios em feixes de fibras nervosas não-mielinizadas, conhecidas como feixes Remak (MURINSON e GRIFFIN, 2004). As fibras não-mielinizadas, normalmente codificam uma variedade de estímulos nocivos que desempenham um papel importante na prevenção da lesão tecidual. Porém, esta função pode estar prejudicada na neuropatia diabética sensorial (LENNERTZ et al., 2011). Um estudo publicado por (KAMIYA et al., 2005) demonstrou que o diabetes do tipo I pode provocar lesão degenerativa da fibra nociceptiva levando a perda de fibras amielínicas. Com isso, a análise do perfil qualitativo e quantitativo das fibras amielínicas contidas nos feixes Remak de camundongos diabéticos foi avaliada, assim como foi investigado se o tratamento com CMsMO é capaz de modificar o padrão de alterações descrito. Nossos dados demonstraram que animais transplantados com CMsMO apresentaram ausência de atrofia axonal em feixes Remak, indicando que o tratamento com as células mesenquimais pode exercer ação protetora sobre as alterações morfológicas e morfométricas encontradas em camundongos com neuropatia diabética sensorial.

Corroborando com as alterações encontradas em fibras mielínicas e amielínicas, a investigação da contribuição da lesão mitocondrial na neuropatia diabética sensorial tem se tornado relevante, visto que a hiperglicemia afeta a integridade das fibras sensoriais e aumenta a vulnerabilidade de comprometimento mitocondrial (BARRIÈRE et al., 2018). Em nosso estudo, a avaliação da presença de atipia mitocondrial em camundongos com neuropatia sensorial demonstrou um elevado número de mitocôndrias atípica em fibras amielínicas de animais tratados com salina ou gabapentina, podendo inferir que a lesão mitocondrial, assim como a atrofia axonal ocorra primariamente em fibras amielínicas. Por outro lado, o tratamento

com CMsMO conseguiu evitar as alterações mitocondriais vistas em animais com NDS. Este conjunto de dados evidencia que, nos camundongos diabéticos tratados com CMsMO, todas essas alterações morfológicas, consideradas como marca registrada da ND, foram significativamente menores, indicando que a terapia celular exerceu ação neuroprotetora em estruturas de fibras sensoriais de nervos diabéticos. Em linha com nossos dados, um estudo mostrou que os CMsMO foi capaz de modular a ultraestrutura de fibras mielinizadas no nervo diabético, ao mesmo tempo que dão a primeira evidência da ação restaurativa de CMsMO em fibras C (HAN et al., 2016).

Alterações morfológicas e funcionais das fibras nociceptivas A δ e C, presentes nos nervos periféricos, foram propostas para explicar as mudanças na sensibilidade e dor durante a neuropatia diabética, indicando que a neuropatia dolorosa está associada a perda de pequenas fibras mielinizadas e não-mielinizadas (SIMA e ZHANG, 2014). A manutenção da hiperglicemia durante muito tempo danifica os nervos sensoriais, que modifica o padrão de transmissão neural subjacente à perda/aumento da sensibilidade aos estímulos dolorosos (O'BRIEN et al., 2014; JOLIVALT et al., 2016). No entanto, o controle glicêmico com insulina podem melhorar a hipoalgesia, excluindo a possibilidade da STZ ser causa de toxicidade nos nervos periféricos (DOBRETsov et al., 2007).

Uma relação entre o número reduzido de fibras sensoriais nos nervos periféricos e a hipossensibilidade térmica/mecânica em ratos diabéticos foi proposta por Lennertz e colegas (2011) e reforçada aqui. Estes autores relataram que a lesão provocada pela hiperglicemia pode gerar um aumento do limiar de detecção ao estímulo térmico quente e mecânico de animais com neuropatia diabética sensorial. Portanto, é possível que o efeito duradouro dos CMsMO que revertem a neuropatia sensorial comportamental decorra mesmo do restabelecimento da ultraestrutura dos nervos periféricos no diabetes.

Além dos efeitos anteriormente descritos de CMsMO sobre os nervos periféricos, o presente estudo é pioneiro ao descrever redução do estresse oxidativo na medula espinal de animais tratados com CMsMO, apontando para novos mecanismos pelos quais as células-tronco mesenquimais podem melhorar a NDS. Os mecanismos subjacentes à manutenção da NDS envolvem múltiplas alterações bioquímicas e celulares no sistema nervoso central, o que pode ser um fator contributivo na natureza refratária da neuropatia diabética. A hiperglicemia perturba a homeostase da medula espinal, podendo ser responsável por induzir anormalidades metabólicas e enzimáticas, além de interromper as funções das mitocôndrias induzindo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs / ERNs) e estresse oxidativo (STEVENS et al., 2000; FELDMAN, 2003; PABREJA et al., 2011; WANG et al.,

2014). A subsequente formação de EROs/ERNs induzem a ativação da micróglia espinal (WANG et al., 2014), provocando uma cascata neuroinflamatória espinal que foi considerada um evento fundamental da neuropatia sensorial (TSUDA et al., 2008; PABREJA et al., 2011; CHEN et al., 2016). Em consonância com esta ideia, o presente estudo mostrou por imunofluorescência, que o GFAP e o Iba-1, marcadores de astrócitos e microglia ativados, respectivamente, foram altamente expressos no corno dorsal da medula espinal em camundongos diabéticos. É importante salientar, que essa regulação positiva foi diminuída com o transplante de CMsMO, sugerindo que este tratamento suprime a ativação espinal de astrócitos e micróglia. Este efeito inibitório das células mesenquimais sobre a ativação das células gliais espinais foi demonstrado em dores neuropáticas experimentais associadas à lesão da medula espinal (WATANABE et al., 2015) ou ligadura do nervo espinal (CHEN *et al.*, 2016), mas esta é a primeira demonstração desse fenômeno na neuropatia diabética.

Considerando a contribuição do estresse oxidativo para a ativação das células gliais, também foi investigada a homeostase redox na medula espinal. O estresse nitroso e a peroxidação lipídica, indicados por altos níveis de nitrito e MDA na medula espinal foram evidenciados em camundongos diabéticos. A alta produção de EROs/ERNs é controlada pela ativação do sistema de defesa antioxidante celular, que inclui uma gama de enzimas antioxidantes (TRACHOOTHAM et al., 2008). De fato, os dados de qRT-PCR mostraram uma regulação da catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e RNAm de Nrf2 na medula espinal de camundongos neuropáticos, corroborando a presença do estresse oxidativo no microambiente da medula espinal de animais diabéticos. Claramente, o tratamento com CMsMO reverteu as evidências do estresse oxidativo na coluna vertebral, um efeito que provavelmente é determinante para redução da ativação glial.

As propriedades antioxidantes das células mesenquimais foram evidenciadas por estudos *in vitro* (WHONE et al., 2012; YALVAÇ et al., 2013) e *in vivo* (LI et al., 2012; LIN et al., 2013). De acordo com os dados atuais, demonstrou-se que as células mesenquimais influenciam o contexto redox na medula espinal em modelos de lesão traumática da coluna vertebral (LIN et al., 2013) e esclerose lateral amiotrófica (UCCELLI et al., 2012), e essa propriedade provavelmente está associada aos seus efeitos terapêuticos.

A galectina-3 é um membro da família das lectinas ligantes dos β -galactósidos, que desempenha um papel importante nos mecanismos da inflamação (HSU et al., 2000; LIU et al., 2002; CHEN et al., 2006; JIANG et al., 2009). Uma vez que a galectina-3 está envolvida no estresse oxidativo (KARLSSON et al., 1998; LIU et al., 2002; DOVERHAG et al., 2010) e neuroinflamação na medula espinal (PAJOOHESH-GANJI et al., 2012; PRINS et al., 2016),

foi importante avaliar a expressão desta lectina na medula de ratos diabéticos. Os dados de imunofluorescência mostraram um aumento da expressão da galectina-3 no corno dorsal superficial da medula espinal dos camundongos diabéticos, apontando pela primeira vez um possível papel da galectina-3 na neuroinflamação associada à neuropatia sensorial diabética. Reforçando essa ideia, recentemente foi descrito que a galectina-3, segregada na medula espinal pela micróglia, está envolvida com a dor da neuralgia induzida pelo tipo 1 do vírus *Herpes simplex* (TAKASAKI et al., 2012). Neste contexto, o transplante de CMsMO reduziu a expressão de galectina-3 na medula espinal de camundongos diabéticos, destacando o amplo efeito inibitório induzido pelas células mesenquimais na resposta neuroinflamatória espinal desencadeada pela hiperglicemia. Juntos, os dados atuais indicam que, além das ações benéficas das CMsMO no sistema nervoso periférico, o bloqueio da cascata neuroinflamatória espinal pode ser considerado um importante mecanismo terapêutico das células mesenquimais durante a neuropatia diabética.

Dados do nosso trabalho demonstraram que após o transplante, as CMsMO possuem uma tendência em migrar para órgãos filtrantes e mesmo assim serem capazes de produzir efeito na neuropatia diabética, fenômeno que pode ser explicado por sua atividade parácrina. A demonstração de que muitos efeitos terapêuticos das células-tronco decorrem dos fatores solúveis (secretoma) que essas células secretam, abriu novas perspectivas para a sua utilização como fonte de moléculas terapêuticas, e não como o agente terapêutico *per se*. Essa abordagem, denominada terapia *cell-free*, tem sido validada como um conceito inovador e promissor para a ampliação da aplicabilidade terapêutica de células-tronco e a viabilização desse conceito pode representar um método inovador para a medicina regenerativa, inclusive no tratamento das afecções do sistema nervoso.

Em nosso estudo, a utilização do meio condicionado derivado do cultivo de células mesenquimais de medula óssea foi capaz de normalizar permanentemente os limiares nociceptivos térmico e mecânico dos animais com NDS. Neste contexto, em 2017, pesquisadores italianos conseguiram comparar o efeito do tratamento de células mesenquimais e seu secretoma em modelo animal de neuropatia dolorosa. Seus resultados demonstraram que ambos os tratamentos foram capazes de promover antinocicepção e restabelecer o equilíbrio Th1/Th2 no nervo periférico, medula espinal e gânglio da raiz dorsal de animais neuropáticos (BRINI et al., 2017). Um efeito semelhante foi observado por nosso grupo. Usando um modelo bem caracterizado de dor neuropática por lesão parcial do nervo isquiático, conseguimos demonstrar que o meio condicionado a partir do secretoma de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, foi capaz de produzir um efeito antinociceptivo potente e duradouro,

semelhante ao tratamento com CMsMO, e que tal efeito pôde ser mediado pela redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de IL-10 a nível periférico e central. Ao realizarmos uma análise prévia do secretoma de MSC, foi observada a presença de fatores de crescimento e citocinas que estão intimamente relacionadas na antinocicepção e reversão da neuroinflamação (GAMA et al., 2018).

O secretoma de células mesenquimais é constituído por fatores solúveis e vesículas extracelulares (VEs) que contém moléculas biologicamente ativas como fatores de crescimento, citocinas e RNAs (ANGULSKI et al., 2017). Ao serem liberados pelas células, estes fatores podem ser absorvidos por células do microambiente ou cair na corrente sanguínea chegando a órgãos distantes, podendo inclusive atravessar a barreira hemato-encefálica e alterar o metabolismo celular reduzindo a neuroinflamação (BAGLIO et al., 2015). Neste estudo, conseguimos isolar e caracterizar de acordo o seu tamanho, conteúdo proteico e quantidade, as vesículas extracelulares derivadas das células mesenquimais de medula óssea. Os ensaios com o NTA revelaram a presença de vesículas com uma variação de tamanho de 100 a 500nm e a observação por MET demonstrou a presença de VEs arredondadas delimitadas por uma dupla membrana. Neste contexto, baseados no seu tamanho e origem, três tipos de vesículas extracelulares são comumente conhecidos: os exossomas, classificados como vesículas extracelulares derivadas do endossoma tardio e com um tamanho de cerca de 40 a 150nm; as microvesículas, as quais possuem um diâmetro variável de 200nm a 1µm e que se originam a partir do brotamento da membrana plasmática; e por fim, os corpos apoptóticos, que são liberados por células em apoptose, sendo vesículas com 500-2.000nm de diâmetro e com formato irregular (KIM et al., 2017a). Assim, o protocolo de isolamento das VEs-CMsMO utilizado em nosso estudo foi capaz de extrair vesículas extracelulares do tipo exossomas e microvesículas em nossas amostras. Porém, a análise proteômica do conteúdo de VEs-CMsMO revelou um número muito baixo de proteínas em vesículas extracelulares de CMsMO, oferecendo assim dados não informativos e pouco confiáveis, fato que poderá ser solucionado com a readequação do protocolo utilizado.

Ao avaliar o efeito das VEs-CMsMO sobre o limiar nociceptivo mecânico de animais diabéticos, pudemos perceber que as VEs derivadas das células mesenquimais produziram efeito semelhante aos encontrados na investigação com as células e o seu meio condicionado. Neste sentido, é possível que VEs-CMsMO também possuam efeito sobre a neuroinflamação. De fato, pesquisadores conseguiram demonstrar que a aplicação de VEs, foi capaz de melhorar a recuperação funcional e reduzir a neuroinflamação em modelo animal de traumatismo craniano através da mudança de polarização da micróglia do perfil M1 para M2 (LI, Y. et al.,

2017; ZHANG, Y. et al., 2017). Porém, o efeito da VEs-CMsMO na neuropatia diabética sensorial ainda não tinha sido investigado. Neste contexto, levando em consideração os dados aqui apresentados, podemos considerar que as CMsMO liberam moléculas bioativas em seu secretoma, as quais podem ser a principal fonte dos efeitos aqui observados.

8 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que um único transplante de CMsMO, infusão de MC-CMsMO ou VEs-CMsMO foram capazes de melhorar de forma progressiva e duradoura as alterações da sensibilidade da neuropatia diabética. Tomado em conjunto, estes dados indicam que, além das ações benéficas das CMsMO no sistema nervoso periférico, a sua ação parácrina no bloqueio da cascata neuroinflamatória espinal é um possível mecanismo pelo qual as células-tronco mesenquimais contribuem para a redução dos sinais da neuropatia diabética sensorial. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para melhor caracterizar as moléculas presentes no secretoma, responsáveis por atuar diretamente na resolução da neuroinflamação.

9 REFERÊNCIAS

- ABBOTT, Caroline A et al. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the UK. *Diabetes Care*, v. 34, n. 10, p. 2220-2224, 2011.
- ABMAN, Steven H; MATTHAY, Michael A. Mesenchymal stem cells for the prevention of bronchopulmonary dysplasia: delivering the secretome: American Thoracic Society 2009.
- AFANASYEV, Boris V; ELSTNER, Elena E; ZANDER, Axel R. AJ Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cell Ther Transplant*, v. 1, n. 3, p. 35-38, 2009.
- AHMED, Nermeen El-Moataz Bellah et al.. Therapeutic potential of dental pulp stem cell secretome for Alzheimer's disease treatment: an in vitro study. *Stem Cells International*, v. 2016, 2016.
- AL-RUBEAN, Khalid 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, n. 2, p. e88956, 2014.
- ANGULSKI, Addeli BB et al. The Protein content of extracellular vesicles derived from expanded human umbilical cord blood-derived CD133+ and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells partially explains why both sources are advantageous for regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 13, n. 2, p. 244-257, 2017.
- ARAGNO, Manuela et al. Up-regulation of advanced glycated products receptors in the brain of diabetic rats is prevented by antioxidant treatment. *Endocrinology*, v. 146, n. 12, p. 5561-5567, 2005.
- ATLAS, IDF Diabetes. International Diabetes Federation. Brussels, 2019.
- AZCOITIA, Iñigo et al. Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats. *Neurobiology of Aging*, v. 24, n. 6, p. 853-860, 2003.
- BAGLIO, S. R. et al. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther*, v. 6, p. 127, 2015.
- BARRIÈRE, David André et al. Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 424, 2018.
- BASTYR, Edward J et al. Development and validity testing of the neuropathy total symptom score-6: questionnaire for the study of sensory symptoms of diabetic peripheral neuropathy. *Clinical Therapeutics*, v. 27, n. 8, p. 1278-1294, 2005.
- BEER, Lucian et al. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science. *Annals of translational medicine*. v. 5, n. 7, 2017.

BERTI-MATTERA, Liliana N et al. Sulfasalazine blocks the development of tactile allodynia in diabetic rats. *Diabetes*. v. 57, n. 10, p. 2801-2808, 2008.

BHATTACHARJEE, N. et al. Protocatechuic Acid, a Phenolic from *Sansevieria roxburghiana* Leaves, Suppresses Diabetic Cardiomyopathy via Stimulating Glucose Metabolism, Ameliorating Oxidative Stress, and Inhibiting Inflammation . *Frontiers in Pharmacology*, 2017.

BIAN, Suyan et al. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *Journal of molecular medicine*. v. 92, n. 4, p. 387-397, 2014.

BÖRGER, Verena et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. *International journal of molecular sciences*. v. 18, n. 7, p. 1450, 2017.

BORGES, Fernanda T; CONVENTO, Marcia Bastos; SCHOR, Nestor. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell: what next? *Stem cells and cloning: advances and applications*. v. 11, p. 77, 2018.

BOULTON, Andrew JM et al. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes care*. v. 27, n. 6, p. 1458-1486, 2004.

BOULTON, Andrew JM et al. Diabetic neuropathies a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*. v. 28, n. 4, p. 956-962, 2005.

BRIANA, Despina D.; MALAMITSI-PUCHNER, Ariadne. Galectin-3: An Early Marker of Gestational Diabetes, Subclinical Atherosclerosis, and Tumor Progression. *Angiology*. p. 0003319719831870, 2019.

BRIL, V. et al. Evidence-based guideline: Treatment of painful diabetic neuropathy: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology*. v. 76, n. 20, p. 1758-1765, 2011.

BRIL, Vera et al. Ranirestat for the management of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetes Care*. v. 32, n. 7, p. 1256-1260, 2009.

BRINI, A. T. et al. Therapeutic effect of human adipose-derived stem cells and their secretome in experimental diabetic pain. *Sci Rep*. v. 7, n. 1, p. 9904, 2017.

BROCK, C et al. Associations between sensorimotor, autonomic and central neuropathies in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolism*. v. 5, 2014.

BROWNLEE, Michael. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*. v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

BRUNO, Stefania; DEREGIBUS, Maria Chiara; CAMUSSI, Giovanni. The secretome of mesenchymal stromal cells: role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunology letters*. v. 168, n. 2, p. 154-158, 2015.

BURDON, Tom J et al. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. *Bone marrow research*. v. 2011, 2010.

