

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Genoveva Lourdes Flores Luna

***EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS SOBRE O MÚSCULO  
ESQUELÉTICO EM MODELO DE DIABETES  
MELLITUS***

São Carlos  
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Genoveva Lourdes Flores Luna**

***EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS SOBRE O MÚSCULO  
ESQUELÉTICO EM MODELO DE DIABETES  
MELLITUS***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

**Orientadora:** Profa<sup>a</sup> Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Bolsista Capes / DS

São Carlos  
2019

Flores Luna, Genoveva Lourdes

EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
SOBRE O MÚSCULO ESQUELÉTICO EM MODELO DE DIABETES  
MELLITUS / Genoveva Lourdes Flores Luna. -- 2019.

78 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos,  
São Carlos

Orientador: Ângela Merice de Oliveira Leal

Banca examinadora: Ângela Merice de Oliveira Leal, Clóvis Wesley  
Oliveira de Souza, Richard Eloin Liebano, Fernanda Oliveira Duarte, Carlos  
Cesar Crestani

Bibliografia

1. Diabetes Mellitus. 2. Músculo Esquelético. 3. Terapia Celula. I.  
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Genoveva Lourdes Flores Luna, realizada em 27/06/2019:

---

Prof. Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal  
UFSCar

---

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza  
UFSCar

---

Prof. Dr. Richard Eloin Liebano  
UFSCar

---

Prof. Dra. Fernanda Oliveira Duarte  
USP

---

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP

*À meu filho Guilherme Caleb, por ser a luz da minha vida, te amo mais que tudo.  
Obrigada por ser paciente ainda que não entendesse o que acontecia, você sempre esteve  
lá, com seu sorriso sincero e com os bracinhos prontos para me acolher. Espero um dia ser  
digna da sua admiração.*

*À meu esposo Ricky, por ser meu companheiro de jornadas e sonhos, obrigada por sempre  
estar presente, por ser paciente e por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava,  
seu amor me fortalece e me anima a seguir em frente.*

*...No te rindas, aun estas a tiempo  
de alcanzar y comenzar de nuevo,  
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,  
liberar el lastre, retomar el vuelo.  
No te rindas que la vida es eso,  
continuar el viaje,  
perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo,  
correr los escombros y destapar el cielo.  
No te rindas, por favor no cedas,  
aunque el frio queme,  
aunque el miedo muerda,  
aunque el sol se esconda y se calle el viento,  
aún hay fuego en tu alma,  
aún hay vida en tus sueños,  
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,  
porque lo has querido y porque te quiero.  
Porque existe el vino y el amor, es cierto,  
porque no hay heridas que no cure el tiempo,  
abrir las puertas quitar los cerrojos,  
abandonar las murallas que te protegieron.  
Vivir la vida y aceptar el reto,  
recuperar la risa, ensayar el canto,  
bajar la guardia y extender las manos,  
desplegar las alas e intentar de nuevo,  
celebrar la vida y retomar los cielos,  
No te rindas por favor no cedas,  
aunque el frio queme,  
aunque el miedo muerda,  
aunque el sol se ponga y se calle el viento,  
aún hay fuego en tu alma,  
aún hay vida en tus sueños,  
porque cada dia es un comienzo,  
porque esta es la hora y el mejor momento,  
porque no estás sola,  
porque yo te quiero.  
...**Mario Benedetti***

# Agradecimentos

À Deus, por ter me guiado, protegido e dado força para enfrentar todas as dificuldades e desafios desta caminhada.

À meu esposo Ricky e meu filho Guilherme, por terem me dado um apoio fundamental para que eu concluísse esse trabalho. Vocês serão sempre a parte mais importante da minha vida!!! Foi com vocês que aprendi a amar. Obrigada por serem pacientes nos meus piores momentos e por ficarem felizes com minhas conquistas, tudo isso é por vocês e para vocês.

Aos meus pais, Consuelo e Hermes, e a minha irmã Dorita, que mesmo de longe me incentivaram e, vieram desde o Peru para me ajudar durante esse processo. Amo vocês! Obrigada por serem minha inspiração e força.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal por me acolher e mostrar, com experiência e leveza, os caminhos da carreira acadêmica.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, por ter me proporcionado tanto aprendizado ao longo da nossa convivência no Laboratório de Inflamação e Doenças infecciosas (LIDI). Agradeço pelos conselhos e amizade.

Ao Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo, pelas orientações, incentivo e amizade. Agradeço por não ter me deixado desistir e me acolher no seu laboratório.

À técnica do Departamento de Fisioterapia, Sra. Teresa Fatori por ter me ouvido sempre que precisei e por todo o suporte que me deu durante estes anos.

À técnica do Departamento de Medicina, Msc. Stella Maris por tudo o suporte e principalmente pela amizade.

Aos meus amigos: Bianca, Carla e Rafael e nosso grupo “URUCUM” por terem sido muito mais que amigos, vocês se tornaram minha família no Brasil. A cada um de vocês eu tenho uma gratidão especial, vocês ficaram quando tudo mundo foi embora, minha rede de apoio sem fim. Com vocês aprendi que família não são aqueles que compartilhem seu mesmo sangue e sim aqueles que você guarda no coração.

À minha amiga e comadre Paulinha, obrigada pela amizade, carinho e por ser minha rede de apoio não só com Guilherme e sim um porto seguro nas nossas vidas, obrigada por sempre estar aí para nós!

Às amigas Patrícia e Ana Laura, por toda a ajuda nesse trabalho e principalmente pela amizade, pelas risadas e os cafés.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Neurológica (LaFiN) em

especial a duas grandes amigas que ganhei nesse convívio, Gabriela e Yisel, obrigada por fazer mais leve e alegre essa caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Doenças infecciosas (LIDI), pelo companheirismo e acolhida durante estes anos.