- BUSE, Maria G. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* v. 290, n. 1, p. E1-E8, 2006. DOI:10.1152/ajpendo.00329.2005.
- CAIAFA, Jackson Silveira et al. Atenção integral ao portador de pé diabético. *Jornal Vascular Brasileiro.* v. 10, p. 1-32, 2011.
- CALLAGHAN, Brian C; FELDMAN, Eva L. Painful diabetic neuropathy: many similarly effective therapies with widely dissimilar costs. *Annals of internal medicine.* v. 161, n. 9, p. 674-675, 2014.
- CALLAGHAN, Brian C. et al. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet. Neurology.* v. 11, n. 6, p. 521-534, 2012.
- CANDRILLI, Sean D et al. Prevalence and the associated burden of illness of symptoms of diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes and its Complications.* v. 21, n. 5, p. 306-314, 2007.
- CAO, D. et al., Mesenchymal stem cells inhibited the inflammation and oxidative stress in LPS-activated microglial cells through AMPK pathway. *J Neural Transm.* 126: 1589, 2019.
- CASTILLO-MELENDZ, Margie et al. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Frontiers in neuroscience.* v. 7, p. 194-194, 2013.
- CHAO, Yin Xia; HE, Bei Ping; TAY, Samuel Sam Wah. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmunology.* v. 216, n. 1, p. 39-50, 2009.
- CHAPLAN, Sandra R et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods.* v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.
- CHEN, Chunxiu et al. Intrathecal Injection of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Neuropathic Pain in Rats. *Neurochemical research.* v. 41, n. 12, p. 3250-3260, 2016.
- CHEN, Lu et al. Exosomes derived from human menstrual blood-derived stem cells alleviate fulminant hepatic failure. *Stem cell research & therapy.* v. 8, n. 1, p. 9, 2017.
- CHEN, Po-Wei et al. Elevated Platelet Galectin-3 and Rho-Associated Protein Kinase Activity Are Associated with Hemodialysis Arteriovenous Shunt Dysfunction among Subjects with Diabetes Mellitus. *BioMed research international.* v. 2019, p. 8952414-8952414, 2019.
- CHEN, X. G. et al. Calcium promotes secretion of growth factors from human bone marrow stromal cells (hMSCs) and tube formation of human brain microvessel endothelial cells. 2002. 401-401.
- CHEN, Xin et al. Small nerve fiber quantification in the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy: comparing corneal confocal microscopy with intraepidermal nerve fiber density. *Diabetes care.* v. 38, n. 6, p. 1138-1144, 2015.

- CHOPP, Michael; LI, Yi. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *The Lancet Neurology*. v. 1, n. 2, p. 92-100, 2002.
- CREAGER, MA et al. Advanced glycation end products-Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. v. 114, p. 597-605, 2006.
- CUNNINGHAM, Catriona J; REDONDO-CASTRO, Elena; ALLAN, Stuart M. The therapeutic potential of the mesenchymal stem cell secretome in ischaemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. v. 38, n. 8, p. 1276-1292, 2018.
- DA SILVA MEIRELLES, Lindolfo; CHAGASTELLES, Pedro Cesar; NARDI, Nance Beyer. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.
- DE MACEDO BRAGA, Luisa Maria Gomes et al. In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction. *Journal of biomedical science*. v. 15, n. 3, p. 365-374, 2008.
- DE OLIVEIRA, José Egidio Paulo; VENCIO, Sérgio; DIABETES, Sociedade Brasileira de. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014*. ed.: Grupo Gen-AC Farmacêutica, 2000.
- DELI, Gabriella et al. Diabetic neuropathies: diagnosis and management. *Neuroendocrinology*. v. 98, n. 4, p. 267-280, 2014.
- DENG, Kangli et al. Mesenchymal stem cells and their secretome partially restore nerve and urethral function in a dual muscle and nerve injury stress urinary incontinence model. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. v. 308, n. 2, p. F92-F100, 2014.
- DEVITT, Michael. AAN, AANEM, and AAPMR Publish Guideline for Treatment of Painful Diabetic Neuropathy. *American family physician*. v. 86, n. 5, p. 469, 2012.
- DEWANJEE, S. et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. *European Journal of Pharmacology*, v. 833, p. 472–523, 2018.
- DOBRETSOV, Maxim; ROMANOVSKY, Dmitry; STIMERS, Joseph R. Early diabetic neuropathy: triggers and mechanisms. *World journal of gastroenterology: WJG*. v. 13, n. 2, p. 175, 2007.
- DOMINICI, MLBK et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*. v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.
- DOVERHAG, Christina et al. Galectin-3 contributes to neonatal hypoxic–ischemic brain injury. *Neurobiology of disease*. v. 38, n. 1, p. 36-46, 2010.
- DROMMELSCHMIDT, Karla et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate inflammation-induced preterm brain injury. *Brain, behavior, and immunity*. v. 60, p. 220-232, 2017.

DUSCHER, Dominik et al. Stem cells in wound healing: the future of regenerative medicine? A mini-review. *Gerontology*. v. 62, n. 2, p. 216-225, 2016.

DWORKIN, Robert H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *Pain*. v. 132, n. 3, p. 237-251, 2007.

EDWARDS, James L et al. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & therapeutics*. v. 120, n. 1, p. 1-34, 2008.

EGLITIS, Martin A; MEZEY, Éva. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 94, n. 8, p. 4080-4085, 1997.

ELLIS, A; BENNETT, DLH. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British journal of anaesthesia*. v. 111, n. 1, p. 26-37, 2013.

ESTRADA, Rosendo et al. Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *Journal of cellular physiology*. v. 219, n. 3, p. 563-571, 2009.

EVANGELISTA, Afrânio Ferreira. Avaliação do efeito do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea em modelo murino de neuropatia periférica diabética. 2014. p. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

FATEHI, Farzad et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with diabetes mellitus. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. v. 18, n. 5, p. 438, 2013.

FELDMAN, Eva L. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *Journal of Clinical Investigation*. v. 111, n. 4, p. 431, 2003.

FELDMAN, Eva L et al. New horizons in diabetic neuropathy: Mechanisms, bioenergetics, and pain. *Neuron*. v. 93, n. 6, p. 1296-1313, 2017.

FELDMAN, Eva L. et al. Diabetic neuropathy. *Nature Reviews Disease Primers*. v. 5, n. 1, p. 41, 2019.

FINNERUP, Nanna B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Neurology*. v. 14, n. 2, p. 162-173, 2015.

FLATTERS, Sarah J. L.; BENNETT, Gary J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain*. v. 122, n. 3, p. 245-257, 2006.

FLATTERS, Sarah JL; BENNETT, Gary J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain*. v. 122, n. 3, p. 245-257, 2006.

FORTINO, Veronica R; PELAEZ, Daniel; CHEUNG, Herman S. Concise review: stem cell therapies for neuropathic pain. *Stem cells translational medicine*. v. 2, n. 5, p. 394-399, 2013.

FURMAN, Brian L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology*. v. 70, n. 1, p. 5.47. 1-5.47. 20, 2015.

GAMA, K. B. et al. Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation. *Stem Cells Int*. v. 2018, p. 8179013, 2018.

GERDONI, Ezio et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of neurology*. v. 61, n. 3, p. 219-227, 2007.

GNECCHI, Massimiliano et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature medicine*. v. 11, n. 4, p. 367, 2005.

GNECCHI, Massimiliano et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research*. v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 2008.

GONÇALVES, N. P. et al. Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy. *Nature Reviews Neurology*. v. 13, n. 3, p. 135, 2017.

GONÇALVES, N. P.; VÆGTER, C. B.; PALLESEN, L. T. Peripheral Glial Cells in the Development of Diabetic Neuropathy. *Frontiers in Neurology* , 2018.

GREEN, Laura C et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*. v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUAN, Li- Xue et al. Therapeutic efficacy of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in patients with type 2 diabetes. *Experimental and therapeutic medicine*. v. 9, n. 5, p. 1623-1630, 2015.

GUIMARÃES, Elisalva Teixeira et al. 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, n. 12, p. 2345-2354, 2013a.

GUIMARÃES, Elisalva Teixeira et al. 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, n. 12, p. 2345-2354, 2013b.

GUO, Wei et al. Bone marrow stromal cells produce long-term pain relief in rat models of persistent pain. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. v. 29, n. 8, p. 1294-1303, 2011.

HAMADA, Mariko et al. Xenogeneic transplantation of human adipose-derived stem cell sheets accelerate angiogenesis and the healing of skin wounds in a Zucker Diabetic Fatty rat model of obese diabetes. *Regenerative therapy*. v. 6, p. 65-73, 2017.

HAN, Ji Woong et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetic neuropathy by direct modulation of both angiogenesis and myelination in peripheral nerves. *Cell transplantation*. v. 25, n. 2, p. 313-326, 2016.

- HARGREAVES, K et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. v. 32, n. 1, p. 77-88, 1988.
- HAUPT, E; LEDERMANN, H; KÖPCKE, W. Benfotiamine in the treatment of diabetic. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. v. 43, n. 2, p. 71-77, 2005.
- HAYASHI, Takuya et al. Autologous mesenchymal stem cell–derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. *The Journal of clinical investigation*. v. 123, n. 1, p. 272, 2013.
- HE, Juan et al. Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model. *Nephrology*. v. 17, n. 5, p. 493-500, 2012.
- HENNEMANN-KRAUSE, Lilian; SREDNI, Sidney. Systemic drug therapy for neuropathic pain. *Revista Dor*. v. 17, p. 91-94, 2016.
- HODEIB, Hossam et al. Galectin-3 as a prognostic biomarker for diabetic nephropathy. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. v. 12, p. 325-331, 2019. DOI:10.2147/DMSO.S194410.
- HOSSEINI, Asieh; ABDOLLAHI, Mohammad. Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. *Oxidative medicine and cellular longevity*. v. 2013, p. 168039-168039, 2013a. DOI:10.1155/2013/168039.
- HOSSEINI, Asieh; ABDOLLAHI, Mohammad. Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. *Oxidative medicine and cellular longevity*. v. 2013, 2013b.
- HOSSEINI, Mostafa et al. The effect of bone marrow–derived mesenchymal stem cell transplantation on allodynia and hyperalgesia in neuropathic animals: a systematic review with meta-analysis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. v. 21, n. 9, p. 1537-1544, 2015.
- IACOBINI, Carla et al. Role of galectin-3 in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. v. 14, n. suppl 3, p. S264-S270, 2003.
- IRAJ, Bijan et al. Prevention of diabetic foot ulcer. *International journal of preventive medicine*. v. 4, n. 3, p. 373-376, 2013.
- JAIN, Ruchi A; DALVI, Naina; KARNIK, Hemangi. Neurodegeneration with brain iron accumulation for stem-cell therapy: Anesthetic management. *Medical Journal of Dr. DY Patil Vidyapeeth*. v. 11, n. 3, p. 267, 2018.
- JEONG, Jin-Ok et al. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow–derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation*. v. 119, n. 5, p. 699-708, 2009.
- JESUS, Alan Araujo de et al. Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico. *Dental Press Journal of Orthodontics*. v. 16, n. 6, p. 111-118, 2011.

JIANG, Pu-Cha et al. A clinical trial report of autologous bone marrow - derived mesenchymal stem cell transplantation in patients with spinal cord injury. *Experimental and therapeutic medicine*. v. 6, n. 1, p. 140-146, 2013.

JOLIVALT, Corinne G et al. Peripheral neuropathy in mouse models of diabetes. *Current protocols in mouse biology*. p. 223-255, 2016.

JUSTEWICZ, Dominic M et al. Characterization of the human smooth muscle cell secretome for regenerative medicine. *Tissue Engineering Part C: Methods*. v. 18, n. 10, p. 797-816, 2012.

KAZUKI, Y. et al., Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Amyloid- β Pathology by Modifying Microglial Function and Suppressing Oxidative Stress. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 72, no. 3, pp. 867-884, 2019.

KAMENOV, Zdravko A; TRAYKOV, Latchezar D. Diabetic somatic neuropathy. In: *Diabetes*: ed.: Springer, v. p.155-175, 2013.

KAMIYA, Hideki et al. Unmyelinated fiber sensory neuropathy differs in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. v. 21, n. 5, p. 448-458, 2005.

KARLSSON, Anna et al. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood*. v. 91, n. 9, p. 3430-3438, 1998.

KARUSSIS, Dimitrios et al. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases. *Journal of the neurological sciences*. v. 265, n. 1-2, p. 131-135, 2008.

KATAGIRI, Wataru et al. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head & face medicine*. v. 12, n. 1, p. 5, 2016.

KIM, Kyoung Mi et al. RNA in extracellular vesicles. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*. v. 8, n. 4, p. 10.1002/wrna.1413, 2017a. DOI:10.1002/wrna.1413.

KIM, Kyoung Mi et al. RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2017b.

KRZEŃLAK, Anna; LIPIŃSKA, Anna. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett*. v. 9, n. 2, p. 305-28, 2004.

LÁZARO-IBÁÑEZ, Elisa et al. Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *The Prostate*. v. 74, n. 14, p. 1379-1390, 2014.

LEINNINGER, Gina M.; VINCENT, Andrea M.; FELDMAN, Eva L. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System*. v. 9, n. 1, p. 26-53, 2004. DOI:10.1111/j.1085-9489.2004.09105.x.

- LENNERTZ, Richard C et al. Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetic neuropathy. *Journal of neurophysiology*. v. 106, n. 2, p. 905-914, 2011.
- LI, Jianjun et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce systemic inflammation and attenuate LPS-induced acute lung injury in rats. *Journal of Inflammation*. v. 9, n. 1, p. 33, 2012.
- LI, Jiwei et al. Paracrine factors from mesenchymal stem cells: a proposed therapeutic tool for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *International wound journal*. v. 11, n. 2, p. 114-121, 2014.
- LI, Y. et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat. *Neurology*. v. 59, n. 4, p. 514, 2002.
- LI, Ye et al. Exosomes secreted by stem cells from human exfoliated deciduous teeth contribute to functional recovery after traumatic brain injury by shifting microglia M1/M2 polarization in rats. *Stem cell research & therapy*. v. 8, n. 1, p. 198, 2017.
DOI:10.1186/s13287-017-0648-5.
- LI, Ziyue et al. Schwann cells secrete extracellular vesicles to promote and maintain the proliferation and multipotency of hDPCs. *Cell Proliferation*. v. 50, n. 4, 2017.
- LIANG, Peng et al. Neural stem cell-conditioned medium protects neurons and promotes propriospinal neurons relay neural circuit reconnection after spinal cord injury. *Cell transplantation*. v. 23, n. 1, p. S45-S56, 2014.
- LIN, Wen-Ping et al. Effect of neuroglobin genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on spinal cord injury in rabbits. *PloS one*. v. 8, n. 5, p. e63444, 2013.
- LIU, Fu-Tong; PATTERSON, Ronald J; WANG, John L. Intracellular functions of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. v. 1572, n. 2, p. 263-273, 2002.
- LUCAS, Paul A et al. Effect of rat mesenchymal stem cells on development of abdominal adhesions after surgery. *Journal of Surgical Research*. v. 62, n. 2, p. 229-232, 1996.
- MA, Zhicong et al. Galectin-3 inhibition is associated with neuropathic pain attenuation after peripheral nerve injury. *PloS one*. v. 11, n. 2, p. e0148792, 2016.
- MADONNA, Rosalinda et al. Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: cell-based therapies for myocardial repair and regeneration in ischemic heart disease and heart failure. *European heart journal*. v. 37, n. 23, p. 1789-1798, 2016.
- MAGUIRE, Greg. Stem cell therapy without the cells. *Communicative & integrative biology*. v. 6, n. 6, p. e26631, 2013.
- MALTMAN, Daniel J.; HARDY, Steven A.; PRZYBORSKI, Stefan A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochemistry International*. v. 59, n. 3, p. 347-356, 2011.

MARTINS, Luís F et al. Mesenchymal stem cells secretome-induced axonal outgrowth is mediated by BDNF. *Scientific Reports*. v. 7, 2017.

MASTRI, Michalis; LIN, Huey; LEE, Techung. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. *World journal of stem cells*. v. 6, n. 2, p. 82, 2014.

MCKAY, Ronald. Stem cells in the central nervous system. *Science*. v. 276, n. 5309, p. 66-71, 1997.

MCKNIGHT, RC; HUNTER, FE. Effects of inorganic iron on the thiobarbituric acid method for determination of lipid peroxides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. v. 98, n. 3, p. 643-646, 1965.

MCMAHON, Stephen B; MALCANGIO, Marzia. Current challenges in glia-pain biology. *Neuron*. v. 64, n. 1, p. 46-54, 2009.

MELIN, Eva O. et al. Soluble CD163 was linked to galectin-3, diabetic retinopathy and antidepressants in type 1 diabetes. *Endocrine connections*. v. 7, n. 12, p. 1343-1353, 2018.

MENDONÇA, Henrique Rocha et al. Lack of Galectin-3 attenuates neuroinflammation and protects the retina and optic nerve of diabetic mice. *Brain Research*. v. 1700, p. 126-137, 2018.

MEZEY, Éva et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. v. 290, n. 5497, p. 1779-1782, 2000.

MIKA, Joanna et al. Importance of glial activation in neuropathic pain. *European journal of pharmacology*. v. 716, n. 1, p. 106-119, 2013.

MONDAL, Abir et al. extracellular vesicles As Modulators of Tumor Microenvironment and Disease Progression in Glioma. *Frontiers in oncology*. v. 7, 2017.

MOORE, Andrew; DERRY, Sheena; WIFFEN, Philip. Gabapentin for Chronic Neuropathic Pain. *JAMA*. v. 319, n. 8, p. 818-819, 2018.

MOORE, R Andrew et al. Pregabalin for acute and chronic pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. n. 3, 2009.

MORSHEAD, Cindi M et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*. v. 13, n. 5, p. 1071-1082, 1994.

MUREA, Mariana; MA, Lijun; FREEDMAN, Barry I. Genetic and environmental factors associated with type 2 diabetes and diabetic vascular complications. *The review of diabetic studies: RDS*. v. 9, n. 1, p. 6, 2012.

MURINSON, Beth Brianna; GRIFFIN, John Wesley. C-fiber structure varies with location in peripheral nerve. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. v. 63, n. 3, p. 246-254, 2004.

MURPHY, Matthew B; MONCIVAIS, Kathryn; CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine*. v. 45, n. 11, p. e54, 2013.

MUSOLINO, Patricia Leonor et al. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. *Neuroscience letters*. v. 418, n. 1, p. 97-101, 2007.

NAKANO, Masako et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetes-induced cognitive impairment by exosome transfer into damaged neurons and astrocytes. *Scientific Reports*. v. 6, 2016.

NEWTON, William et al. Stem cell derived exosomes: a novel vector for tissue repair and diabetic therapy. *Journal of Molecular Endocrinology*. p. JME-17-0080, 2017.

O'BRIEN, Phillippe D; SAKOWSKI, Stacey A; FELDMAN, Eva L. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR journal*. v. 54, n. 3, p. 259-272, 2014.

OBROSOVA, Irina G. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. *Neurotherapeutics*. v. 6, n. 4, p. 638-647, 2009.

OGATA, Kenichi; KATAGIRI, Wataru; HIBI, Hideharu. Secretomes from mesenchymal stem cells participate in the regulation of osteoclastogenesis in vitro. *Clinical oral investigations*. v. 21, n. 6, p. 1979-1988, 2017.

OYENIHI, Ayodeji Babatunde et al. Antioxidant strategies in the management of diabetic neuropathy. *BioMed research international*. v. 2015, p. 515042-515042, 2015.

PABREJA, Kavita et al. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *European journal of pharmacology*. v. 661, n. 1, p. 15-21, 2011.

PAJOOHESH-GANJI, Ahdeah et al. Characterization of inflammatory gene expression and galectin-3 function after spinal cord injury in mice. *Brain research*. v. 1475, p. 96-105, 2012.

PAN, Mengjie et al. Tissue engineering with peripheral blood-derived mesenchymal stem cells promotes the regeneration of injured peripheral nerves. *Experimental neurology*. v. 292, p. 92-101, 2017.

PASNOOR, Mamatha et al. Diabetic neuropathy part 1: overview and symmetric phenotypes. *Neurologic clinics*. v. 31, n. 2, p. 425-445, 2013.

PELTIER, Amanda; GOUTMAN, Stephen A; CALLAGHAN, Brian C. Painful diabetic neuropathy. *Bmj*. v. 348, p. g1799, 2014.

PHINNEY, Donald G; PITTENGER, Mark F. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. v. 35, n. 4, p. 851-858, 2017.

POLYDEFKIS, Michael et al. The time course of epidermal nerve fibre regeneration: studies in normal controls and in people with diabetes, with and without neuropathy. *Brain*. v. 127, n. 7, p. 1606-1615, 2004.

POP-BUSUI, Rodica et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. v. 40, n. 1, p. 136-154, 2017.

PRINS, Caio Andrade; ALMEIDA, Fernanda Martins; MARTINEZ, Ana Maria Blanco. Absence of galectin-3 attenuates neuroinflammation improving functional recovery after spinal cord injury. *Neural regeneration research*. v. 11, n. 1, p. 92, 2016.

PROCKOP, Darwin J; OLSON, Scott D. Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood*. v. 109, n. 8, p. 3147-3151, 2007.

QUAN, Yi; DU, Jianhai; WANG, Xian. High glucose stimulates GRO secretion from rat microglia via ROS, PKC, and NF- κ B pathways. *Journal of neuroscience research*. v. 85, n. 14, p. 3150-3159, 2007.

RAHMAN, MD. H. JHA, M. K. e SUK, K. Evolving Insights into the Pathophysiology of Diabetic Neuropathy: Implications of Malfunctioning Glia and Discovery of Novel Therapeutic Targets. *Current Pharmaceutical Design*, 22: 738, 2016.

RANGANATH, Sudhir H et al. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell stem cell*. v. 10, n. 3, p. 244-258, 2012.

REDDY, Rachamalla Ranganath et al. STEM CELL THERAPY FOR CANCER. 2016.

ROMÁN-PINTOS, Luis Miguel et al. Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *Journal of diabetes research*. v. 2016, p. 3425617-3425617, 2016.

SACERDOTE, Paola et al. Cytokine modulation is necessary for efficacious treatment of experimental neuropathic pain. *Journal of neuroimmune pharmacology*. v. 8, n. 1, p. 202-211, 2013.

SANCHEZ, Maria Beatriz Herrera et al. Extracellular vesicles from human liver stem cells restore argininosuccinate synthase deficiency. *Stem cell research & therapy*. v. 8, n. 1, p. 176, 2017.

SARKO, Diana K; MCKINNEY, Cindy E. Exosomes: Origins and therapeutic potential for neurodegenerative disease. *Frontiers in Neuroscience*. v. 11, 2017.

SCARPELLO, John H. B.; HOWLETT, Harry C. S. Metformin therapy and clinical uses. *Diabetes and Vascular Disease Research*. v. 5, n. 3, p. 157-167, 2008.

SCHÄFER, Sabrina et al. Influence of intrathecal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on spinal inflammation and pain hypersensitivity in a rat model of peripheral nerve injury. *Journal of neuroinflammation*. v. 11, n. 1, p. 157, 2014.

SEO, Jung Hwa; CHO, Sung-Rae. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials. *Yonsei medical journal*. v. 53, n. 6, p. 1059-1067, 2012. DOI:10.3349/ymj.2012.53.6.1059.

SEO, Jung Hwa et al. Early Immunomodulation by Intravenously Transplanted Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Recovery in Spinal Cord Injured Rats. *Cell medicine*. v. 2, n. 2, p. 55-67, 2011. DOI:10.3727/215517911X582788.

SEVIVAS, Nuno et al. Mesenchymal stem cell secretome: A potential tool for the prevention of muscle degenerative changes associated with chronic rotator cuff tears. *The American journal of sports medicine*. v. 45, n. 1, p. 179-188, 2017.

SHAKHER, Jayadave; STEVENS, Martin J. Update on the management of diabetic polyneuropathies. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. v. 4, p. 289, 2011.

SHAKHER, Jayadave; STEVENS, Martin J. Update on the management of diabetic polyneuropathies. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. v. 4, p. 289-305, 2011.

SHIBATA, Taiga et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes*. v. 57, n. 11, p. 3099-3107, 2008.

SHIN, Ji Cheol et al. Clinical Trial of Human Fetal Brain-Derived Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation in Patients with Traumatic Cervical Spinal Cord Injury. *Neural plasticity*. v. 2015, p. 630932-630932, 2015.

SIMA, Anders AF; ZHANG, Weixian. Mechanisms of diabetic neuropathy: axon dysfunction. In: *Handbook of clinical neurology*: ed.: Elsevier, v. 126. p.429-442, 2014.

SINCLAIR, Alan J; MORLEY, John E; VELLAS, Bruno. *Pathy's principles and practice of geriatric medicine*. ed.: John Wiley & Sons, 2012.

SINISCALCO, Dario 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, 2011.

SOUZA, Cristiano Freitas de et al. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*. 2010.

STEMBERGER, Sylvia et al. Mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: immunomodulation and neuroprotection. *PloS one*. v. 6, n. 5, p. e19808, 2011.

STEVENS, Martin J et al. Effects of DL-alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. v. 49, n. 6, p. 1006-1015, 2000.

STOCK, Peggy et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury. *International journal of molecular sciences*. v. 15, n. 4, p. 7004-7028, 2014.

STONE, Laura L; GRANDE, Andy; LOW, Walter C. Neural repair and neuroprotection with stem cells in ischemic stroke. *Brain sciences*. v. 3, n. 2, p. 599-614, 2013.

SUGIMOTO, Kazuhiro; YASUJIMA, Minoru; YAGIHASHI, Soroku. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Current pharmaceutical design*. v. 14, n. 10, p. 953-961, 2008.

SUN, Yi et al. Intrathecal administration of human bone marrow mesenchymal stem cells genetically modified with human proenkephalin gene decrease nociceptive pain in neuropathic rats. *Molecular pain*. v. 13, p. 1744806917701445, 2017.

SYKOVÁ, Eva et al. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels—two strategies for spinal cord injury repair. *Cellular and molecular neurobiology*. v. 26, n. 7-8, p. 1111-1127, 2006.

TAKAHASHI, Kazutoshi; YAMANAKA, Shinya. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TAKASAKI, Ichiro et al. Contribution of spinal galectin-3 to acute herpetic allodynia in mice. *Pain*. v. 153, n. 3, p. 585-592, 2012.

TEIXEIRA, Fábio G et al. Impact of the secretome of human mesenchymal stem cells on brain structure and animal behavior in a rat model of Parkinson's disease. *Stem cells translational medicine*. v. 6, n. 2, p. 634-646, 2017.

TESFAYE, Solomon. Clinical features of diabetic polyneuropathy. In: *Diabetic Neuropathy*: ed.: Springer, v. p.243-257, 2007a.

TESFAYE, Solomon. Clinical features of diabetic polyneuropathy. *Diabetic Neuropathy*. p. 243-257, 2007b.

TESFAYE, Solomon et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes care*. v. 33, n. 10, p. 2285-2293, 2010.

TIMMERS, Leo et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem cell research*. v. 1, n. 2, p. 129-137, 2008.

TÖGEL, Florian et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. v. 289, n. 1, p. F31-F42, 2005.

TRACHOOTHAM, Dunyaporn et al. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & redox signaling*. v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

UCCELLI, Antonio et al. Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Molecular Medicine*. v. 18, n. 1, p. 794, 2012.

UCCELLI, Antonio et al. Stem cells in inflammatory demyelinating disorders: a dual role for immunosuppression and neuroprotection. *Expert opinion on biological therapy*. v. 6, n. 1, p. 17-22, 2006.

VAQUERO, Jesús et al. Repeated subarachnoid administrations of autologous mesenchymal stromal cells supported in autologous plasma improve quality of life in patients suffering incomplete spinal cord injury. *Cytotherapy*. v. 19, n. 3, p. 349-359, 2017.

VEIGA, Sergio et al. Neuroactive steroids prevent peripheral myelin alterations induced by diabetes. *Neuroscience letters*. v. 402, n. 1-2, p. 150-153, 2006.

VICKERS, E Russell et al. A preliminary report on stem cell therapy for neuropathic pain in humans. *Journal of pain research*. v. 7, p. 255, 2014.

VINIK, Aaron I et al. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the protein kinase C α -inhibitor ruboxistaurin mesylate during a 1-year, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Clinical therapeutics*. v. 27, n. 8, p. 1164-1180, 2005.

VINIK, Aaron I et al. Diabetic neuropathy in older adults. *Clinics in geriatric medicine*. v. 24, n. 3, p. 407-435, 2008.

VINIOL, Annika et al. Prescribing practice of pregabalin/gabapentin in pain therapy: an evaluation of German claim data. *BMJ open*. v. 9, n. 3, p. e021535-e021535, 2019.

VIZOSO, Francisco J et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International journal of molecular sciences*. v. 18, n. 9, p. 1852, 2017.

VOLMER-THOLE, Maren; LOBMANN, Ralf. Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome. *International journal of molecular sciences*. v. 17, n. 6, p. 917, 2016.

VOLPE, C. M. O. et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death & Disease*, v. 9, n. 2, p. 119, 2018.

WAGERS, Amy J; WEISSMAN, Irving L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WANG, Dongmei; COUTURE, Réjean; HONG, Yanguo. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain. *European journal of pharmacology*. v. 728, p. 59-66, 2014.

WANG, Xin et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. v. 422, n. 6934, p. 897, 2003.

WATERMAN, Ruth S; HENKLE, Sarah L; BETANCOURT, Aline M. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PloS one*. v. 7, n. 9, p. e45590, 2012.

WEIGERT, Johanna et al. Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 95, n. 3, p. 1404-1411, 2010.

WEN, Yeong-Ray et al. Microglia: a promising target for treating neuropathic and postoperative pain, and morphine tolerance. *Journal of the Formosan Medical Association*. v. 110, n. 8, p. 487-494, 2011.

WHONE, Alan L et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor. *Brain research*. v. 1431, p. 86-96, 2012.

WITWER, Kenneth W et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of extracellular vesicles*. v. 2, n. 1, p. 20360, 2013.

WU, Ping et al. Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat. *Nature neuroscience*. v. 5, n. 12, p. 1271, 2002.

XIAO, J. et al., Mesenchymal Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells as Therapies for Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 9283-9302, 2015.

XU, Rong et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *The Journal of clinical investigation*. v. 126, n. 4, p. 1152-1162, 2016.

YAGIHASHI, Soroku; MIZUKAMI, Hiroki; SUGIMOTO, Kazuhiro. Mechanism of diabetic neuropathy: where are we now and where to go? *Journal of Diabetes Investigation*. v. 2, n. 1, p. 18-32, 2011.

YALVAÇ, Mehmet Emir et al. Characterization of the secretome of human tooth germ stem cells (hTGSCs) reveals neuro-protection by fine-tuning micro-environment. *Brain, behavior, and immunity*. v. 32, p. 122-130, 2013.

YANG, Ri-Yao; RABINOVICH, Gabriel A; LIU, Fu-Tong. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert reviews in molecular medicine*. v. 10, 2008.

YILMAZ, H et al. Increased levels of galectin-3 were associated with prediabetes and diabetes: new risk factor? *Journal of endocrinological investigation*. v. 38, n. 5, p. 527-533, 2015.

YIN, Xinghua et al. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *Journal of Neuroscience*. v. 18, n. 6, p. 1953-1962, 1998.

YOUSEFIFARD, Mahmoud et al. Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model. *Stem cell research & therapy*. v. 7, n. 1, p. 36, 2016.

ZHANG, Xin et al. Mesenchymal stem cells may ameliorate nephrotic syndrome post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation-Case Report. *Frontiers in Immunology*. v. 8, n. 962, p. 1, 2017.

ZHANG, Yan Ping et al. Prophylactic and antinociceptive effects of coenzyme Q10 on diabetic neuropathic pain in a mouse model of type 1 diabetes. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. v. 118, n. 4, p. 945-954, 2013.

ZHANG, Yanlu et al. Systemic administration of cell-free exosomes generated by human bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured under 2D and 3D conditions improves functional recovery in rats after traumatic brain injury. *Neurochemistry International*. v. 111, p. 69-81, 2017.

ZHENG, Mei-Ge et al. TrkA regulates the regenerative capacity of bone marrow stromal stem cells in nerve grafts. *Neural Regeneration Research*. v. 14, n. 10, p. 1765-1771, 2019.

ZIEGLER, Dan. Painful Diabetic Neuropathy Advantage of novel drugs over old drugs? *Diabetes care*. v. 32, n. suppl 2, p. S414-S419, 2009.

APÊNDICE: Produções científicas durante o período do Doutorado**Artigo original publicado 1:**

Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades

Perspectiva publicada:

Cell-free therapy: a neuroregenerative approach to sensory neuropathy?

Artigo original publicado 2:

Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation

Artigo original publicado 3:

IGF-1 overexpression improves mesenchymal stem cell survival and promotes neurological recovery after spinal cord injury

Artigo original publicado 4:

Antihypertensive potential of linalool and linalool complexed with β -cyclodextrin: Effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity

Artigo original publicado 5:

The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by in silico, in vitro and in vivo approaches

RESEARCH

Open Access



Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades

Afrânio Ferreira Evangelista¹, Marcos André Vannier-Santos², Gessica Sabrina de Assis Silva³, Daniela Nascimento Silva⁴, Paulo José Lima Juiz⁵, Carolina Kymie Vasques Nonaka⁴, Ricardo Ribeiro dos Santos⁴, Milena Botelho Pereira Soares^{1,4} and Cristiane Flora Villarreal^{1,3*}

Abstract

Background: Diabetic neuropathy (DN) is a frequent and debilitating manifestation of diabetes mellitus, to which there are no effective therapeutic approaches. Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) have a great potential for the treatment of this syndrome, possibly through regenerative actions on peripheral nerves. Here, we evaluated the therapeutic effects of MSC on spinal neuroinflammation, as well as on ultrastructural aspects of the peripheral nerve in DN-associated sensorial dysfunction.

Methods: C57Bl/6 mice were treated with bone marrow-derived MSC (1×10^6), conditioned medium from MSC cultures (CM-MSC) or vehicle by endovenous route following the onset of streptozotocin (STZ)-induced diabetes. Paw mechanical and thermal nociceptive thresholds were evaluated by using von Frey filaments and Hargreaves test, respectively. Morphological and morphometric analysis of the sciatic nerve was performed by light microscopy and transmission electron microscopy. Mediators and markers of neuroinflammation in the spinal cord were measured by radioimmunoassay, real-time PCR, and immunofluorescence analyses.

Results: Diabetic mice presented behavioral signs of sensory neuropathy, mechanical allodynia, and heat hypoalgesia, which were completely reversed by a single administration of MSC or CM-MSC. The ultrastructural analysis of the sciatic nerve showed that diabetic mice exhibited morphological and morphometric alterations, considered hallmarks of DN, such as degenerative changes in axons and myelin sheath, and reduced area and density of unmyelinated fibers. In MSC-treated mice, these structural alterations were markedly less commonly observed and/or less pronounced. Moreover, MSC transplantation inhibited multiple parameters of spinal neuroinflammation found in diabetic mice, causing the reduction of activated astrocytes and microglia, oxidative stress signals, galectin-3, IL-1 β , and TNF- α production. Conversely, MSC increased the levels of anti-inflammatory cytokines, IL-10, and TGF- β .

Conclusions: The present study described the modulatory effects of MSC on spinal cord neuroinflammation in diabetic mice, suggesting new mechanisms by which MSC can improve DN.

Keywords: Stem cells, Sensory neuropathy, Diabetes, Spinal cord, Neuroinflammation, Galectin-3

* Correspondence: cfv@ufba.br

¹Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ, Salvador, BA CEP 40296-710, Brazil

³Pharmacy College, Federal University of Bahia, Salvador, BA CEP 40170-290, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Diabetes mellitus is a highly debilitating disease that affects humans, with an estimated global prevalence of 6% [1]. Among the several complications that contribute to the reduced life quality and life expectancy of diabetic patients, diabetic neuropathy (DN) is the most frequent and recognized nervous system pathology, affecting approximately 50% of patients with both type 1 and type 2 diabetes [2]. Axonal degeneration, demyelination, and disordered repair are observed in the nerves of patients with diabetes, affecting both myelinated and unmyelinated, as well as large and small fibers [3]. Clinical manifestations of DN include painful neuropathic symptoms, such as spontaneous pain, hyperalgesia and allodynia, and sensory loss, resulting in foot ulcerations and amputations [4].

Glycemic control can slow, but not completely prevent, the progression of DN [3], and thus, therapies aiming to relieve sensory symptoms are essential. Additionally, the available analgesic drugs appear to be relatively ineffective in controlling neuropathic pain associated with DN [5]. Currently, there are no drugs available that can restore nerve function, and the usual therapeutic strategies for diabetic neuropathic pain are limited to palliative analgesic effects [6].

Successful control of DN is linked to the establishment of new disease-modifying therapeutic approaches. In this context, cell-based therapies represent a promising alternative. Cellular therapies have shown favorable results and can be considered as a potential approach in treating neuropathic pain [7]. The cell transplantation strategy for neuropathic pain treatment is focused on cell-based analgesia and neuroprotective/regenerative potential. In this setting, stem cells can represent not only a treatment for pain but also a method aimed at repairing the damaged nervous system [8]. Recent studies have shown that transplantation of progenitor/stem cells, such as endothelial progenitor cells and mesenchymal stem/stromal cells (MSC), ameliorates diabetic neuropathy in experimental diabetes [9–14]. Shibata et al. reported that intramuscularly transplanted MSC improves sciatic nerve conduction velocity, sciatic nerve blood flow, as well as increases density of small vessels in the muscle of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats [9]. These authors suggested that the beneficial effects are mediated by paracrine actions of locally released angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. Due to the key role of ischemia and decreased nerve blood flow in the pathophysiology of diabetic neuropathy [15], the lack of angiogenic factors has been regarded as an important mechanism of DN [16]. Considering that MSC secrete neurotrophic and angiogenic factors [17, 18], these were the first candidates to explain the efficacy of cell therapy for DN, as suggested by a number of studies

[9–11, 13]. In addition, the contribution of immunosuppressive and anti-inflammatory effects of MSC on peripheral nerves in STZ-induced DN has also been proposed [12, 19].

Although there is strong evidence of the importance of peripheral nerve pathological processes in DN pathogenesis, there is now emerging evidence of the involvement of the central nervous system in diabetic neuropathy. Multiple biochemical and anatomical alterations in the central nervous systems have been associated with the development and maintenance of DN [20]. In contrast to traumatic neuropathy, during DN, the spinal sensory neurons are not principally driven by input from primary afferent neurons because sensory inputs to the spinal cord decrease rather than increase in diabetes [21, 22]. Hyperglycemia and the resulting oxidative stress affect the local microenvironment in the spinal cord, promoting activation of glial cells [22]. In turn, activated spinal glial cells induce a series of alterations, such as activation of intracellular signaling pathways and neuroinflammation, which directly influence the establishment of sensorial neuropathy [22–24]. Considering this scenario, the present study was designed to investigate the hypothesis that regulation of spinal neuromodulator pathways, underlying the maintenance of diabetic neuropathy, contributes to MSC-induced beneficial effects on sensorial dysfunction during DN. In addition, the effects of MSC on ultrastructural aspects of the peripheral nerve were also investigated.

Methods

Bone marrow-derived mesenchymal cell (MSC) culture and conditioned medium preparation

Mesenchymal stem cells were obtained from the bone marrow of femurs and tibiae of GFP (green fluorescent protein) transgenic C57Bl/6 mice. Bone marrow samples were diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA, USA), and the mononuclear cell fraction was obtained by Ficoll-Hypaque gradient (Sigma, St Louis, MO, USA), after centrifugation at 400×g for 30 min at 20 °C. The interface containing mononuclear cells was collected in individualized tubes and washed twice in incomplete DMEM. Mononuclear cells were resuspended in DMEM medium supplemented with 2 mM L glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 µg/mL gentamycin, and 10% fetal bovine serum (all reagents were acquired from Sigma) and cultured at the density of 10⁵ cells/cm² in polystyrene plates. Cell cultures were maintained at 37 °C with 5% CO₂. The cells were expanded during approximately five passages, and when 90% confluence was reached, the cells were detached using 0.25% trypsin (Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and expanded in new culture bottles (9 × 10³ cells/cm²). The identity of MSC

was confirmed on the basis of morphological criteria, plastic adherence, and specific surface antigen expression: CD90 (+), CD44 (+), Sca-1 (+), CD45(-), CD34 (-), and CD11b (-). Differentiation ability of MSC was also evaluated after induction using specific media, as previously described [25]. Oil Red, Alizarin Red, and Alcian Blue stainings (Sigma) were used to assess adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation, respectively.