Aos membros da coordenação da pós-graduação em Biotecnologia, em especial a Profa. Dra. Cristina de Paiva Sousa e a secretária do programa Sra. Cláudia Patega de Toledo, pelo suporte e ajuda durante todo meu doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter me concedido a Bolsa de Doutorado, fundamentais para que eu pudesse ter dedicação exclusiva a este trabalho.

# Resumo

**Objetivo do estudo:** O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do transplante de células mesenquimais do estroma (MSCs) na função motora e na organização do colágeno em ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1). **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar machos foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: Controle (C), Diabético (DM) e Diabético tratados com MSCs (DM-MSCs). O DM1 foi induzido por Streptozotocina (50 mg/kg). As MSCs foram isoladas da medula óssea da tíbia e fêmur. Passadas 10 semanas da indução de DM1, os ratos DM-MSC receberam 4 injeções intraperitoneais de MSCs ( $1 \times 10^6$ ), uma vez por semana. Antes e 10 semanas após o transplante de MSCs, o desempenho motor foi avaliado pelo teste de Rota Rod e os músculos tibiais anteriores (TA) foram coletados para morfometria e quantificação da birrefringência de colágeno pela análise de microscopia de polarização. **Resultados:** O desempenho motor do grupo DM foi significativamente reduzido quando comparado ao grupo C e aumentou significativamente no grupo DM + MSCs. A massa muscular e a área transversal da fibra muscular foram significativamente menores nos grupos DM e DM + MSC em comparação ao grupo C. O tecido conjuntivo aumentou no grupo DM em relação ao grupo C e diminuiu no grupo DM + MSCs. A porcentagem de birrefringência de colágeno quantificada no tecido conjuntivo do músculo TA diminuiu significativamente no grupo DM em relação ao grupo C e aumentou no grupo DM + MSCs. O desempenho motor correlacionou-se positivamente com a birrefringência do colágeno e negativamente com a porcentagem de tecido conjuntivo. **Conclusão** Os resultados indicam que o transplante de MSC aumentou o desempenho motor e a organização macromolecular de colágeno no músculo esquelético no DM tipo 1.

**Palavras-Chave:** Diabetes Mellitus. Músculo Esquelético. Terapia Celular. Matriz Extracelular. Colágeno.

# Abstract

**Aim of the Study:** The present study aimed to evaluate the effects of Mesenchymal Stromal Cell (MSCs) transplantation on motor function and collagen organization in type 1 diabetes mellitus rat skeletal muscles. **Materials and Methods:** Male Wistar rats were randomly assigned to 3 groups: Control (C), Diabetic (DM) and Diabetic treated with MSCs (DM-MSCs). Diabetes was induced by Streptozotocin (50 mg/kg). The MSCs were isolated from tibia and femur bone marrows. Ten weeks after DM induction, DM-MSC group received 4 weekly i.p. injections of MSCs ( $1 \times 10^6$ ). Ten weeks after MSC transplantation, motor performance was evaluated by the Rota Rod test and the anterior tibial (TA) muscles were collected for morphometric analysis and quantification of collagen by birefringence by polarizing microscopy analysis. **Results:** Motor performance of the DM group was significantly reduced when compared to the C group and increased significantly in the DM + MSCs group. The TA muscle mass and the muscle fiber cross sectional area were significantly reduced in the DM and DM + MSCs groups compared to the C group. The connective tissue increased in the DM group compared to the C group and decreased in the DM + MSCs group. The percentage of collagen birefringence of the connective tissue of the TA muscle decreased significantly in the DM group when compared to the C group and increased in the DM + MSCs group. Motor performance was positively correlated with collagen birefringence and negatively correlated with percentage of connective tissue. **Conclusions:** The results indicate that MSCs transplantation improves both motor function and the collagen macromolecular organization of skeletal muscle in type 1 DM.

**Keywords:** Diabetes Mellitus. Skeletal Muscle. Cellular therapy. Extracellular Matrix. Collagen.

# Lista de ilustrações

Figura 1 – Estrutura do músculo esquelético . . . . .	22
Figura 2 – Rotas patogênicas resultantes da hiperglicemia no DM . . . . .	25
Figura 3 – Hierarquia celular durante o desenvolvimento e miogênese adulta. . . . .	28
Figura 4 – Impacto do Diabetes Mellitus na saúde do Músculo Esquelético . . . . .	31
Figura 5 – Pirâmide Hierárquica das células tronco de acordo a seu potencial de diferenciação . . . . .	32
Figura 6 – Processo Mesengênico . . . . .	34
Figura 7 – Desenho Experimental. . . . .	39
Figura 8 – Desempenho motor. . . . .	46
Figura 9 – Aspecto morfológico das MSCs de rato Wistar (quinta passagem). . . . .	46
Figura 10 – Caracterização imunofenotípica da amostra de MSCs isolada de medula óssea de ratos Wistar. . . . .	48
Figura 11 – MSCs derivadas de medula óssea isoladas de ratos Wistar. . . . .	49
Figura 12 – Análise morfológica do músculo TA (A-G). . . . .	51
Figura 13 – Densidade do tecido conjuntivo. . . . .	51
Figura 14 – Birrefringência das fibras de colágeno no tecido conjuntivo TA. . . . .	52
Figura 15 – Fotomicrografias representativas da imunoexpressão do colágeno I. . . . .	53
Figura 16 – Fotomicrografias representativas da imunoexpressão do colágeno III. . . . .	54
Figura 17 – Análise de correlação. . . . .	55
Figura 18 – Vista superior e lateral da Câmara de Neubauer. . . . .	71
Figura 19 – Grid de contagem. Em destaque, a visão de um quadrado grande. . . . .	72
Figura 20 – Diferenciação de células a serem contadas de outras que não devem ser contadas. . . . .	73