Conditioned medium (CM) was obtained from MSC cultures (CM-MSC), as previously described [26]. MSC (7×10^6 , five passages) were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and transferred to a serum-free DMEM culture medium during 24 h. Then, CM was concentrated 15 times by centrifugation at 4000 g for 15 min at 13 °C, using ultrafiltration units (Amicon Ultra-PL 10, Millipore, Bedford, MA, USA). Filter units were used only one time to avoid membrane saturation. Concentrated CM-MSC were then sterilized on 0.22 μ m filters (Millipore) and stored at -80 °C until used. CM-MSC was divided into aliquots of 700 μ L before freezing to avoid repeated freeze/thaw cycles. The mean protein concentration of CM-MSC was of 1.5–1.8 mg/ml, and there was no difference between fresh and frozen CM-MSC. Serum-free DMEM, centrifuged and filtered, was used as control medium (vehicle group).

Animals

Experiments were performed on male C57Bl/6 mice (20–25 g) obtained from the Animal Facilities of Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ (Brazil). MSC were obtained from male GFP transgenic C57Bl/6 mice. Animals were housed in temperature-controlled rooms (22–25 °C), under a 12:12-h light-dark cycle, with access to water and food, ad libitum. All behavioral tests were performed between 8:00 a.m. and 5:00 p.m., and animals were only tested once. Animal care and handling procedures were in accordance with the National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals (NIH, 8023) and the Institutional Animal Care and Use Committee FIOCRUZ (CPqGM 025/2011). Every effort was made to minimize the number of animals used and to avoid any unnecessary discomfort.

Diabetic neuropathy model

Diabetes was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin (80 mg/kg in citrate buffer, pH 4.5) for three consecutive days [14]. The control group received citrate buffer in the place of streptozotocin. Blood glucose levels were determined in blood samples from the tail vein using ACCU-CHEK glucose sticks. Mice were considered diabetic if glycemia values exceeded 250 mg/dL. Pain-like behaviors were assessed throughout the experimental period to confirm the development of the DN.

Assessment of diabetic sensorial neuropathy by behavioral assays

Sensorial parameters of DN were assessed throughout the experimental period by using the established behavioral assays that evaluate mechanical and thermal nociceptive thresholds [27, 28]. Behavioral tests were performed in blind fashion. Withdrawal threshold to mechanical stimulation was measured with von Frey filaments (Stoelting; Chicago, IL, USA). In a quiet room, mice were placed in acrylic cages (12 \times 10 \times 17 cm) with wire grid floor, allowing full access to the ventral aspect of the hind paws, 40 min before the beginning of the test. A logarithmic series of nine filaments were applied to the plantar surface of the ipsilateral hind paw to determine the threshold stiffness required for 50% paw withdrawal according to the non-parametric method of Dixon, as described by Chaplan and collaborators [28]. A positive response was characterized by the removal of the paw followed by clear flinching movements. The development of DN was characterized by mechanical allodynia, indicated by the reduction of the paw withdrawal threshold (in grams).

Withdrawal threshold to heat stimulation was determined using the Plantar Test (Hargreaves Apparatus, Ugo Basile Biological Instruments, Gemonio, Italy) as previously described [27]. Similar to the von Frey test, mice underwent an acclimatization period before the beginning of the test. An infra-red light source was placed under the glass floor and positioned at the center of the hind paw of mice. On paw withdrawal, a photo-cell automatically shut off the heat source and recorded the time to withdrawal. To avoid thermal injury, there was an upper cutoff limit of 20 s after which the heating was automatically terminated. The stimulation was applied three times with intervals of at least 5 min. The averaged threshold from these three trials was recorded as the thermal nociception threshold. Heat hypoalgesia was indicated by the increase of the paw withdrawal threshold (in seconds).

Motor function assay

To evaluate the motor performance, mice were submitted to the rota-rod test, as previously described [29]. The rota-rod apparatus (Insight, Ribeirão Preto, Brazil) consisted of a bar with a diameter of 3 cm, subdivided into five compartments. On the test day, mice from different experimental groups were placed on the rotating rod (eight revolutions per min) and the falling avoidance was measured for up to 120 s. Mice treated with diazepam (10 mg/kg; Cristália, Itapira, SP, Brazil), the test reference drug, were placed on a rotating rod 1 h after treatment. The results were analyzed as the average time (s) the animals remained on the rota-rod in each group.

Experimental design

Mice were divided into the following groups ($n = 6$): control non-diabetic group, diabetic neuropathy plus control treatment (STZ + saline), diabetic neuropathy plus MSC treatment (STZ + MSC), diabetic neuropathy plus CM-MSC treatment (STZ + CM-MSC), and diabetic neuropathy plus CM-MSC treatment control (STZ + vehicle). Nociceptive tests (von Frey and Plantar Test) were performed at baseline and daily after diabetic neuropathy induction. Four weeks following induction, and after the establishment of behavioral neuropathic pain as assessed by nociceptive tests, mice were transplanted via tail vein injection with 1×10^6 cells/mouse in a final volume of 100 μ L. The number of transplanted MSC was defined based on previous work [14]. The STZ + saline and STZ + vehicle groups received an endovenous injection (100 μ L) of saline or vehicle (serum-free DMEM, centrifuged and filtered), respectively. Motor performance and body weight were recorded weekly to assess general toxicity. Two and 8 weeks after treatments, mice were sacrificed for biological sampling. For the transplanted MSC tracking study, mice were sacrificed 24 h, 1 week or 3 weeks after MSC injection, for biological sampling.

Morphological and morphometric analysis of sciatic nerve

Eight weeks after treatments (12 weeks after the neuropathy induction), mice were euthanized and sciatic nerve samples (± 1 cm) were collected, processed and subjected to morphological and morphometric analysis by light microscopy and transmission electron microscopy. The samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde (grade I, Sigma) in 0.1 M sodium cacodylate buffer overnight; washed in cacodylate buffer; post-fixed in 1% osmium tetroxide (Sigma), 0.8% potassium ferricyanide, and 5 mM CaCl_2 in the same buffer for 60 min; serially dehydrated using graded acetone; and embedded in Poly/Bed resin (Polysciences, Warrington, PA, USA).

Transverse sections (1 μ m thick) were stained with 1% toluidine blue and examined by light microscopy. Images of semi-thin sections were captured and examined using the software Image-Pro Plus 7.01 (MediaCybernetics, Rockville, MD, USA). Morphometric parameters of myelinated fibers, such as axonal diameter, fiber diameter, myelin sheath thickness, percentage of abnormal fibers (fibers with irregular shapes, infoldings, or compacted myelin), and G ratio values were obtained, as described previously [30–32]. For ultrastructural analysis of unmyelinated fibers, ultrathin sections were stained with 5% uranyl acetate for 30 min and 3% lead citrate for 5 min and observed in JEOL electron microscope (JEM - 1230). Morphological and morphometric evaluation of unmyelinated fibers was performed, as previously described [33, 34].

Cytokine measurement by ELISA

For the measurement of cytokine levels, the spinal cords were collected 2 and 8 weeks after treatments, in mice terminally anesthetized with halothane vaporized in 95% O_2 and 5% CO_2 from each experimental group. The L4–L5 spinal segments were removed and rapidly frozen and stored at -80°C . Samples were homogenized in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS; 100 mg tissue/mL) to which 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, and protease inhibitors (0.1 mM PMSE, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KI aprotinin A/100 mL) were added (Sigma). The samples were centrifuged for 10 min at 3000 g, and supernatant aliquots were frozen at -80°C for later quantification. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-10 (IL-10), and transforming growth factor- β (TGF- β) levels were estimated using commercially available immunoassay ELISA kits for mice (R&D System, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The results are expressed as picograms of cytokine per milligram of protein.

Real-time PCR

The transcription of catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and Nrf2 genes was evaluated by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) in mouse spinal cord at the conclusion of the experimental period (8 weeks after treatments). Total RNA was extracted from L4–L5 spinal segments with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the concentration determined by photometric measurement. A High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used to synthesize cDNA from 1 μ g of RNA, according to the manufacturer's recommendations. Synthesis of cDNA and RNA expression analysis was performed by real-time PCR using TaqMan Gene Expression Assay for *Cat* (Mm00437992_m1), *Sod1* (Mm01344233_g1), *Gpx1* (Mm00492427_m1), and *Nrf2* (Mm00477784_m1). A no-template control (NTC) and no-reverse transcription controls (No-RT) were also included. All reactions were run in duplicate on an ABI7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) under standard thermal cycling conditions. The mean Ct (cycle threshold) values from duplicate measurements were used to calculate expression of the target gene, with normalization to an internal control—*Gapdh* (Mm99999915_g1), using the 2 $^{-\text{Dc}}$ formula. Experiments with coefficients of variation greater than 5% were excluded. For transplanted MSC tracking, the transcription of GFP gene was evaluated in the spinal cord, sciatic nerve, dorsal root ganglion, spleen, and lung of mice 24 h, 1 and 3 weeks after MSC treatment. The mean Ct (cycle threshold) values were used to calculate expression of GFP, normalized to

Gapdh, using the cycle threshold method of comparative PCR [35].

Estimation of nitrite and lipid peroxidation

At the end of the experimental period (8 weeks after treatments), the spinal cords were collected. L4–L5 spinal segments were rinsed with ice-cold saline and homogenized in chilled phosphate buffer (pH 7.4), then used to determine lipid peroxidation and nitrite estimation. The malondialdehyde (MDA) content, a marker of lipid peroxidation, was assayed in the form of thiobarbituric acid-reactive substances, as previously described [36]. Briefly, 0.5 ml of homogenate and 0.5 mL of Tris–HCl were incubated at 37 °C for 2 h. After incubation, 1 ml of 10% trichloroacetic acid was added and centrifuged at 1000 g for 10 min. To 1 mL of supernatant, 1 mL of 0.67% thiobarbituric acid was added and the tubes were kept in boiling water for 10 min. After cooling, 1 mL double distilled water was added and absorbance was measured at 532 nm. Thiobarbituric acid-reactive substances were quantified using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and were expressed as nanomoles of malondialdehyde per milligram of protein. Nitrite was estimated in the spinal cord homogenate using the Griess reagent and served as an indicator of nitric oxide production [37]. Next, 500 μL of Griess reagent (1:1 solution of 1% sulphanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylamine diamine dihydrochloric acid in water) was added to 100 μL of homogenate, and absorbance was measured at 546 nm. Nitrite concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) was calculated using a standard curve for sodium nitrite.

Confocal immunofluorescence analyses in the spinal cord of mice

At the conclusion of the experimental period (8 weeks after treatments), mice were anesthetized with halothane vaporized in 95% O_2 and 5% CO_2 and transcardially perfused with saline solution, followed by 4% paraformaldehyde (PFA) solution (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS). The spinal cords were collected, post-fixed overnight at 4 °C in 4% PFA, cryoprotected for 48 h at 4 °C in 30% sucrose (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) in PBS, embedded in optimal cutting temperature embedding compound (O.C.T., Sakura Tissue-Tek), and frozen at -80 °C. Transverse spinal cord sections (4 μm thick) were obtained, fixed in 4% PFA for 10 min, and washed in PBS twice for 5 min. Non-specific binding was blocked by incubating the sections in 5% BSA in PBS for 1 h, followed by incubation overnight with primary antibodies solution containing rat anti-gial fibrillary acidic protein—GFAP (1:200, Zymed, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), goat anti-Iba1,

and rabbit anti-galectin-3, diluted in 1% BSA in PBS. Sections were then incubated with the secondary antibodies, anti-rat IgG Alexa Fluor 594 conjugated for GFAP (1:800; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), anti-goat IgG Alexa Fluor 488 conjugated for Iba1 (1:600; Molecular Probes), or anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568 conjugated for galectin-3 (1:100; Molecular Probes) during 1 h at room temperature. Nuclei were stained with Vectashield mounting medium with DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Quantitative analysis, expressed as percentage of immuno-positive area, was performed using a confocal laser scanning AIR microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The area displaying immunoreactive staining for Iba1, GFAP, or gal-3 in the superficial spinal dorsal horn (laminae I–III) was measured using Image-Pro Plus v. 7.01 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). The area of the ipsilateral superficial spinal dorsal horn was also calculated. The ratio of the above areas was used as the percentage area density of Iba1, GFAP, or gal-3 [38].

Statistical analyses

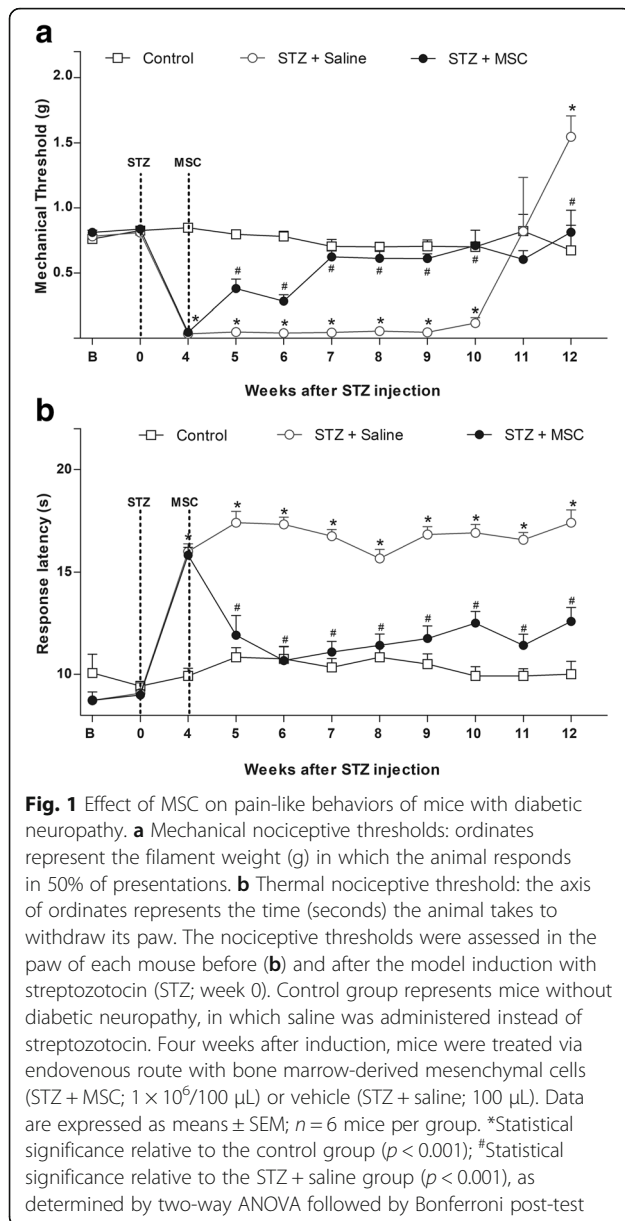
All data are presented as means \pm standard error of the mean (S.E.M) of measurements made on six animals in each group. Behavioral data were analyzed using two-way ANOVA (group and time) followed by Bonferroni's multiple comparisons. For morphometric analysis, Shapiro Wilk test was performed, and because all data were negative for normality, Kurskal Wallis followed by Dunns post-test was used. Remaining data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. All data were analyzed using the GraphPad Prism v.5.0 software (GraphPad Inc.). Differences were considered statistically significant for p values < 0.05 .

Results

MSC transplantation reduces the sensorial dysfunction in diabetic neuropathic mice

Behavioral testing was performed at baseline and daily, after the model induction, to evaluate the effects of MSC transplantation on measurable sensorial parameters of STZ-induced diabetic neuropathy. All mice survived until the end of the study. There were no signs of distress, motor disability, or general toxicity. STZ treatment induced sensory neuropathy associated with mechanical allodynia (Fig. 1a) and heat hypoalgesia in mice (Fig. 1b), without causing motor impairment, as assessed by the rota-rod test (data not shown).

Behavioral signs of sensory neuropathy were evident, 1 week after the diabetes model induction. Heat hypoalgesia persisted during the experimental period of 12 weeks ($p < 0.001$), while mechanical allodynia was maintained for 10 weeks, at which time diabetic mice



showed a gradual loss of mechanical sensitivity ($p < 0.001$). To determine whether MSC induce therapeutic effects in diabetic sensory neuropathy, mice were treated with MSC (1×10^6 , $100 \mu\text{L}$) or vehicle ($100 \mu\text{L}$) 4 weeks after diabetes induction, when sensorial neuropathy was fully established. One week after administration, neuropathic mice treated with MSC exhibited antinociceptive effect to mechanical stimuli (Fig. 1a, $p < 0.05$). The antinociceptive effect of MSC was progressive, peaking 3 weeks after treatment, when a complete reversion of the mechanical allodynia was achieved ($p < 0.001$). Importantly, the progression of sensory neuropathy, indicated by the late loss of mechanical sensitivity, was completely prevented in MSC-treated mice. Additionally,

the MSC treatment also reverted the heat hypoalgesia of neuropathic mice from 7 days after administration until the end of the evaluation period (Fig. 1b, $p < 0.001$).

MSC restore the morphological pattern of the sciatic nerve of mice with diabetic neuropathy

Since diabetic neuropathy is associated with morphological alterations in the peripheral nerves, morphological analysis of myelinated and unmyelinated fibers of the sciatic nerve were performed at the conclusion of the experimental period by light and electron microscopy. Data from light microscopy showed that sciatic nerves from non-diabetic control mice present myelinated fibers of varying diameters, regular contours, intact myelin sheaths, and thickness proportional to the diameter of their axons (Fig. 2a). The ultrastructural evaluation of sciatic nerves from non-diabetic mice by electron microscopy showed axons of myelinated fibers surrounded by a typical myelin sheath and the presence of numerous unmyelinated fibers, evenly distributed in endoneural space (Fig. 2b). In diabetic mice, myelinated fibers with axonal atrophy and invasion of the myelin sheath were observed (infoldings; Fig. 2c). In addition, large diameter myelinated fibers in axonal atrophy process with loosening of the myelin sheath and apparent diminution of unmyelinated fiber numbers were found in sciatic nerves of diabetic mice (Fig. 2d). The qualitative assessment of ultrastructural characteristics of sciatic nerve from diabetic mice treated with MSC, however, showed markedly fewer morphologic alterations relative untreated diabetic mice. The sciatic nerve of MSC-treated mice presented myelin fibers of various sizes and with proportional caliber sheaths surrounding the axon, myelin sheath with regular contours, and the presence of numerous unmyelinated fibers with homogeneous distribution (Fig. 2e, f). In addition, diabetic mice presented an increased percentage of myelin fibers with morphological alterations, in particular myelin infoldings (Fig. 2g, h). These morphological abnormalities, however, were completely reversed by MSC treatment ($p < 0.05$).

MSC transplantation reduces morphometric alterations of myelinated and unmyelinated fibers of the sciatic nerve from diabetic mice

Different morphometric parameters obtained from the analysis of mouse sciatic nerve myelin fibers were evaluated (Fig. 3). Panels c–e show that the fiber diameter mean, myelin sheath thickness, and G ratio (ratio axon/nerve fiber diameter) were not different between diabetic and non-diabetic mice. On the other hand, the number of myelin fibers (panel a) and axon diameter (panel b) was decreased in diabetic neuropathy mice compared to non-diabetic mice ($p < 0.05$). Importantly, MSC transplantation was able to prevent these morphological alterations suggestive of

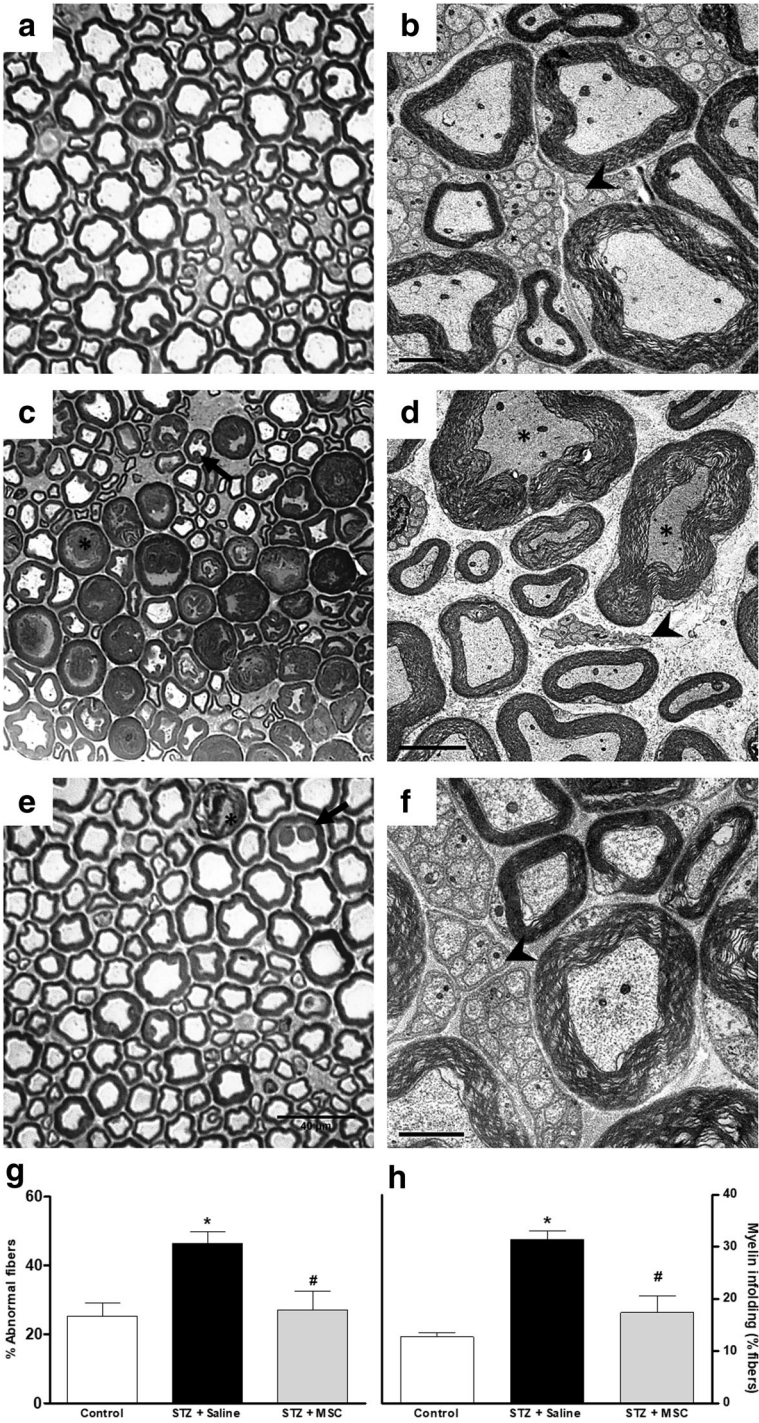


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 2 Effect of MSC on the morphology of sciatic nerve from mice with diabetic neuropathy. Representative photomicrographs of sciatic nerve cross-sections from non-diabetic mice (panel **a**, control group), diabetic mice treated with saline (panel **c**), and diabetic mice treated with MSC (1×10^6 , panel **e**), 12 weeks after the neuropathy induction. Light microscopy revealed that sciatic nerve from diabetic mice (**c**) had large myelin fibers with axonal atrophy, loose myelin sheath (*), and myelin with infoldings into to the axoplasm (arrow). Panel **e** shows that sciatic nerve from MSC-treated neuropathic mice presented myelin fibers of various calibers with normal morphology. Scale bar = 40 μm . Electron microscopy of sciatic nerve cross-sections from non-diabetic mice (panel **b**, control group), diabetic mice treated with saline (panel **d**), and diabetic mice treated with MSC (1×10^6 , panel **f**). Analysis of ultrastructural aspects of the sciatic nerve shows in **b** myelin fibers with varying sizes and proportional myelin sheath, including numerous unmyelinated fibers; in **d** few unmyelinated fibers (arrowhead) and the presence of atrophic axons with loose myelin sheath (*); and in **f** myelinated fibers with myelin sheath of varying diameters and a large amount of unmyelinated fibers (arrowhead). Scale bar = 2 μm . Panels **g** and **h** show the percentage of abnormal myelinic fibers and fibers with myelin infoldings, respectively. Data are expressed as means \pm SEM; $n = 3$ mice per group. *Statistically significant as compared to the control group ($p < 0.05$). #Statistically significant as compared to the STZ + saline group ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test

axonal atrophy, which is associated with the diabetic neuropathy evolution.

Figure 4 shows the morphology and morphometry of unmyelinated C fiber mouse sciatic nerves. Panels a–c are the representative electromicrographs of nucleated Remak bundle of non-diabetic, diabetic, and MSC-treated diabetic mice. Diabetic mice presented shrunken C fibers, lower C fiber area, and lower C fiber density than non-diabetic control

mice (Fig. 4b–e, $p < 0.01$). Morphological and morphometric parameters of C fibers in diabetic mice treated with MSC did not differ from those observed in non-diabetic mice.

Effects of MSC transplantation on glial cell expression in the dorsal horn of the spinal cord of neuropathic mice

Activation of glial cells in the spinal cord is a key event in the development and maintenance of

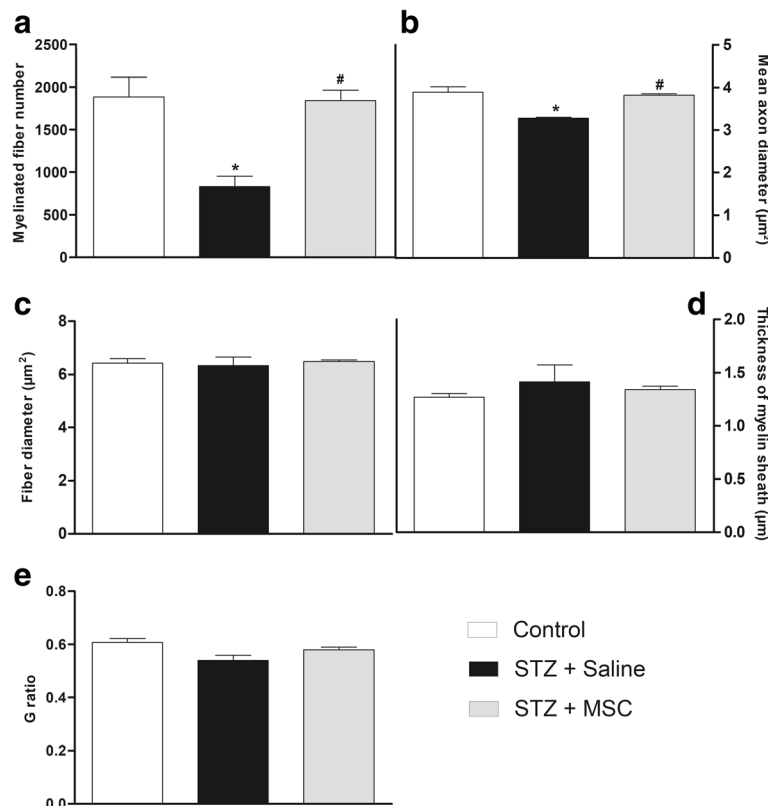


Fig. 3 Effects of MSC on the morphometry of sciatic nerve myelinic fibers from mice with diabetic neuropathy. Morphometric analyses of sciatic nerve from non-diabetic mice (control group), diabetic mice treated with saline (STZ + saline), and diabetic mice treated with MSC (1×10^6 ; STZ + MSC), performed 12 weeks after neuropathy induction. Graphs show **a** myelinated fibers number, **b** mean axon diameter, **c** fiber diameter, **d** thickness of myelin sheath, and **e** G-ratio (ratio axon/nerve fiber diameter). Data are expressed as means \pm SEM; $n = 3$ mice per group. *Statistical significance compared to control group ($p < 0.05$). #Statistical significance compared to STZ + saline group ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey post-test

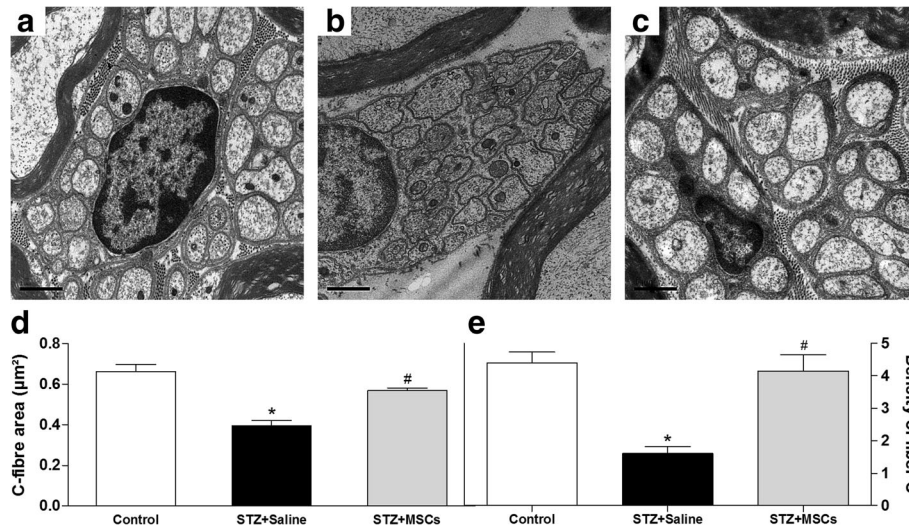


Fig. 4 Effects of MSC on morphology and morphometry of C fibers of the sciatic nerve from mice with diabetic neuropathy. Electron microscopy of sciatic nerve cross-sections from non-diabetic mice (panel **a**, control), diabetic mice treated with saline (panel **b**, STZ + saline), and diabetic mice treated with MSC (1×10^6 panel **c**; STZ + MSC), performed 12 weeks after neuropathy induction. Scale bar = 0.5 μm . Ultrastructural analysis of the sciatic nerve showed the effects of MSC treatment on the area (panel **d**) and density (panel **e**) of the fiber C of the sciatic nerve of mice with diabetic peripheral neuropathy. Data are expressed as means \pm SEM; $n = 3$ mice per group. *Statistical significance compared to control group ($p < 0.05$). #Statistical significance compared to STZ + saline group ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey post-test

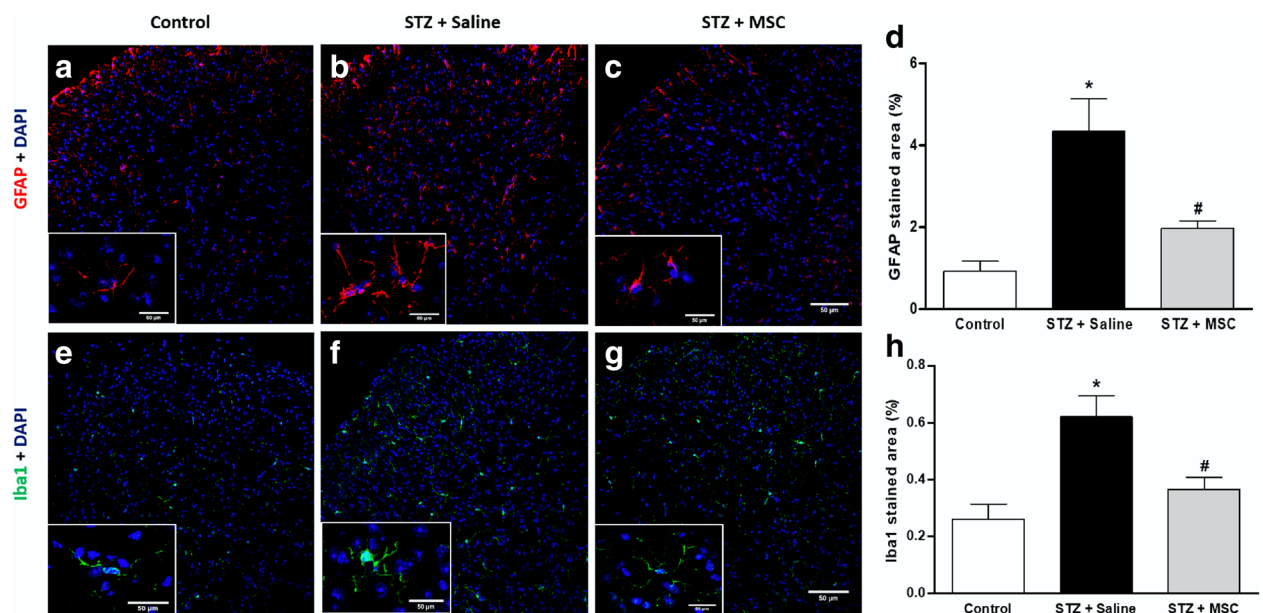


Fig. 5 MSC transplantation reduce glial cell expression in the dorsal horn of the spinal cord of neuropathic mice. Eight weeks after the treatment with MSC (1×10^6 ; STZ + MSC) or saline (STZ + saline), glial cell expression in the spinal cord of neuropathic mice was evaluated. Control non-diabetic group received saline instead of streptozotocin. Representative photomicrographs of histological sections of the mouse spinal cord immunolabeled with GFAP (**a-c**) or Iba1 (**e-g**). Images are at 200 \times . Insets demonstrate representative photomicrographs of GFAP or Iba1 positive cells under magnification of 400 \times . Scale bar = 50 μm . Panels **d** and **h** show the quantitative analysis of the percentage area GFAP and Iba1 positive in the spinal dorsal horn, respectively. Data are expressed as means \pm SEM; $n = 3$ mice per group. *Statistical significance compared to the remaining groups ($p < 0.05$). One-way ANOVA followed by Tukey post-test

sensory neuropathy. Considering that a single MSC transplantation resulted in the complete reversion of sensorial dysfunction in diabetic mice, a possible modulatory action of MSC on glial cell expression during neuropathy was next evaluated. To assess microglia and astrocyte expression in the spinal cord, immunostaining for Iba1 and GFAP was performed, and representative photomicrographs of histological sections of the spinal cord of mice are shown in Fig. 5. Saline-treated diabetic mice showed higher immunoreactivity for Iba1 and GFAP compared to the non-diabetic control group ($p < 0.05$). Treatment of diabetic mice with MSC significantly reduced the spinal immunoreactivity for Iba1 and GFAP, when compared to untreated diabetic mice.

MSC treatment reduces oxidative/nitrosative stress biomarkers in the spinal cord of diabetic mice

RT-qPCR analysis for selected key molecules showed an antioxidant profile in the spinal cord of mice with diabetic neuropathy. Diabetic mice presented higher values of catalase (Fig. 6a), superoxide dismutase (Fig. 6b), glutathione peroxidase (Fig. 6c), and Nrf2 (Fig. 6d) mRNA in the spinal cord compared to non-diabetic mice ($p < 0.01$). Eight weeks after transplantation, diabetic mice treated with MSC showed reduced mRNA

expression of these antioxidant factors in the spinal cord, compared to saline-treated diabetic mice.

Next, the effects of MSC on nitrosative stress and lipid peroxidation were investigated by measuring the tissue levels of nitrite and MDA in the spinal cord 8 weeks after transplantation. Nitrite (Fig. 7a) and MDA (Fig. 7b) levels, significantly elevated in the spinal cord of diabetic mice when compared to the control non-diabetic group ($p < 0.05$), were significantly reduced in MSC treated in the spinal cord of diabetic mice.

A single transplantation of MSC modulates the pattern of spinal cytokine production in diabetic mice

Next, a possible modulatory action of MSC on spinal cytokine production during diabetic neuropathy was evaluated. Levels of IL-1 β , TNF- α , IL-10, and TGF- β in the spinal cord (L5-L4) were evaluated before, 2 and 8 weeks after treatments (Fig. 8). ELISA analysis demonstrated that saline-treated diabetic mice exhibited upregulation of IL-1 β (Fig. 8a) and TNF- α (Fig. 8b) in the spinal cord, relative to non-diabetic control mice ($p < 0.001$). Diabetic mice also presented reduction of the spinal cord TGF- β (Fig. 8d), but not IL-10 (Fig. 8c), levels. The levels of IL-1 β and TNF- α were reduced, while IL-10 and TGF- β were enhanced, in the spinal cord of neuropathic mice treated with MSC ($p < 0.05$).

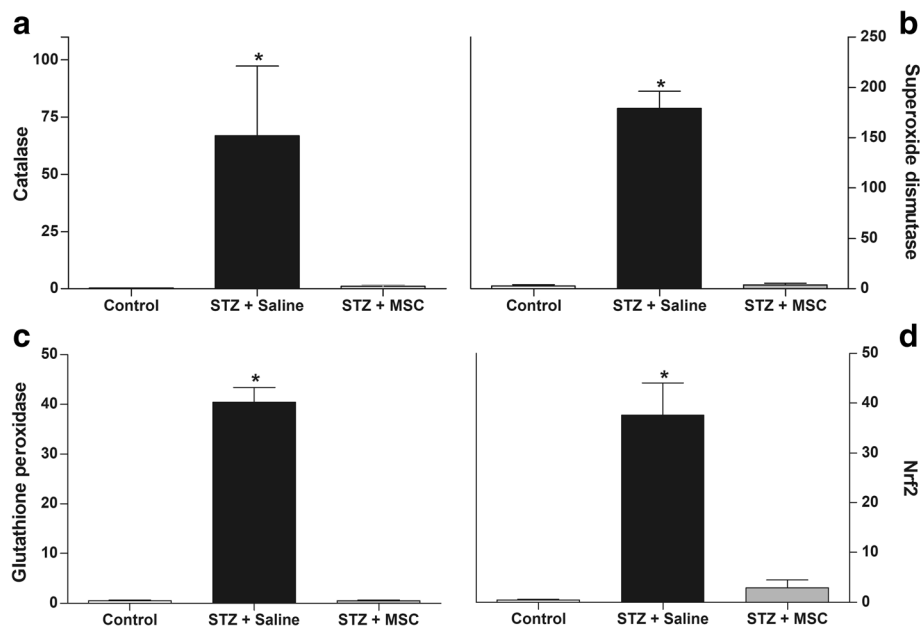
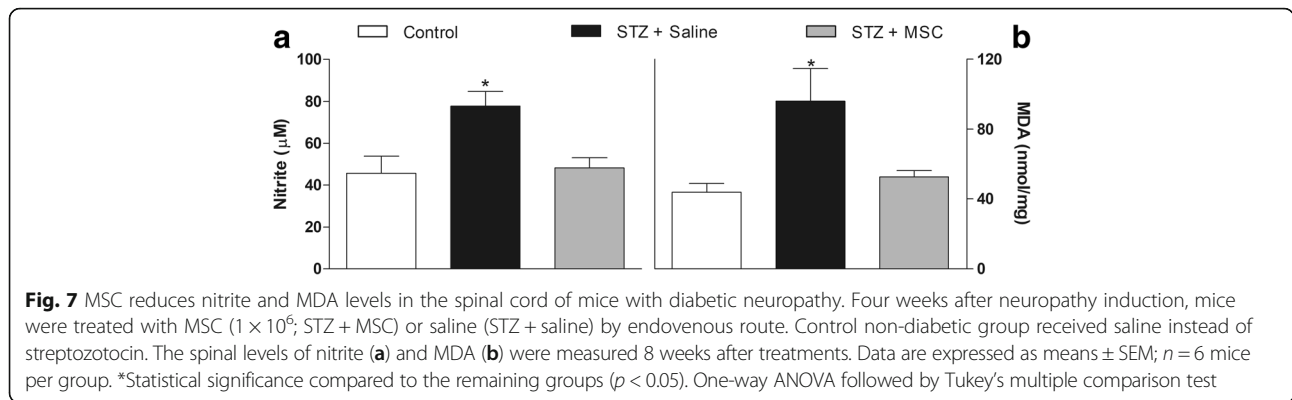