# Lista de tabelas

Tabela 1 – Massa corporal (g) e glicemia de jejum (mg/dL) pré-DM, pré infusão de MSCs e pré eutanásia de animais do Grupo Controle (C), Diabetes Mellitus (DM) e Diabético tratado com MSCs (DM+MSCs). . . . .	45
Tabela 2 – Porcentagens dos marcadores positivos e negativos que estabelecem que as células-tronco cultivadas sejam mesenquimais . . . . .	47
Tabela 3 – Área de secção transversa (AST) fibra muscular ( $\mu m^2/g$ massa corporal), percentual de tecido conjuntivo muscular e número de fibras musculares no grupo controle (C), grupo Diabetes Mellitus (DM) e grupo Diabetes Mellitus + Infusion ( DM + MSCs). . . . .	50

# Lista de abreviaturas e siglas

ADA	American Diabetes Association
AGE	glicosilação avançada
ANOVA	Análise de variância
AST	Área de Secção Transversa
ATP	adenosina trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
C	Grupo controle
CD	Grupamento de diferenciação
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
COL I	colágeno I
COL II	colágeno III
CTM	células tronco mesenquimais multipotentes
DAG	Diacilglicerol
DG	Diabetes Gestacional
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus 1
DM2	Diabetes mellitus 2
DM + MSCs	Grupo Diabetes mellitus com infusão de MSCs
EDL	músculos extensor digital longo
EGF	fator de crescimento epidérmico
EROS	espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FGF	fator de crescimento de fibroblastos

FITC	fluorocromos isotiocianato de fluoresceína
FL2	fluorescência 2
GDF	fator de diferenciação e crescimento 8
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HE	hematoxilina e eosina
IDF	International Diabetes Federation
IGF	insulin like growth factor
IgG	imunoglobulina G
IL-4,6,10	interleucina 4,6,10
IMCT	tecido conjuntivo intramuscular
JNM	junção neuromuscular
K	Potássio
MEC	Matriz extracelular
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
min	minutos
MMP	metaloproteinases de matriz
MSCs	Células tronco mesenquimais (do inglês mesenchymal stem cells)
n	número
Na	Sódio
NADP+	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NAPDH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
ND	Neuropatia Diabética
NGF	nerve growth fator
NF- $\kappa$ B	factor nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NT	neutrófila

°C	Graus Celsius
O <sub>2</sub>	oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	ficoeritrina
PKC	proteína quinase C
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
SEM	desvio médio
SO	músculo sóleo
SP	São Paulo
STZ	estreptozotocina
TA	tibial anterior
TCIM	tecido conjuntivo intramuscular
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
TIMPs	inibidor de metaloproteinase
TNF	fator de necrose tumoral
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
USP	Universidade de São Paulo
Zn <sup>2+</sup>	ion zinco

# Sumário

<b>Introdução</b>	<b>18</b>
<b>1 Contextualização</b>	<b>19</b>
1.1 DIABETES MELLITUS	19
1.2 NEUROPATIA DIABÉTICA	20
1.3 MÚSCULO ESQUELÉTICO	22
1.3.1 Estrutura e Fisiologia	22
1.3.2 Tecido Conjuntivo Intramuscular e Matriz Extracelular	23
1.3.3 Funções do Colágeno no Músculo Esquelético	25
1.3.3.1 Birrefringência do Colágeno	26
1.3.4 Células Tronco Musculares: Células Satélites	27
1.4 ALTERAÇÕES MUSCULARES NO DM	29
1.4.1 Alterações das Células Satélites no DM1	30
1.5 CÉLULA TRONCO	31
1.5.1 Células Estromal Mesenquimal Multipotente	33
1.5.2 Aplicações Terapêuticas das MSCs	35
<b>2 Objetivos</b>	<b>37</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>3 Material e Métodos</b>	<b>38</b>
3.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	38
3.2 INDUÇÃO DO DM	38
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	39
3.4 TESTE FUNCIONAL: TESTE ROTA ROD	39
3.5 ISOLAMENTO, CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DAS MSCS DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS	40
3.5.1 Isolamentos das MSCs	40
3.5.2 Cultivo Celular	40
3.5.3 Infusão de CTMs	41
3.5.4 Caracterização Imunofenotípica	41
3.5.5 Diferenciação Celular	41
3.6 COLETA DE TECIDOS	42
3.7 ANÁLISE MUSCULAR	42
3.7.1 Análise Morfométrica	42
3.7.2 Análises do Tecido Conjuntivo	43
3.7.3 Análises de % de Birrefringência de Colágeno por Microscopia de Polarização	43

3.8	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA (IH)	43
3.9	ANÁLISE DOS DADOS	44
3.9.1	Análises da intensidade dos pixels para IH e % de birrefringência	44
3.9.2	Análise Estatística	44
<b>4</b>	<b>Resultados</b>	<b>45</b>
4.1	GLICEMIA E PESO CORPORAL TOTAL	45
4.2	DESEMPENHO MOTOR: TESTE ROTA ROD	45
4.3	ESTABELECIMENTOS DE CULTURAS DE MSCS DE RATO WISTAR DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA	46
4.4	CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSCS)	47
4.5	DIFERENCIAÇÃO CELULAR	49
4.6	ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	50
4.6.1	Pesos dos músculos	50
4.6.2	Áreas de Secção Transversa (AST)	50
4.6.3	Análise do Tecido Conjuntivo	51
4.7	ANÁLISE DE BIRREFRINGÊNCIA	52
4.8	ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS	52
4.8.1	Imunoexpressão do Colágeno I	52
4.8.2	Imunoexpressão do Colágeno III	53
4.9	ANÁLISES DE CORRELAÇÃO	54
<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>61</b>
	<b>Anexos</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXO A Preparo de Soluções</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXO B Contagem de células utilizando a câmara de Neubauer (hemacitômetro)</b>	<b>71</b>
	<b>ANEXO C Descongelamento de células</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXO D Cultivo de células</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO E Congelamento de células</b>	<b>78</b>

# INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia e causado por resistência à insulina, disfunção secretória ou diminuição das células  $\beta$  pancreáticas. O desenvolvimento da hiperglicemia crônica está associado a sérios danos teciduais, que a longo prazo resultam em disfunções significativas, como insuficiência de órgãos e tecidos (CRUZ et al., 2013; KHALIL et al., 2012). Dentre as complicações crônicas do DM, estão as alterações encontradas no músculo esquelético, que seguem associadas a perda de peso corporal (PEPATO et al., 1996; UMEGAKI, 2016) hiperglicemia e perda de massa muscular (CHONKAR et al., 2006; ZHANG; CHEN; FAN, 2007).

As múltiplas alterações funcionais e teciduais observadas no DM estão relacionadas à incorporação de glicose nas proteínas intracelulares e proteínas da MEC. Entre os componentes proteicos existentes na MEC, o colágeno é o mais afetado devido à glicosilação não enzimática (BISHARA et al., 2002; MENTINK et al., 2002). A estrutura macromolecular do colágeno tem sido estudada em diferentes tecidos, incluindo tendões, devido à sua birrefringência especial de anisotropia (VIDAL; DE CARVALHO, 1990; VIDAL; MELLO, 2010). No entanto, as propriedades do colágeno no músculo esquelético ainda são pouco estudadas. Diferentes estratégias terapêuticas vêm sendo propostas, porém nenhuma obteve o sucesso adequado na prevenção do acometimento desencadeado a longo prazo pela DM1, e por isso a busca de abordagens alternativas, como o uso de células-tronco (SENA et al., 2010) é crescente nos dias atuais.

As células tronco mesenquimais multipotentes (CTM/MSCs) podem ser definidas pela sua capacidade de se diferenciar em uma variedade de tecidos mesenquimais (tecido adiposo, cartilagem e osso) (ABDALLAH; KASSEM, 2008)(CAPLAN, 2007). Além disso, o uso de MSCs é uma estratégia terapêutica relevante capaz de modificar o microambiente de tecidos lesionados contribuindo para a reparação e regeneração dos tecidos (LEMISCHKA, 2005), bem como para a melhora do perfil metabólico em modelos de animais diabéticos (HAN; SIN; YOON, 2013; SHIBATA et al., 2008). Existem poucas evidências sobre os efeitos das MSCs sobre a disfunção muscular causada pelo DM, porém Sabadine e colaboradores (2018) demonstraram que o transplante de MSCs melhorou o desempenho motor na marcha e diminuiu a fibrose muscular através da modulação dos atrogenes (SABADINE et al., 2018). No entanto, a relação entre a função motora e a organização das fibras de colágeno muscular não foi intrinsecamente investigada.

Assim, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos da infusão de MSCs sobre a função motora e a organização do colágeno em modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 em ratos.

# 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

## 1.1 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus (DM) é um importante problema de saúde pública, devido à elevada prevalência, morbimortalidade e custos sociais e econômicos, decorrentes de suas complicações crônicas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o DM pode ser considerado uma epidemia mundial no século XXI.

Atualmente, no mundo, 285 milhões de pessoas adultas são diabéticas e em 2030 é previsto um aumento de 7,7% com 439 milhões de adultos diabéticos e estimativa de gastos em torno de US\$ 490 bilhões. Dentre os fatores que levarão a esse aumento no número de pessoas diabéticas estão o crescimento e o envelhecimento populacionais, assim como a urbanização, associados a mudanças no estilo de vida. Estima-se ainda que esse aumento será maior em países em desenvolvimento, 69% de aumento de adultos diabéticos, enquanto países desenvolvidos sofrerão um aumento de 20% (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). Mais de 80% das pessoas com diabetes vivem em países de baixa e média renda, sendo que apenas 20% das despesas de saúde são gastas nestes países, demonstrando enormes disparidades e falta de políticas públicas para a saúde coletiva. (IDF, 2012).

Em 2017, o *International Diabetes Federation* (IDF) determinou que a prevalência de diabetes no Brasil é de 15,8% da população na faixa etária 20-79 anos e o número de óbitos relacionados ao diabetes foi de aproximadamente 130.700, totalizando 4 milhões de óbitos no mundo (IDF, 2017). Segundo o Ministério da Saúde, o DM é a principal causa de internações por complicações como doença cardiovascular, diálise por insuficiência renal crônica e amputações de membros inferiores (OMS, 2013). Neste contexto, o DM juntamente à hipertensão, são doenças com maior índice de mortalidade no Brasil (OMS, 2013), sendo classificado em 4º lugar no ranking geral de adultos na faixa etária de 20-79 anos e em 3º lugar no ranking geral de crianças e adolescentes com DM1 de faixa etária menor que 20 anos (IDF, 2017).

O DM faz parte de um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção, produção e/ou resistência tecidual à insulina. A hiperglicemia crônica no diabetes está associada a danos de longo prazo referentes à disfunção e falência de vários órgãos e tecidos especialmente olhos, rins, nervos, vasos sanguíneos, músculos cardíaco e esquelético.

Com base em sua etiologia, o DM é classificado em dois tipos principais, o diabetes tipo 1 (DM1), condição em que as células  $\beta$  do pâncreas não produzem ou produzem pouca insulina por destruição auto-imune e, o diabetes tipo 2 (DM2) caracterizado por

deficiência de secreção das células  $\beta$  e/ou resistência à insulina nos tecidos periféricos (FERREIRA; FAZAN, 2006) e por aumento da demanda metabólica. Há ainda o diabetes gestacional (DG) e outros tipos específicos de DM (SBD, 2015).

O aumento acelerado de indivíduos com DM e a pouca adesão aos tratamentos disponíveis são fatores importantes no aumento da mortalidade e incapacidade precoce. Só nos Estados Unidos, o DM é a principal causa de cegueira em adultos em idade produtiva, além de doenças renais e amputações não traumáticas. O DM contribui para o aumento de 7 vezes o risco de doenças cardíacas, cerebrais e vasculares. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.,2011).

Diferentes estudos relatam que a maioria das complicações do DM pode ser prevenida ou retardada com controle da hiperglicemia e de outros fatores de risco. Um fator importante a se considerar, é o momento em que se inicia a terapia, pois a evolução clínica dependerá da descoberta precoce e início do tratamento (GOLDMAN, AUSIELLO, 2004).

## 1.2 NEUROPATIA DIABÉTICA

A Neuropatia diabética (ND) é a complicação crônica mais frequente do diabetes, afetando o indivíduo tanto do ponto de vista físico-orgânico quanto psicossocial, levando a uma evidente queda de sua qualidade de vida. A ND atinge mais de 66% dos indivíduos DM1 e 59% dos DM2 (GANDHI et al., 2010). Esta complicação atinge o sistema nervoso autônomo (SNA) e o sistema nervoso somático desta forma, contribui para as altas taxas de morbidade e mortalidade da doença. A metade da população mundial que sofre com o DM desenvolve quadros de ND (TESFAYE et al., 2010).

Inicialmente, sua severidade não está diretamente representada pelos sinais e sintomas desenvolvidos pelos pacientes, já que quase nunca é detectada até que os sintomas clínicos apareçam, mas quando isto ocorre, danos irreversíveis nos nervos já ocorreram. Pacientes diabéticos desenvolvem vários sintomas de ND como dor espontânea, hiperalgesia e sensibilidade diminuída, além de transtornos tróficos da pele e da estrutura osteoarticular do pé, com propensão a desenvolver o chamado “pé diabético”, seguido ou não de lesões ulcerativas traumáticas nos pés, podendo progredir para amputação do membro (SACCO et al, 2007; Kim et al., 2011; JEONG et al., 2009).

A detecção e identificação precoce do processo neuropático é muito importante, pois estes oferecem uma oportunidade decisiva para o diabético, afim de que ele procure fazer o controle glicêmico e certificar-se de cuidados com seus pés antes que a morbidade se estabeleça. Os movimentos mais afetados são flexão, inversão e reversão do tornozelo e movimentos da primeira articulação metatarso falangeana. A atrofia muscular observada nos pacientes com neuropatia diabética pode causar deformidades, diminuição da amplitude de movimento do pé e tornozelo, sendo os nervos sural e o fibular os primeiros a serem

acometidos no decorrer da progressão da neuropatia diabética (SACCO et al., 2007).

Dos indivíduos que desenvolvem a ND, a hiperglicemia é fator fisiopatológico mais importante. A hiperglicemia constante leva ao acúmulo de produtos metabólicos da via dos polióis (como sorbitol e frutose) nos nervos, causando lesões através de um mecanismo ainda não muito bem conhecido. (VINIK et al., 2000; MALIK et al., 2006). Outro mecanismo sugerido é o da insuficiência microvascular, devido à ocorrência de isquemia absoluta ou relativa dos vasos do endoneuro ou epineuro, aumento da resistência vascular e diminuição da tensão de O<sub>2</sub> de nervos (GAGLIARDI, 2003; MALIK, et al., 2006). Estudos histopatológicos confirmam achados de alterações microvasculares e espessamento da membrana basal, e estudos funcionais demonstram diminuição de fluxo sanguíneo, aumento da resistência periférica e alterações da permeabilidade vascular (GAGLIARDI, 2003). Numerosas anormalidades microvasculares endoneurais têm sido observadas, incluindo espessamento e duplicação da membrana basal, edema e proliferação da célula endotelial, proliferação da célula muscular lisa intimal e trombo plaquetário oclusivo. Os mecanismos que geram tais alterações provavelmente são os mesmos que afetam as fibras nervosas diretamente, porém o grau de implicação dessas alterações sobre a gênese da neuropatia periférica permanece desconhecido. Também não é bem conhecido o efeito da perda da inervação vascular autonômica sobre o fluxo sanguíneo do nervo (DIAS; CARNEIRO, 2000).

Além dos fatores metabólicos, vasculares e imunológicos, outro mecanismo possivelmente envolvido na fisiopatologia da neuropatia diabética é a perda de neurotrofismo. A insulina, o fator de crescimento similar à insulina (insulin like growth factor, IGF) e outros fatores de crescimento neural (nerve growth factor, NGF) são capazes de fornecer importantes suportes neurotróficos aos neurônios sensitivos, motores e autonômicos. A presença de receptores para IGF foi demonstrada em neurônios, células de Schwann e gânglios. Os IGF e as proteínas ligantes de IGF, essenciais à sua atividade biológica normal, são regulados pela insulina e pelo nível glicêmico. Assim, uma das consequências da diminuição de insulina é a redução no nível de IGF-1 (VINIK, 1999). Aplicações repetidas de insulina, dieta, drogas orais e frequente monitoramento dos níveis de glicose no sangue, fazem parte da terapia convencional do DM e ajudam no restabelecimento do controle metabólico, entretanto não impedem a progressão da ND em longo prazo (ORLOFF et al., 1990). A degeneração e a regeneração de fibras nervosas, principalmente de menor calibre, estão presentes simultaneamente, sugerindo um processo altamente dinâmico, que com o passar dos anos é alterado prevalecendo o processo degenerativo.