Fig. 6 Effect of MSC on the antioxidant profile in the spinal cord of mice with diabetic neuropathy. Four weeks after the neuropathy induction, mice were treated with MSC (1×10^6 ; STZ + MSC) or saline (STZ + saline) by endovenous route. Control non-diabetic group received saline instead of streptozotocin. The spinal levels of mRNA were measured by RT-qPCR 8 weeks after treatment. Panels show the spinal levels of catalase mRNA (a), superoxide dismutase mRNA (b), glutathione peroxidase mRNA (c), and Nrf2 mRNA (d). Data are expressed as means \pm SEM; $n = 6$ mice per group. *Statistical significance compared to the remaining groups ($p < 0.001$). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test



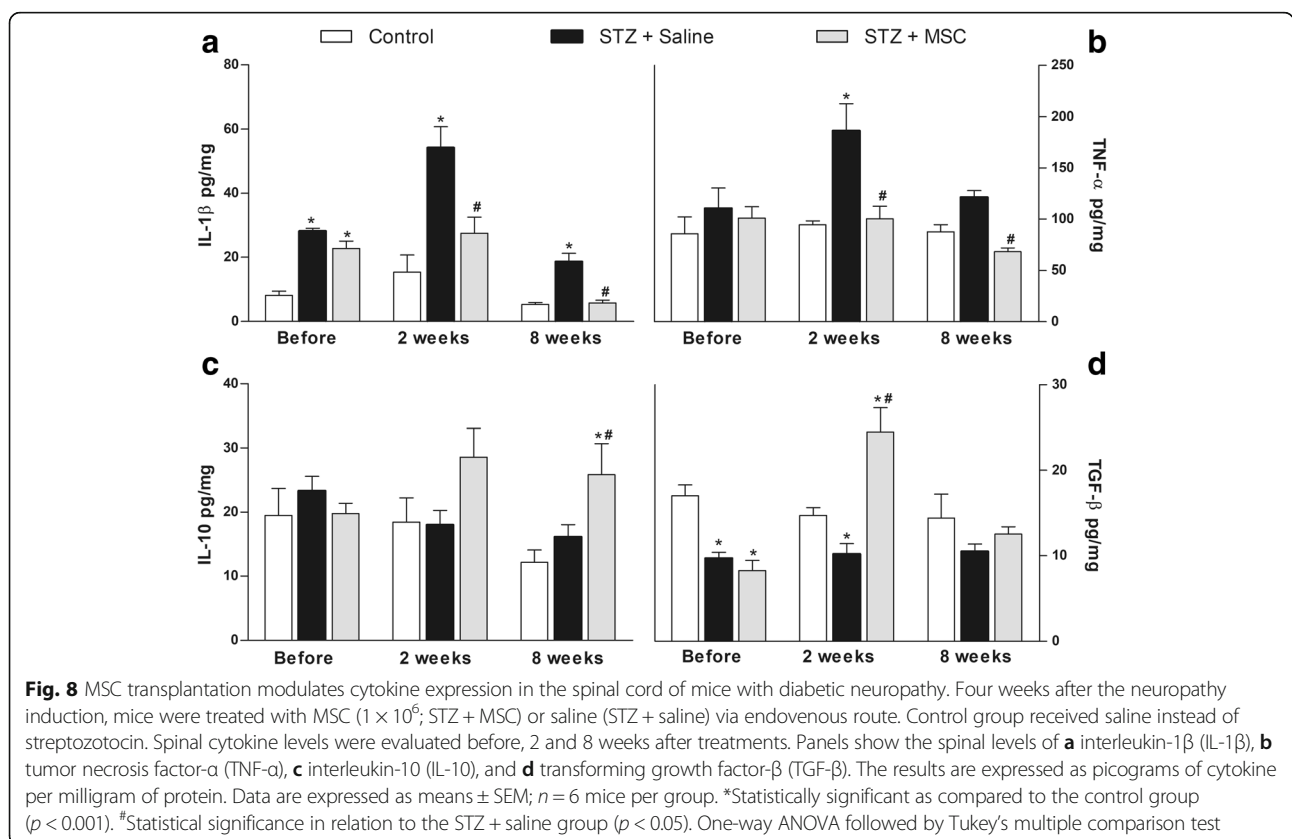
MSC transplantation reduces galectin-3 expression in the dorsal horn of the spinal cord of neuropathic mice

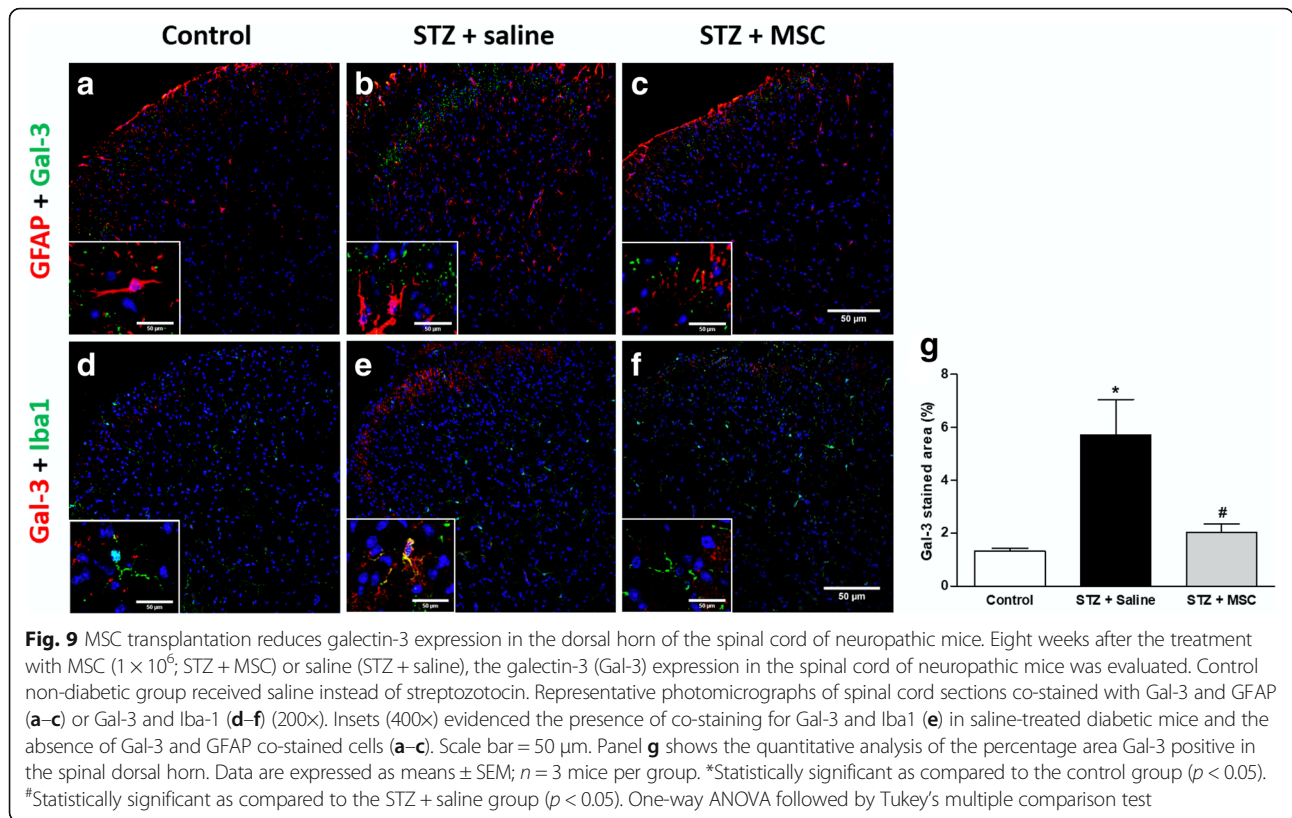
The expression profile of galectin-3 in the spinal cord of diabetic mice was investigated by immunofluorescence, 8 weeks after the treatment with MSC (1×10^6 ; STZ + MSC) or saline (STZ+ saline). Control non-diabetic group received saline instead of streptozotocin. Figure 9 shows representative images of the co-labeling for galectin-3 and Iba-1 (A-F), and galectin-3 and GFAP (G-I). Spinal cord sections of saline-treated diabetic mice showed higher immunoreactivity for galectin-3 in the dorsal horn, compared to the non-diabetic control group ($p < 0.05$; panel j). The treatment

of diabetic mice with MSC completely reversed the increased spinal immunoreactivity for galectin-3. The co-labeling studies demonstrated the presence of some galectin-3⁺ microglial cells (Iba-1 positive cells) in saline-treated diabetic mice. Cells positive for galectin-3 and GFAP, a marker of activated astrocyte, were not observed.

Transplanted MSC tracking

RT-qPCR analysis for GFP identified the location of transplanted MSC in neuropathic mice 24 h, 1 and 3 weeks after transplantation. Samples of the lung, spleen, sciatic nerve, dorsal root ganglion, and spinal cord were analyzed.



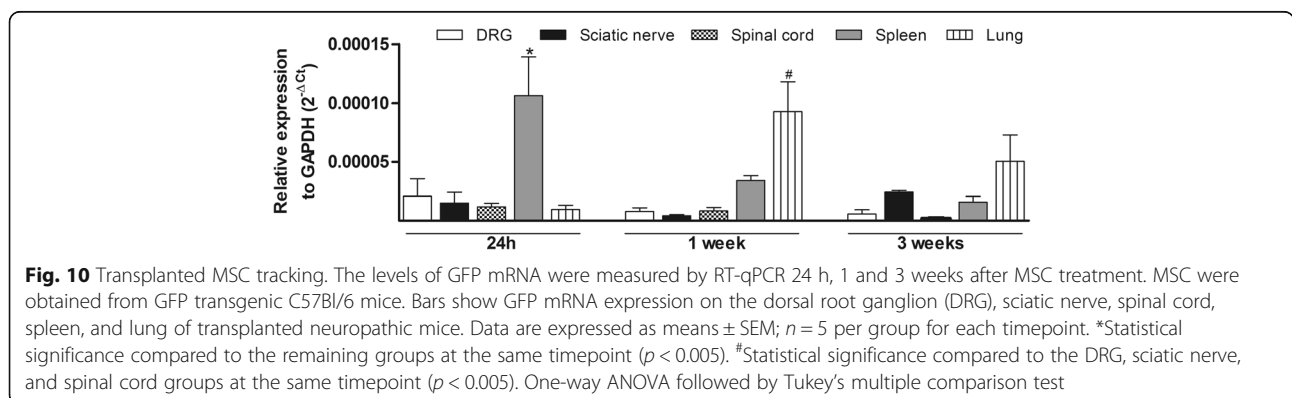


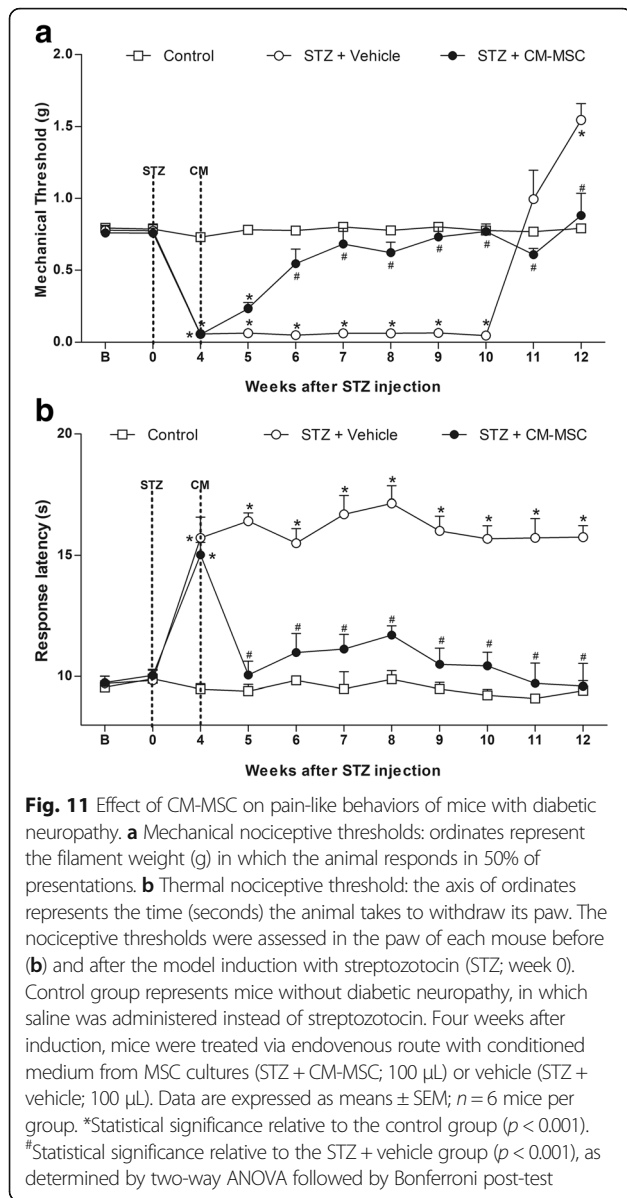
Although GFP expression was detected at low levels in all tissues evaluated, it was significantly higher in the spleen and lung samples (Fig. 10). Twenty-four hours after MSC treatment, GFP mRNA levels were increased in spleen samples ($p < 0.05$), whereas in the 1-week timepoint showed an increased in the lung sample ($p < 0.05$). Three weeks after transplantation, the level of GFP expression was less in the tissues evaluated.

Conditioned medium from MSC reduces the sensorial dysfunction in diabetic neuropathic mice

In order to corroborate the hypothesis that the MSC-induced beneficial effects on neuropathic pain

correlate with paracrine actions, the effects of CM-MSC on diabetic sensory neuropathy were evaluated. Neuropathic mice were treated with CM-MSC or vehicle 4 weeks after the induction of diabetes, when the sensorial neuropathy was fully established. Two weeks after administration, CM-MSC-treated neuropathic mice showed complete reversion of mechanical allodynia, and this antinociceptive effect was maintained throughout the experimental period (Fig. 11a; $p < 0.001$). CM-MSC treatment reverted the heat hypoalgesia of neuropathic mice from 1 week after administration until the completion of the evaluation period (Fig. 11b; $p < 0.001$).





Discussion

Diabetic neuropathy is associated with sensory symptoms, such as pain and enhanced/diminished sensation, for which there is no effective therapy, ultimately leading to considerably reducing the patient's quality of life. The present study demonstrated that a single MSC administration was able to reverse the sensory diabetic neuropathy through modulation of crucial events during neuropathy maintenance, in both the peripheral and central nervous systems, highlighting the cell therapy potential for the neuropathy treatment. In addition to the previously described effects of MSC on peripheral nerves, the present study described the modulatory effect of MSC in the local microenvironment of the diabetic mouse spinal cord.

The development of sensory neuropathy was confirmed by using established behavioral assays, which detected the characteristic mechanical allodynia and heat hypoalgesia observed in diabetic neuropathy in mice [19]. About 40% of individuals with DN manifest mechanical allodynia [39], progressing to a loss of sensory perception in the late disease stages, which is closely related to cases of limb ulceration and amputation [40]. In the present study, mechanical allodynia was completely present in mice, 4 weeks after STZ administration, and progressed to loss of tactile sensitivity 12 weeks after STZ, indicating a strong equivalence between the model and the clinical manifestation. The MSC transplantation completely reverted the signs of sensory-induced neuropathy in the STZ-diabetic mouse model. In fact, behavior sensory neuropathy improvements in diabetic mice with MSC treatments have previously been demonstrated [9, 19, 14]. Recent evidence indicate that MSC may act as biologic "pumps" by releasing analgesic molecules responsible to mediate the therapeutic effects of these cells in neuropathic pain [41]. On the other hand, in the present study, the reversal of sensory neuropathy following a single injection of MSC was maintained throughout the evaluation period, an effect that is not attained by analgesic substances. This effect profile suggests that a reparative action, more than just an analgesic effect, may result after MSC treatment. This view is supported by literature data showing that MSC treatment induces angiogenesis, neurotrophic effects, and restoration of myelination in peripheral nerves of diabetic animals [9, 11–13]. Further ultrastructural analyses of myelinated and unmyelinated fibers of the sciatic nerve, presented here, support this hypothesis. Morphological and morphometric analysis of the sciatic nerve showed significant differences between sensory fibers of diabetic and non-diabetic mice, such as the presence of degenerative changes in axons, morphological alterations in the myelin sheath, and lower unmyelinated C fiber area and density. In MSC-treated diabetic mice, all these morphologic alterations, considered to be hallmarks of DN, were markedly reduced, indicating that the cell therapy restored sensory fiber structures in diabetic nerves. The present data are consistent with the recent study of Han and co-workers, showing that MSC restores the ultrastructure of myelinated fibers in diabetic nerve, while giving the first evidence of the restorative action of MSC on unmyelinated C fibers [13]. Morphological and functional alterations of both A δ and C nociceptive fibers present in peripheral nerves have been proposed to explain the changes in sensitivity and pain during diabetic neuropathy. Maintaining hyperglycemia for prolonged periods leads to sensory nerve damage, thus modifying the underlying neural transmission pattern, resulting in the loss or gain of sensitivity to painful

stimuli [42, 43]. A relationship between reduced number of sensory fibers in peripheral nerves and thermal/mechanical hyposensitivity in diabetic mice was proposed by Lennertz and colleagues [44] and reinforced here. Therefore, it is possible that the long-lasting effect of MSC reversing behavioral sensory neuropathy stems from the reestablishment of ultrastructures within peripheral diabetic nerves. On the other hand, the mechanisms by which MSC reduce morphological alterations of nociceptive fibers of the peripheral nerves during neuropathy are not fully comprehended. It has been proposed that MSC promote the repair of peripheral nerves in diabetic animals through paracrine actions of neurotrophic and angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor (NGF), and hepatocyte growth factor (HGF), secreted by these cells [9, 11–13]. However, the contribution of these growth factors to MSC-induced reparative action on peripheral nerve during diabetic neuropathy still needs to be further investigated.

The mechanisms underlying DN maintenance involve multiple biochemical and cellular alterations in the central nervous system, which may be a contributory factor in the refractory nature of the diabetic neuropathy. Hyperglycemia disturbs spinal cord homeostasis, while high glucose concentrations are responsible for inducing metabolic and enzymatic abnormalities, and disrupts the functions of cell mitochondria inducing the overproduction of reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress [22, 45–48]. In addition, hyperglycemia and the subsequent formation of ROS/RNS induce the activation of spinal microglia [22], triggering spinal neuroinflammatory cascades that have been considered a pivotal event of sensory neuropathy [23, 47, 49]. In line with this idea, the present study demonstrated that GFAP and Iba-1, markers of activated astrocyte and activated microglia, respectively, were highly expressed in the dorsal horn of the spinal cord in diabetic mice. Importantly, MSC transplantation significantly reduced the staining for GFAP and Iba-1, indicating a suppression of the spinal activation of astrocytes and microglia by MSC. Although the inhibitory effect of mesenchymal cells on spinal glial cell activation has been previously demonstrated in experimental neuropathic pain associated with spinal cord injury [50] and spinal nerve ligation [49], the results from our study are the first demonstration of this phenomenon in diabetic neuropathy.