## 1.3 MÚSCULO ESQUELÉTICO

### 1.3.1 Estrutura e Fisiologia

O tecido muscular esquelético representa entre 40 a 50% do peso corporal total dos indivíduos e, além das funções clássicas de locomoção e sustentação, este tecido tem um papel metabólico primordial para homeostasia corporal (YUSUF, F; BRAND-SABERI, 2012).

As fibras musculares, conhecidas também como miócitos, são as unidades celulares contráteis principais do músculo. Para formar estas unidades, diversas células mioprogenitoras se fundem (exibindo vários núcleos periféricos) possuindo elevada capacidade de síntese de proteínas contráteis, formando assim as miofibrilas (FRONTERA; OCHALA, 2015; SHENKMAN et al., 2010).

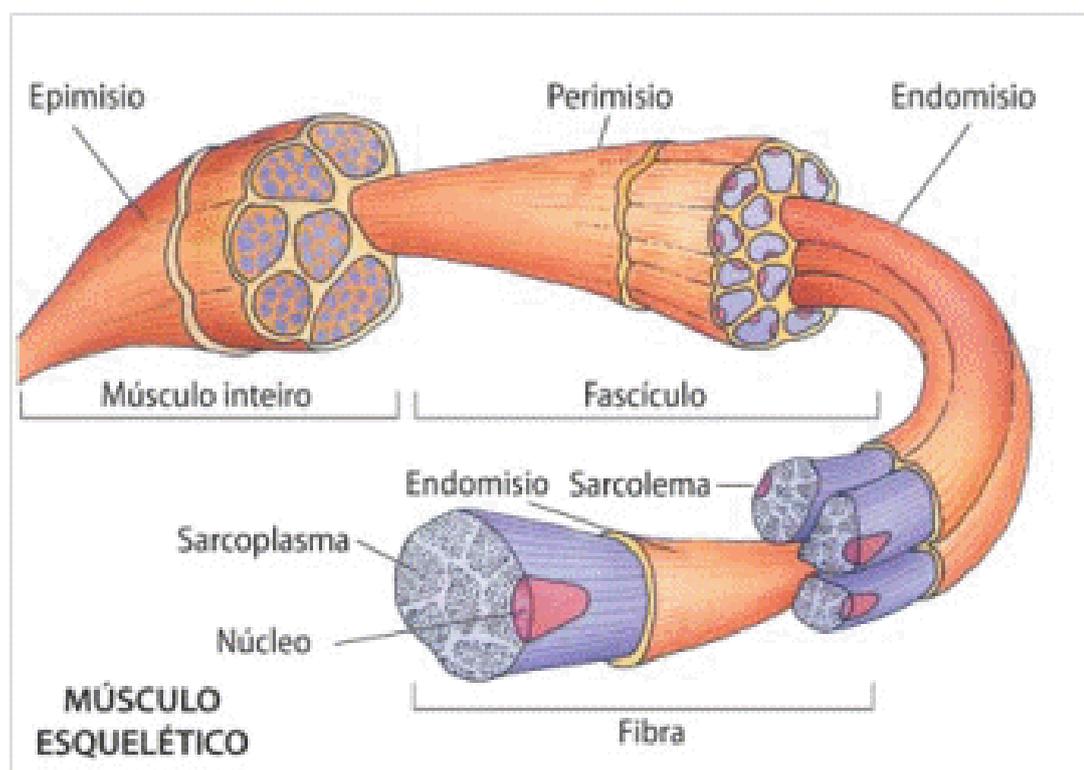


Figura 1 – Estrutura do músculo esquelético.

Fonte: <<http://www.museuescola.ibb.unesp.br/subtopico.php?id=2&pag=2&num=3&sub=20>>. Acesso em 14 de maio 2019.

O músculo esquelético é constituído por fibras recobertas de tecido conjuntivo fibroso chamado endomísio. Estas fibras são agrupadas por um segundo tecido conjuntivo chamado de perimísio, que desta maneira formam fascículos de fibras. A organização deste tecido termina com o agrupamento de fascículos rodeados de um denso tecido conjuntivo chamado de epimísio (LIEBER, 2002). Figura 1.

As fibras musculares são classificadas em dois tipos principais, I e II, diferenciadas pela velocidade de contração e o tipo de processo fisiológico no qual participam. As fibras do tipo I são de contração lenta e geram energia através de processos aeróbicos, apresentando maior número de mitocôndrias; tem baixa capacidade de contração e de geração de força. As fibras de tipo II são de contração rápida e obtém energia de processos anaeróbicos, tem grande capacidade de gerar força, um número reduzido de mitocôndrias e mioglobina (LIEBER, 2002).

O músculo esquelético é o segundo principal órgão dependente de glicose, atrás somente do cérebro e, precisa de insulina para a captação da glicose sanguínea. Com isso, são capazes de converter energia química em movimento e força, variando de atividades rápidas e intensas a atividades de trabalho contínuo e de baixa intensidade (BERCHTOLD et al., 2000; HOOD, 2001; PETTE, 2002). A insulina é um potente estimulador do transporte de glicose para o músculo (HIGAKI et al., 2001) sendo suas ações influenciadas pelo tipo de fibra muscular (HICKEY et al., 1995). Os músculos em animais diabéticos com predominância de fibras lentas (tipo I) exibem maior sensibilidade à insulina e maior captação de glicose do que músculos com predomínio de fibras rápidas (tipo II) (SNOW; THOMPSON, 2009).

As fibras musculares possuem capacidade adaptativa denominada plasticidade muscular e, por isso conseguem alterar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com os estímulos a que são submetidas, o que reflete muitas vezes na quantidade e/ou qualidade de proteínas diversificadas presentes no músculo (BALDWIN; HADDAD, 2001; PETTE, 2002).

### 1.3.2 Tecido Conjuntivo Intramuscular e Matriz Extracelular.

Como já descrito na secção anterior, a fibra muscular se encontra rodeada por inúmeras camadas de tecido conjuntivo (epimísio, perimísio e endomísio) denominado também de tecido conjuntivo intramuscular (TCIM). Entre os principais componentes do tecido conjuntivo encontramos os colágenos tipos I e III, considerados as principais espécies de colágeno fibroso, e o colágeno tipo IV presente na membrana basal imediatamente fora da membrana plasmática do sarcolema (PURSLOW, 2002).

O TCIM exhibe diferenças na distribuição, quantidades e composição, entre os tipos de músculos existentes e, ainda, nos estágios de maturidade do mesmo músculo. Uma das principais funções do TCIM, além do suporte mecânico para nervos e vasos sanguíneos, são as interações das células musculares e a matriz extracelular (MEC) essenciais no desenvolvimento e crescimento muscular (TAKALA; VIRTANEN, 2000).

O desenvolvimento muscular envolve processos de migração, proliferação, diferenciação dos mioblastos, resultando em hipertrofia. Além dos fatores intracelulares como Myo-D

(Myoblast determination protein 1), Myf-5 (Myogenic factor 5) e miogenina, a MEC tem claramente um papel muito importante, já que diversas proteínas da matriz extracelular fazem parte do mecanismo de sinalização envolvido na miogênese. Componentes da MEC fornecem informações químicas e topográficas às células que entram em contato com a matriz. Uma das interações mais importantes que acontecem na MEC são as interações de mioblastos com laminina, colágeno I e fibronectina que envolvem a presença de estruturas de adesão focal na superfície celular (HORNBERGER et al., 2000; VELLEMAN, S.G., COY, C.S., GANNON, L., WICK, M.; D.C., 2000).

Na diferenciação das células musculares, os efeitos químicos da MEC são bem conhecidos, mas recentemente tem-se sugerido que a orientação e o arranjo dos componentes fibrosos da MEC como o colágeno, podem guiar e alinhar os mioblastos em proliferação e determinar a estrutura das fibras musculares numa forma geral. Dessa maneira, variações sutis no conteúdo do TCIM, são fatores importantes no desenvolvimento dos músculos e no desempenho de diferentes papéis mecânicos (ARNESEN et al., 2004).

No modelo de DM1, outros fatores influenciados pelo aumento de níveis de glicose são os fatores de crescimento e o sistema de controle da atividade das proteases.

O papel importante de fatores de crescimento na patogênese de complicações diabéticas, em longo prazo, foi sugerido pelo seu aumento em tecidos alvo (YAMAMOTO et al 1993; Tikellis et al 2004; Roestenberg et al 2006; Umezono et al 2006). Desta forma, o aumento da síntese e a diminuição da degradação levam a um acúmulo da matriz extracelular. (Figura 2.)

Esse acúmulo de matriz extracelular (MEC) chama-se fibrose. Em circunstâncias normais, a MEC sofre síntese contínua e degradação, sendo o balanço entre estes dois processos um requisito para a estrutura e função normais de órgãos e tecidos (Tyagi et al 1995). Os fatores que regulam a formação de MEC incluem várias formas de fator de crescimento, tais como, TGF- $\beta$  (MCCLAIN et al 1992; KOLM et al 1996; Riser et al 1998), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (QI et al 2005). (Figura 2.)

As enzimas responsáveis pela degradação e remodelação da MEC, incluem as metaloproteinases (MMPs) (MCLENNAN et al 1998, 2000; MORTE et al, 2003) e proteases de serina (Geiger et al, 1988), bem como os seus respectivos inibidores teciduais, as TIMPs (NAKAMURA et al, 1994; GOMEZ et al 1997). (Figura 2.)