Considering the contribution of oxidative stress to the glial cell activation, the redox homeostasis in the spinal cord was also investigated. Nitrosative stress and lipid peroxidation, indicated by high levels of nitrite and MDA in the spinal cord, were evidenced in diabetic mice. The high production of ROS/RNS is controlled by the activation of

cell antioxidant defense system, which includes a range of antioxidant enzymes [51]. In fact, qRT-PCR data showed upregulation of catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and Nrf2 mRNA, indicating the presence of oxidative stress in the spinal cord microenvironment of diabetic mice. Importantly, MSC treatment reduced both the ROS/RNS levels and the activation of the antioxidant defense system in the spinal cord of diabetic mice, suggesting that a single MSC administration is able to promote the reestablishment of redox homeostasis in the spinal cord. The antioxidant properties of stem cells have been previously described by *in vitro* [52–54] and *in vivo* [55, 56] studies. In line with the present data, MSC were found to influence the spinal redox context in models of traumatic spinal cord injury [56] and amyotrophic lateral sclerosis [57].

There is emerging evidence for the causal role of oxidative stress underlying activation of glial cells in diabetic neuropathy [58]. During neuropathic states, glial cells in the spinal cord are activated, accompanied by a wide cascade release of neuroactive molecules and pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α , which have been directly implicated in the excitability pattern change of spinal neurons and sensory neuropathy [22, 47, 59]. In line with this concept, in the present study, diabetic mice presented enhanced levels of IL-1 β and TNF- α in the spinal cord, while MSC treatment inhibited this upregulation, in parallel with its effects on behavioral sensory neuropathy. The modulatory action of MSC on cytokine expression in peripheral tissues of diabetic rodents has been previously demonstrated [12, 19]. In addition, MSC administration enhanced the levels of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β in the spinal cord of neuropathic mice. IL-10 and TGF- β induce therapeutic effects in neuropathic conditions [8, 60, 61], and their role to the antinociception induced by stem cells in neuropathic pain has been proposed [49, 62].

Galectin-3 is a member of the lectin family that binds β -galactosides, which plays a major role in mechanisms of inflammation [63–66]. Since galectin-3 is involved in oxidative stress [67–69] and neuroinflammation in the spinal cord [70, 71], the spinal expression of this lectin was evaluated in diabetic mice. Immunofluorescence analyses showed that galectin-3 was overexpressed in the superficial dorsal horn of the spinal cord of diabetic mice, and this phenomenon was reversed by MSC transplantation. These data highlight the broad inhibitory effect induced by mesenchymal cells in the spinal neuroinflammatory response, triggered by hyperglycemia/diabetes.

It has been proposed that the therapeutic effects of MSC during neuropathic conditions are related to the paracrine action of these cells [7, 9, 26]. Data from the

present work corroborate this hypothesis. By detecting levels of GFP mRNA in different tissues of neuropathic mice, it was possible to demonstrate that some transplanted MSC were localized in the lung and spleen, with minimal retention in the sciatic nerve, dorsal root ganglion, and spinal cord. This result indicates that the MSC-induced beneficial effects during diabetic neuropathy are independent of the presence of significant amount of the transplanted cells at the lesion site. In addition, a single systemic administration of the conditioned medium from MSC culture induced long-lasting antinociceptive effect in neuropathic mice. Interestingly, the profile and magnitude of the CM-MS-C-induced beneficial effects on sensory neuropathy were similar to those induced by MSC transplantation. In fact, the remarkable therapeutic potential of CM-MS-C has been consistently demonstrated in several experimental models, including in nervous system disorders and painful conditions [26, 72–75]. These results corroborate the hypothesis that paracrine action of MSC is important to the therapeutic effects of these cells during diabetic neuropathy. Nevertheless, the complex mechanisms by which MSC reduce sensory neuropathy, probably involving a broad spectrum of soluble factors and extracellular vesicles secreted by MSC, need to be further investigated.

Conclusions

Taken together, our data indicate that, in addition to the beneficial actions of MSC in the peripheral nervous system, blocking the spinal neuroinflammatory cascade is a possible mechanism by which mesenchymal stem cells reduce the signs of sensorial diabetic neuropathy.

Abbreviations

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; DN: Diabetic neuropathy; gal-3: Galectin-3; i.p.: Intraperitoneal; IL-10: Interleukin-10; IL-1 β : Interleukin-1 β ; MDA: Malondialdehyde; MSC: Mesenchymal stem/stromal cells; Nr2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PBS: Phosphate-buffered saline; qRT-PCR: Real-time quantitative polymerase chain reaction; ROS/RNS: Reactive oxygen/nitrogen species; STZ: Streptozotocin; TGF- β : Transforming growth factor- β ; TNF- α : Tumor necrosis factor- α

Acknowledgements

We thank Kyan James Allahdadi for carefully reviewing this manuscript.

Funding

This work was supported by the FAPESB [grant number DTE 0046/2011] and CNPq [grant number 445547/2014-6]. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to publish the results.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

AFE performed the experiments and the data analysis. MAVS interpreted the microscopy data and revised the manuscript. DNS and GSAS cultured and characterized the mesenchymal cells. PJJ and CKVN performed the experiments and interpreted the real-time PCR data. RRS designed the immunofluorescence studies. MBPS participated in the research design and

revised the manuscript. CFV designed the research, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Animal care and handling procedures were in accordance with the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH, 8023) and the Institutional Animal Care and Use Committee FIOCRUZ (CPqGM 025/2011).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ, Salvador, BA CEP 40296-710, Brazil. ²Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation-IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-900, Brazil. ³Pharmacy College, Federal University of Bahia, Salvador, BA CEP 40170-290, Brazil. ⁴Center of Biotechnology and Cell Therapy, São Rafael Hospital, Salvador, BA CEP 41253-190, Brazil. ⁵Federal University of Recôncavo de Bahia, Feira de Santana, BA CEP 44042-280, Brazil.

Received: 27 October 2017 Accepted: 14 June 2018

Published online: 22 June 2018

References

- Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, et al. IDF diabetes atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;128:40–50.
- Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 2005;28:956–62.
- Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther.* 2008;120:1–34.
- Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempner P, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care.* 2010;33:2285–93.
- Waldfoegel JM, Nesbit SA, Dy SM, Sharma R, Zhang A, Wilson LM, et al. Pharmacotherapy for diabetic peripheral neuropathy pain and quality of life: a systematic review. *Neurology.* 2017;88:1958–67.
- Papanas N, Ziegler D. Emerging drugs for diabetic peripheral neuropathy and neuropathic pain. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2016;21:393–407.
- Franchi S, Castelli M, Amodeo G, Niada S, Ferrari D, Vescovi A, et al. Adult stem cell as new advanced therapy for experimental neuropathic pain treatment. *Biomed Res Int.* 2014;2014:470983.
- Chen L, Huang H, Sharma HS, Zuo H, Sanberg PR. Cell transplantation as a pain therapy targets both analgesia and neural repair. *Cell Transplant.* 2013; 22(Suppl 1):11–9.
- 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.* 2008;57:3099–107.
- Jeong JO, Kim MO, Kim H, Lee MY, Kim SW, Li M, et al. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation.* 2009;119:699–708.
- Kim BJ, Jin HK, Bae JS. Bone marrow derived mesenchymal stem cells improve the functioning of neurotrophic factors in a mouse model of diabetic neuropathy. *Lab Anim Res.* 2011;27:171–6.
- Omi M, Hata M, Nakamura N, Miyabe M, Kobayashi Y, Kamiya H, et al. Transplantation of dental pulp stem cells suppressed inflammation in sciatic nerves by promoting macrophage polarization towards anti-inflammation phenotypes and ameliorated diabetic polyneuropathy. *J Diabetes Investig.* 2016;7:485–96.
- Han JW, Choi D, Lee MY, Huh YH, Yoon Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve diabetic neuropathy by direct modulation

- of both angiogenesis and myelination in peripheral nerves. *Cell Transplant.* 2016;25:313–26.
14. Guimarães ET, Cruz GS, Almeida TF, Souza BS, Kaneto CM, Vasconcelos JF, et al. 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 Transplant.* 2013;22:2345–54.
 15. Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia.* 2001; 44:1973–88.
 16. Leininger GM, Vincent AM, Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2004;9:26–53.
 17. Salgado AJ, Sousa JC, Costa BM, Pires AO, Mateus-Pinheiro A, Teixeira FG, et al. Mesenchymal stem cells secretome as a modulator of the neurogenic niche: basic insights and therapeutic opportunities. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:249.
 18. Hofer HR, Tuan RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:131.
 19. Waterman RS, Morgenweck J, Nossaman BD, Scandurro AE, Scandurro SA, Betancourt AM. Anti-inflammatory mesenchymal stem cells (MSC2) attenuate symptoms of painful diabetic peripheral neuropathy. *Stem Cells Transl.* 2012;1:557–65.
 20. Tesfaye S, Selvarajah D, Gandhi R, Greig M, Shillo P, Fang F, et al. Diabetic peripheral neuropathy may not be as its name suggests: evidence from magnetic resonance imaging. *Pain.* 2016;157(1):72–80.
 21. Calcutt NA. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *Int Rev Neurobiol.* 2002;50:205–28.
 22. Wang D, Couture R, Hong Y. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2014;728:59–66.
 23. Tsuda M, Ueno H, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. *Glia.* 2008;56:378–86.
 24. Mietto BS, Mostacada K, Martinez AM. Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses. *Mediat Inflamm.* 2015;25:251204.
 25. Silva DN, Freitas Souza BS, Azevedo CM, Vasconcelos JF, Carvalho RH, Soares MB, et al. Intramyocardial transplantation of cardiac mesenchymal stem cells reduces myocarditis in a model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:81.
 26. Gama KB, Santos DS, Evangelista AF, Silva DN, Alcântara AC, Santos RR, et al. Conditioned medium of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells as a therapeutic approach to neuropathic pain: a preclinical evaluation. *Stem Cells Int.* 2018;2018:18179013.
 27. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.* 1988;32:77–88.
 28. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994;53:55–63.
 29. Gama KB, Quintans JS, Antonioli AR, Quintans-Jr LJ, Santana WA, Branco A, et al. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the antinociceptive effect of hecogenin acetate. *J Nat Prod.* 2013;76:559–63.
 30. Geuna S, Tos P, Battiston B, Guglielmo R. Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves. *Ann Anat.* 2000;182:23–34.
 31. Azcoitia I, Leonelli E, Magnaghi V, Veiga S, Garcia-Segura LM, Melcangi RC. Progesterone and its derivatives dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone reduce myelin fiber morphological abnormalities and myelin fiber loss in the sciatic nerve of aged rats. *Neurobiol Aging.* 2003;24:853–60.
 32. Sameni HR, Panahi M, Sarkaki A, Saki GH, Makvandi M. The neuroprotective effects of progesterone on experimental diabetic neuropathy in rats. *Pak J Biol Sci.* 2008;11:1994–2000.
 33. Flattersa SJL, Bennetta GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain.* 2006;122:245–57.
 34. Baptista AF, Goes BT, Menezes D, Gomes FC, Zugaib J, Stipursky J, et al. PEMF fails to enhance nerve regeneration after sciatic nerve crush lesion. *J Peripher Nerv Syst.* 2009;14:285–93.
 35. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101–8.
 36. Tiwari V, Kuhad A, Chopra K. Tocotrienol ameliorates behavioral and biochemical alterations in the rat model of alcoholic neuropathy. *Pain.* 2009; 145:129–35.
 37. Green LC, Wagne DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126:131–8.
 38. Zhou YL, Zhou SZ, Li HL, Hu ML, Li H, Guo QH, et al. Bidirectional modulation between infiltrating CD3+ T-lymphocytes and astrocytes in the spinal cord drives the development of allodynia in monoarthritic rats. *Sci Rep.* 2018;8(1):51.
 39. Bastyr EJ, Price KL, 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.* 2005;27:1278–94.
 40. Obrosova IG. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. *Neurotherapeutics.* 2009;6:638–47.
 41. Siniscalco D, Rossi F, Maione S. Stem cell therapy for neuropathic pain treatment. *J Stem Cells Reg Med.* 2007;3:2–11.
 42. O'Brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR J.* 2014;54:259–72.
 43. Jolivalt CG, Frizzi KE, Guernsey L, Marquez A, Ochoa J, Rodriguez M, et al. Peripheral neuropathy in mouse models of diabetes. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2016;6:223–55.
 44. Lennertz RC, Medler KA, Bain JL, Wright DE, Stucky CL. Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetic neuropathy. *J Neurophysiol.* 2011;106:905–14.
 45. Stevens MJ, Obrosova I, Cao X, Van HC, Greene DA. Effects of DL-alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2000;49:1006–15.
 46. Feldman EL. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin Invest.* 2003;111:431–3.
 47. Pabreja K, Dua K, Sharma S, Padi SS, Kulkarni SK. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2011;661:15–21.
 48. Premkumar LS, Pabbidi RM. Diabetic peripheral neuropathy: role of reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys.* 2013;67:373–83.
 49. Chen C, Chen F, Yao C, Shu S, Feng J, Hu X, et al. Intratecal injection of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorates neuropathic pain in rats. *Neurochem Res.* 2016;41:3250–60.
 50. Watanabe S, Uchida K, Nakajima H, Matsuo H, Sugita D, Yoshida A, et al. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. *Stem Cells.* 2015;33:1902–14.
 51. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1343–74.
 52. Kim WS, Park BS, Kim HK, Park JS, Kim KJ, Choi JS, et al. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci.* 2008;49:133–42.
 53. Whone AL, Kemp K, Sun M, Wilkins A, Scolding NJ. Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* 2012;1431:86–96.
 54. Yalvaç ME, Yarat A, Mercan D, Rizvanov AA, Palotás A, Şahin F. Characterization of the secretome of human tooth germ stem cells (hTGSCs) reveals neuro-protection by fine-tuning micro-environment. *Brain Behav Immun.* 2013;32:122–30.
 55. Li J, Li D, Liu X, Tang S, Wei F. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce systemic inflammation and attenuate LPS-induced acute lung injury in rats. *J Inflamm.* 2012;9:33.
 56. Lin WP, Chen XW, Zhang LQ, Wu CY, Huang ZD, Lin JH. Effect of neuroglobin genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on spinal cord injury in rabbits. *PLoS One.* 2013;8:e63444.
 57. Uccelli A, Milanese M, Principato MC, Morando S, Bonifacino T, Vergani L, et al. Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Med.* 2012;18:794–804.
 58. Obrosova IG. Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7: 1543–52.

59. Talbot S, Chahmi E, Dias JP, Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflamm.* 2010;7:36–51.
60. Echeverry S, Shi XQ, Haw A, Liu H, Zhang ZW, Zhang J. Transforming growth factor- β 1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *Mol Pain.* 2009;5:16.
61. Milligan ED, Penzkover KR, Soderquist RG, Mahoney MJ. Spinal interleukin-10 therapy to treat peripheral neuropathic pain. *Neuromodulation.* 2012;15:520–6.
62. Siniscalco D, Giordano C, Galderisi U, Luongo L, Novellis V, Rossi F, et al. Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice. *Front Integr Neurosci.* 2011;5:79.
63. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol.* 2000;156:1073–83.
64. Liu FT. Galectins: novel anti-inflammatory drug targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2002;6:461–8.
65. Chen CH, Sheu MT, Chen TF, Wang YC, Hou WC, Liu DZ, et al. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:1001–9.
66. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2009;182:1167–73.
67. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol.* 1995;147:1016–28.
68. Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood.* 1998;91:3430–8.
69. Doverhag C, Hedtj rn M, Poirier F, Mallard C, Hagberg H, Karlsson A, et al. Galectin-3 contributes to neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2010;38:36–46.
70. Pajooohesh-Ganji A, Knoblach SM, Faden AI, Byrnes KR. Characterization of inflammatory gene expression and galectin 3 function after spinal cord injury in mice. *Brain Res.* 2012;1475:96–105.
71. Prins CA, Almeida FM, Martinez AMB. Absence of galectin-3 attenuates neuroinflammation improving functional recovery after spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2016;11:92–3.
72. Cantinieaux D, Quertainmont R, Blacher S, Rossi L, Wanet T, No l A, et al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One.* 2013;27(8):e69515.
73. Kay AG, Long G, Tyler G, Stefan A, Broadfoot SJ, Piccinini AM, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces disease severity and immune responses in inflammatory arthritis. *Sci Rep.* 2017;7(1):18019.
74. Cizkova D, Cubinkova V, Smolek T, Murgoci AN, Danko J, Vdoviakova K, et al. Localized intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells conditioned medium improves. Functional recovery in a rat model of spinal cord injury. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):E870.
75. Nazemian V, Manaheji H, Sharifi AM, Zaringhalam J. Long term treatment by mesenchymal stem cells conditioned medium modulates cellular, molecular and behavioral aspects of adjuvant-induced arthritis. *Cell Mol Biol.* 2018;64:19–26.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





● PERSPECTIVE

Cell-free therapy: a neuroregenerative approach to sensory neuropathy?

Stem cells are considered as key therapeutic tools in the field of regenerative medicine. In the last decade, based on a growing body of knowledge about their mechanisms of action, a new way of exploring the therapeutic potential of stem cells without the need for cell transplantation has been evidenced. This approach, called cell-free therapy, uses stem cells as a source of therapeutic molecules rather than the therapeutic agent per se, and several studies have shown relevant therapeutic effects under a variety of experimental conditions, including nervous system disorders.

Sensory neuropathy (SN) is a chronic syndrome resulting from injury or dysfunction of the nervous system, frequently associated with different clinical conditions and diseases, such as cancer, diabetes, chemotherapy, trauma, infection or autoimmune diseases. This syndrome is characterized by the presence of persistent sensory symptoms, such as paresthesia and neuropathic pain, which may ultimately lead to sensory loss. The pharmacological approaches available for the management of SN are palliative, poorly efficacious and devoid of disease-modifying profile. Sensory neuropathies are closely associated with poor quality of life, disability and comorbidities, such as depression and anxiety, thus demanding rehabilitation and psychological support for SN patients. In view of this devastating scenario, the development of new approaches effective in attenuating sensory symptoms and promoting the functional reestablishment of nervous tissue represents a fundamental advance in SN therapeutics.

Based on the analgesic, neuroprotective and pro-regenerative potential of stem cells, cellular therapies have been considered as promising alternatives for the treatment of sensory neuropathies. The initial evidence of the therapeutic effects of stem cells in chronic neuropathies were reported in the first decade of the 2000s, using mesenchymal stem/stromal cells (MSC), an adult multipotent stem cell type. Coronel et al. (2006) showed that MSC selectively migrated to the dorsal root ganglion ipsilateral to the sciatic nerve constriction in a classical animal model of neuropathic pain. One year later, this same group demonstrated that MSC transplantation was able to reduce the behavioral painful neuropathy associated with the sciatic nerve constriction (Musolino et al., 2007), highlighting the analgesic potential of MSC. Since then, several preclinical and clinical studies have demonstrated the consistent and long-lasting analgesic effects of MSC in different types of sensory neuropathies (Huh et al., 2017).

The use of MSC for the treatment of sensory neuropathies represents a new therapeutic concept – the neurorestorative therapy for pain – that can be achieved by associating the analgesic effect of stem cells with their pro-regenerative properties. In this proposal, MSC represents not only an analgesic treatment, but also a way to repair the damaged nervous system. In fact, the regenerative effects of MSC on peripheral nerves during states of chronic neuropathy have been demonstrated (Zhou et al., 2016). In line with this concept, we have recently demonstrated, in a mouse diabetes model, that MSC transplantation reverses the behavioral signs of SN, *i.e.* mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. Importantly, the therapy promoted the reduction of sciatic nerve

ultrastructural alterations, such as degenerative changes in axons and myelin sheath, considered hallmarks of diabetic neuropathy (Evangelista et al., 2018).

It is important to note that both the analgesic and neuroregenerative effects of MSC during neuropathic conditions appear to be associated with their paracrine action. While the analgesic properties of MSC are associated with the endogenous release of opioid peptides in the pain modulatory circuits (Guo et al., 2011), their pro-regenerative effects are related to immunomodulatory, anti-inflammatory, antioxidant, angiogenic and neurotrophic factors, released or induced by the MSC. Shibata et al. (2008) showed that MSC transplantation was effective in normalizing axonal circularity and improving the conduction velocity and blood flow in the sciatic nerve of rats with diabetic neuropathy. These effects were attributed to the MSC-induced beneficial effects to locally released angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. In agreement with this seminal study, the contribution of neurotrophic and angiogenic factors to the therapeutic effects of MSC in chronic neuropathy has been extensively demonstrated (Zhou et al., 2016).

Despite the unequivocal role of primary sensory neurons for the induction and maintenance of neuropathic conditions, numerous biochemical, cellular and functional alterations in the central nervous system have been shown to participate in the pathophysiology of these syndromes (Ji et al., 2013). Nerve injury and the resulting oxidative stress affect the local microenvironment in the spinal cord, promoting activation of glial cells, which are key elements in the development and maintenance of neuropathic pain. The activation signaling pathways involved in the production of inflammatory and hyperalgesic mediators, such as cytokines, chemokines, eicosanoids, glutamate and ATP, can modulate the activity of both glial cells and sensory neurons, triggering a cross-talking phenomenon between these cells which induces and maintains the spinal neuroinflammatory cascade (Ji et al., 2013). In line with this idea, in the chronic diabetic neuropathy model we found the reversion of SN to correlate with a reduced production of neuroinflammatory parameters in the spinal cord of MSC-transplanted mice (Evangelista et al., 2018). Moreover, we observed a reduction in glial fibrillary acidic protein and ionized calcium binding adaptor molecule-1 expression after cell therapy, indicating a suppressive effect of MSC on the spinal activation of astrocytes and microglia. Importantly, transplantation of MSC promoted the reestablishment of redox homeostasis in the spinal cord of neuropathic mice, as shown by the upregulation of antioxidant factors, such as catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and nuclear factor erythroid2-related factor2, and reduction of oxidative stress markers. MSC also modified the pattern of spinal cytokine production in diabetic mice, reduced the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , as well as increased the anti-inflammatory interleukin-10 and tumor growth factor- β levels, indicating a shift on the balance towards anti-inflammatory cytokines caused by MSC. Taken together, this work presented consistent evidence that inhibition of the spinal neuroinflammatory cascade is an important mechanism by which MSC induce therapeutic effects in SN.

Interestingly, we found the therapeutic effects induced by MSC during the diabetic neuropathy to be independent of the presence of transplanted cells at the lesion site, since RT-qPCR analysis showed minimal retention of transplanted

ed MSC in the sciatic nerve, dorsal root ganglion and spinal cord of transplanted mice (Evangelista et al, 2018). This result indicates a secretory action, rather than cell replacement and differentiation, as the mechanism of action of MSC in neuropathic conditions. This hypothesis was reinforced by the demonstration that MSC secretome, *i.e.* soluble factors and extracellular vesicles secreted by MSC, induced a similar effect to MSC transplantation in SN (Evangelista et al., 2018). In fact, in the last decade many of the therapeutic effects of MSC have been shown to arise from the soluble factors and extracellular vesicles secreted by these cells (Kim et al., 2013). This concept has opened new perspectives for the use of MSC as a source of therapeutic molecules rather than as the therapeutic agent per se. This cell-free therapy approach has been validated as a promising concept to extend the therapeutic applicability of stem cells (Kim et al., 2013; Pawitan, 2014).

The secretome of MSC consists of soluble factors and extracellular vesicles that contain biologically active molecules, such as growth factors, cytokines and functional RNAs. When released by MSC, these factors can exert effects on cells of the cell milieu or reach distant organs via the bloodstream, including the central nervous system, depending on the permeability of the blood-brain barrier. Therapeutic effects of cell-free approaches for nervous system disorders have been demonstrated, and are probably due to the control of neuroinflammation (Kim et al., 2013). Thus, the efficacy of cell-free approaches for the control of chronic sensory neuropathies can be predicted. In agreement with this idea, the injection of MSC secretome reduced the SN and reestablished the Th1/Th2 balance in the peripheral nerve, spinal cord and dorsal root ganglion of neuropathic animals (Brini et al., 2017). Data from our laboratory also corroborate the potential of cell-free therapies for the control of chronic sensory neuropathies. Using a well-characterized neuropathy model induced by partial sciatic nerve ligation in mice, we have demonstrated that MSC secretome induces a potent and long-lasting antinociceptive effect, which was equivalent to that obtained by MSC transplantation (Gama et al., 2018). Similarly, a single administration of secretome shifted the cytokine balance towards an anti-inflammatory profile at both the peripheral and central nervous systems. The characterization of MSC secretome by protein array evidenced the presence of growth factors and cytokines relevant to antinociception, neuroregeneration, cellular growth and inflammation. Among the proteins identified in the secretome, hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 are good candidates as key therapeutic factors secreted by MSC, due to their powerful angiogenic and neurotrophic actions (Gama et al., 2018).

In conclusion, the application of cell-free therapy for neurorestorative therapy of pain may represent an innovative strategy that provides pain control, avoiding the inherent limitations of cell transplantation, such as immune rejection and tumorigenic potential. Neuroregenerative effects on peripheral nerves are likely to be achieved by the action, in concert, of angiogenic and neurotrophic molecules present in MSC's secretome. In addition, cell-free products may cross the blood-brain barrier to act on the central nervous system where, by modulating pain and neuroinflammation, they may induce long-lasting analgesia and exhibit a disease-modifying profile. Additional studies, however, should be carried out aiming to validate this hypothesis, as well as characterizing the mechanisms involved in the beneficial effects of cell-free therapy for neuropathy.

Afrânio Ferreira Evangelista, Milena Botelho Pereira Soares, Cristiane Flora Villarreal*

Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil (Evangelista AF, Soares MBP, Villarreal CF)
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil (Evangelista AF, Villarreal CF)

*Correspondence to: Cristiane Flora Villarreal, PhD, cfv@ufba.br.
orcid: 0000-0002-0113-7864 (Cristiane Flora Villarreal)

Received: June 22, 2018

Accepted: January 17, 2019

doi: 10.4103/1673-5374.253522

Copyright license agreement: The Copyright License Agreement has been signed by all authors before publication.

Plagiarism check: Checked twice by iThenticate.

Peer review: Externally peer reviewed.

Open access statement: This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

References

- Brini AT, Amodeo G, Ferreira LM, Milani A, Niada S, Moschetti G, Franchi S, Borsani E, Rodella LF, Panerai AE, Sacerdote P (2017) Therapeutic effect of human adipose-derived stem cells and their secretome in experimental diabetic pain. *Sci Rep* 7:9904.
- Coronel MF, Musolino PL, Villar MJ (2006) Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction. *Neurosci Lett* 405:5-9.
- Evangelista AF, Vannier-Santos MA, de Assis Silva GS, Silva DN, Juiz PJJ, Nonaka CKV, Dos Santos RR, Soares MBP, Villarreal CF (2018) Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades. *J Neuroinflammation* 15:189.
- Gama KB, Santos DS, Evangelista AF, Silva DN, de Alcântara AC, Dos Santos RR, Soares MBP, Villarreal CF (2018) Conditioned medium of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells as a therapeutic approach to neuropathic pain: a preclinical evaluation. *Stem Cells Int* 2018:8179013.
- Guo W, Wang H, Zou S, Gu M, Watanabe M, Wei F, Dubner R, Huang GT, Ren K (2011) Bone marrow stromal cells produce long-term pain relief in rat models of persistent pain. *Stem Cells* 29:1294-1303.
- Huh Y, Ji RR, Chen G (2017) Neuroinflammation, bone marrow stem cells, and chronic pain. *Front Immunol* 8:1014.
- Ji RR, Berta T, Nedergaard M (2013) Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154:S10-28.
- Kim HO, Choi S, Kim H (2013) Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. *J Tissue Eng Regen Med* 10:93-101.
- Musolino PL, Coronel MF, Hökfelt T, Villar MJ (2007) Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. *Neurosci Lett* 418:97-101.
- Pawitan JA (2014) Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int* 2014:965849.
- Shibata T, Naruse K, Kamiya H, Kozakae M, Kondo M, Yasuda Y, Nakamura N, Ota K, Tosaki T, Matsuki T, Nakashima E, Hamada Y, Oiso Y, Nakamura J (2008) Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes* 57:3099-3107.
- Zhou JY, Zhang Z, Qian GS (2016) Mesenchymal stem cells to treat diabetic neuropathy a long and strenuous way from bench to the clinic. *Cell Death Discov* 2:16055.

C-Editors: Zhao M, Li JY; T-Editor: Liu XL

Research Article

Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation

Kelly Barbosa Gama,^{1,2} Dourivaldo Silva Santos,² Afrânio Ferreira Evangelista,¹
Daniela Nascimento Silva,^{1,3} Adriano Costa de Alcântara,³ Ricardo Ribeiro dos Santos,^{3,4}
Milena Botelho Pereira Soares ^{1,3,4} and Cristiane Flora Villarreal ^{1,2}

¹Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão 121, 40296-710 Salvador, BA, Brazil

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Barão de Geremoabo s/n, 40170-290 Salvador, BA, Brazil

³Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Avenida São Rafael 2152, 41253-190 Salvador, BA, Brazil

⁴National Institute of Science and Technology for Regenerative Medicine, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Cristiane Flora Villarreal; cfv@ufba.br

Received 20 April 2017; Accepted 29 November 2017; Published 30 January 2018

Academic Editor: Marc L. Turner

Copyright © 2018 Kelly Barbosa Gama et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Neuropathic pain is a type of chronic pain caused by injury or dysfunction of the nervous system, without effective therapeutic approaches. Mesenchymal stromal cells (MSCs), through their paracrine action, have great potential in the treatment of this syndrome. In the present study, the therapeutic potential of MSC-derived conditioned medium (CM) was investigated in a mouse model of neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation (PSL). PSL mice were treated by endovenous route with bone marrow-derived MSCs (1×10^6), CM, or vehicle. Gabapentin was the reference drug. Twelve hours after administration, neuropathic mice treated with CM exhibited an antinociceptive effect that was maintained throughout the evaluation period. MSCs also induced nonreversed antinociception, while gabapentin induced short-lasting antinociception. The levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 were reduced, while IL-10 was enhanced on sciatic nerve and spinal cord by treatment with CM and MSCs. Preliminary analysis of the CM secretome revealed the presence of growth factors and cytokines likely involved in the antinociception. In conclusion, the CM, similar to injection of live cells, produces a powerful and long-lasting antinociceptive effect on neuropathic pain, which is related with modulatory properties on peripheral and central levels of cytokines involved with the maintenance of this syndrome.

1. Introduction

Neuropathic pain is a progressive nervous system disease initiated by a primary lesion or dysfunction in the nervous system, commonly caused by a trauma, infection, or ischemia. This chronic syndrome is characterized by abnormal sensory symptoms, such as spontaneous pain and an increased response to painful (hyperalgesia) and innocuous (allodynia) stimuli [1–3]. Despite the great morbidity, social cost, and negative impact on quality of life, the neuropathic pain has limited therapeutic options, because the

available analgesic drugs appear to be relatively ineffective in controlling this pain state [4]. Up to now, no drug is available to restore nerve function and the usual therapeutic strategies for neuropathic pain aim only palliative analgesic effects [5].

Thus, the successful control of neuropathic pain is linked to the establishment of new disease-modifying therapeutic approaches. In this context, cell-based therapies represent a promising alternative. Recently, cellular therapies have been considered as a potential successful approach in treating diseases and injuries of the nervous system, for

RESEARCH

Open Access



IGF-1 overexpression improves mesenchymal stem cell survival and promotes neurological recovery after spinal cord injury

Kyan James Allahdadi^{1,5}, Thaís Alves de Santana^{1,3}, Girlaine Café Santos^{1,3}, Carine Machado Azevedo^{1,2}, Roberta Alves Mota^{2,3}, Carolina Kymie Nonaka^{1,2,5}, Daniela Nascimento Silva^{1,2,5}, Clarissa Xavier Resende Valim¹, Cláudio Pereira Figueira², Washington Luis Conrado dos Santos^{2,3}, Renan Fernandes do Espírito Santo^{2,3}, Afrânio Ferreira Evangelista², Cristiane Flora Villarreal^{2,3}, Ricardo Ribeiro dos Santos^{1,4}, Bruno Solano Freitas de Souza^{1,2,4,5} and Milena Botelho Pereira Soares^{1,2,4*}

Abstract

Background: Survival and therapeutic actions of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs) can be limited by the hostile microenvironment present during acute spinal cord injury (SCI). Here, we investigated whether BMMSCs overexpressing insulin-like growth factor 1 (IGF-1), a cytokine involved in neural development and injury repair, improved the therapeutic effects of BMMSCs in SCI.

Methods: Using a SCI contusion model in C57Bl/6 mice, we transplanted IGF-1 overexpressing or wild-type BMMSCs into the lesion site following SCI and evaluated cell survival, proliferation, immunomodulation, oxidative stress, myelination, and functional outcomes.

Results: BMMSC-IGF1 transplantation was associated with increased cell survival and recruitment of endogenous neural progenitor cells compared to BMMSC- or saline-treated controls. Modulation of gene expression of pro- and anti-inflammatory mediators was observed after BMMSC-IGF1 and compared to saline- and BMMSC-treated mice. Treatment with BMMSC-IGF1 restored spinal cord redox homeostasis by upregulating antioxidant defense genes. BMMSC-IGF1 protected against SCI-induced myelin loss, showing more compact myelin 28 days after SCI. Functional analyses demonstrated significant gains in BMS score and gait analysis in BMMSC-IGF1, compared to BMMSC or saline treatment.

Conclusions: Overexpression of IGF-1 in BMMSC resulted in increased cell survival, immunomodulation, myelination, and functional improvements, suggesting that IGF-1 facilitates the regenerative actions of BMMSC in acute SCI.

Keywords: Spinal cord injury, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, IGF-1, Gene and cell therapy

* Correspondence: milena@bahia.fiocruz.br

¹Center for Biotechnology and Cell Therapy, Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil

²Gonçalo Moniz Institute, FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia 40296-710, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Antihypertensive potential of linalool and linalool complexed with β -cyclodextrin: effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity

Samuel Barbosa Camargo¹, Letícia Oliveira Simões¹, Carla Fiana de Azevedo Medeiros¹, Anderson de Melo Jesus¹, Josmara Bartolomei Fregoneze², Afrânio Evangelista³, Cristiane Flora Villarreal³, Adriano Antunes de Souza Araújo⁴, Lucindo José Quintans-Júnior⁴ and Darizy Flavia Silva^{1*}

Affiliation

¹ Laboratory of Cardiovascular Physiology and Pharmacology, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

² Laboratory of Neuroscience, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

³ Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil.

⁴ Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil.

*Corresponding author:

Darizy Flávia Silva, PhD

Laboratory of Cardiovascular Physiology and Pharmacology, Federal University of Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, Vale do Canela, Zip Code: 40110-902 Salvador, Bahia, Brazil.

E-mail address: darizy@gmail.com and darizy.silva@ufba.br (D.F. Silva).

Abstract: Linalool (LIN) is a monoterpene alcohol present in some aromatic medicinal plants with biological activities that can impact cardiovascular diseases. This chemical class is highly volatile and β -cyclodextrin (β -CD) has been employed to improve the pharmacological properties of monoterpenes. Thus, the aim of this study was to evaluate the cardiovascular effects of LIN free focusing on the antihypertensive properties of this monoterpene and to study whether LIN, complexed in β -cyclodextrin (LIN- β CD) is able to improve the pharmacological activity of LIN. Spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomly divided into 5 groups, each treated daily for 21 days, in the following manner: group 1 (vehicle solution); group 2 (captopril; 30 mg/kg/day); group 3 (LIN; 100 mg/kg/day); group 4 (LIN; 50 mg/kg/day) and group 5 (LIN/ β -CD; 50 mg/kg/day). Daily body weight measurements were conducted and mean arterial pressure and heart rate were measured every 5 days. The mesenteric artery from treated animals was tested for phenylephrine and sodium nitroprusside (SNP) sensitivity. The SHR treated with vehicle demonstrated progressive increase in mean arterial pressure and captopril, a positive control, induced a significant decrease. After 21 days of treatment, the blood pressure of the SHR treated by (-)-LIN (100 mg/Kg) was significantly reduced. In addition, various important cardiovascular parameters improved, including: the treatment with LIN prevented the development of cardiac hypertrophy, increased levels of the anti-inflammatory cytokine (IL-10), increased vasodilator responsiveness and reduced sensitivity to the sympathetic agonist. Furthermore, the inclusion complex containing LIN in β -CD produced a higher antihypertensive profile when compared with uncomplexed form. Taking together, our results suggested that LIN shown a potential antihypertensive effect and β -CD may be an important tool to improve the cardiovascular activity of LIN and other water-insoluble compounds.

Keywords: linalool; antihypertensive; monoterpene; anti-inflammatory; vascular reactivity.

CATEGORY

Cardiovascular Pharmacology

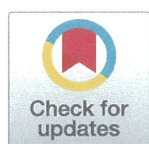
RESEARCH ARTICLE

The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches

Renan Fernandes Espírito-Santo¹, Cassio Santana Meira², Rafael dos Santos Costa¹, Otávio Passos Souza Filho¹, Afranio Ferreira Evangelista², Gustavo Henrique Goulart Trossini³, Glaucio Monteiro Ferreira³, Eudes da Silva Velozo¹, Cristiane Flora Villarreal^{1,2*}, Milena Botelho Pereira Soares^{2,4}

1 Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, **2** Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil, **3** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, Bahia, Brazil

* cfv@ufba.br



OPEN ACCESS

Citation: Espírito-Santo RF, Meira CS, Costa RdS, Souza Filho OP, Evangelista AF, Trossini GHG, et al. (2017) The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches. PLoS ONE 12(6): e0179174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174>

Editor: Zhengqi Wang, Emory University, UNITED STATES

Received: February 12, 2017

Accepted: May 24, 2017

Published: June 8, 2017

Copyright: © 2017 Espírito-Santo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia — FAPESB, grant numbers: DTE 0046/2011 CFV, PNX0009/2009 MBPS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Braylin belongs to the group of natural coumarins, a group of compounds with a wide range of pharmacological properties. Here we characterized the pharmacological properties of braylin *in vitro*, *in silico* and *in vivo* in models of inflammatory/immune responses. In *in vitro* assays, braylin exhibited concentration-dependent suppressive activity on activated macrophages. Braylin (10–40 μM) reduced the production of nitrite, IL-1β, TNF-α and IL-6 by J774 cells or peritoneal exudate macrophages stimulated with LPS and IFN-γ. Molecular docking calculations suggested that braylin present an interaction pose to act as a glucocorticoid receptor ligand. Corroborating this idea, the inhibitory effect of braylin on macrophages was prevented by RU486, a glucocorticoid receptor antagonist. Furthermore, treatment with braylin strongly reduced the NF-κB-dependent transcriptional activity on RAW 264.7 cells. Using the complete Freund's adjuvant (CFA)-induced paw inflammation model in mice, the pharmacological properties of braylin were demonstrated *in vivo*. Braylin (12.5–100 mg/kg) produced dose-related antinociceptive and antiedematogenic effects on CFA model. Braylin did not produce antinociception on the tail flick and hot plate tests in mice, suggesting that braylin-induced antinociception is not a centrally-mediated action. Braylin exhibited immunomodulatory properties on the CFA model, inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines IL-1β, TNF-α and IL-6, while increased the anti-inflammatory cytokine TGF-β. Our results show, for the first time, anti-inflammatory, antinociceptive and immunomodulatory effects of braylin, which possibly act through the glucocorticoid receptor activation and by inhibition of the transcriptional activity of NF-κB. Because braylin is a phosphodiesterase-4 inhibitor, this coumarin could represent an ideal prototype of glucocorticoid receptor ligand, able to induce synergic immunomodulatory effects.