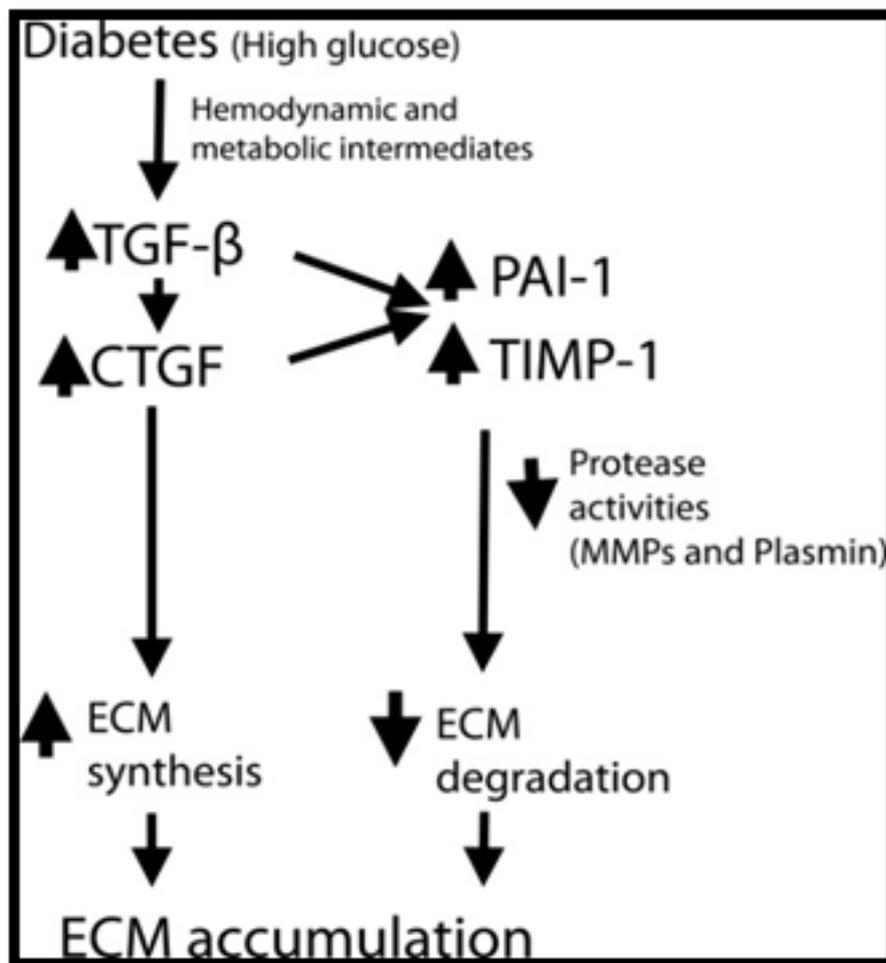


Figura 2 – Rotas patológicas resultantes da hiperglicemia no DM.

Fonte: Bang, Twigg., 2006.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são da família de enzimas proteolíticas zinco-dependentes que podem ser sintetizadas e secretadas por células presentes no músculo esquelético (células satélites e fibroblastos) e, também, por células de Schwann e axônios (CARMELI et al., 2004) e, tem um papel importante na degradação e reorganização da MEC (SCHOSER & BLOTTNER, 1999; AHTIKOSKI et al., 2004; DEMESTRE et al., 2005; RUSSO et al., 2008).

### 1.3.3 Funções do Colágeno no Músculo Esquelético

O colágeno constitui a maior classe de proteínas fibrosas insolúveis da matriz extracelular presentes nos tecidos conectivos. Esta proteína é constituída por cadeias polipeptídicas idênticas (homotrímeros) ou diferentes (heterotrímeros), que são secretados na forma de precursores denominados de procolágenos. Por sua vez, a biossíntese é caracterizada pela presença de um grande número de modificações pós-transduccionais no polipeptídeo. Dentre as principais modificações encontradas, destacam-se a hidroxilação dos resíduos de prolina, ligações cruzadas, glicosilação e remoção dos peptídeos.

No tecido muscular, o colágeno é capaz de formar ligações entre o músculo e seus tecidos colagenosos associados, como por exemplo os tendões, e também estabelecer conexões entre as células musculares individuais e seus pequenos vasos sanguíneos e nervos. Adicionalmente, possui importante propriedade intrínseca caracterizada pela tendência em polimerizar suas fibrilas sintetizadas previamente, formando estruturas capazes de se organizar e se unir ao longo do tempo, resultando em densos feixes que servirão posteriormente como suporte e estrutura tecidual (KADLER 2008). Outras interessantes propriedades são coerência e resistência mecânica, funcionando como um sistema elástico e flexível principalmente em situações de estresse. Com isso, é capaz de distribuir as forças advindas da contração muscular para o músculo e o tendão, não sobrecarregando nenhum dos dois sistemas envolvidos.

Em geral existem diferentes tipos de fibras de colágeno no organismo humano, sendo que no sistema músculo esquelético existem três formas fibrilares, conhecidas como colágenos do tipos I, III e V, e uma não-fibrilar denominado de colágeno tipo IV encontrado nas membranas basais. Destes, considera-se que os do tipo I e III são os mais abundantes. (DUANCE, ROSTALL, BLARD, BOURNE, Bailey, 1977; FOIDART, FOIDART, Engel, 1981; LIGHT & CHAMPION, 1984). A síntese neste tipo de tecido é realizada principalmente pelos fibroblastos, e suas possíveis modificações ocorrem, geralmente, pela interação entre as células musculares os fibroblastos e a ação da insulina. (HURME et al. 1991).

As alterações ocorridas no metabolismo de colágeno, decorrentes da DM1, foi registrada por Spanheimer e colaboradores (1992) que, investigaram a exposição de fibroblastos isolados de animais sadios com soro de animais diabéticos e, observaram que a taxa de produção e/ou síntese desta proteína foi mais lenta em relação aos fibroblastos de animais sadios que não foram expostos a este soro. Com isso, os autores concluíram que as alterações do metabolismo da insulina causam um impacto negativo que atinge a síntese do colágeno.

Além disso, UMPIERREZ et al. 1992 han 1995, também apontam modificações metabólicas sofridas pelo colágeno nos modelos de DM1 quando induzidos por estreptozotocina (STZ), enfatizando que tais alterações afetam a taxa de síntese de colágeno tanto no músculo como na cartilagem. Com isso, torna-se indispensável ressaltar que o conhecimento sobre a estrutura molecular, biossíntese, qualidade e rotatividade do colágeno é importante para compreender os processos patológicos relacionados a diversas afecções humanas, em especial no DM.

### 1.3.3.1 Birrefringência do Colágeno

A importância do colágeno como componente abundante da MEC, induziu diversos pesquisadores a buscarem informações mais precisas sobre suas propriedades físicas e mecânicas, para assim compreender sua agregação e conseqüentemente sua estrutura

molecular. Entre as propriedades estudadas destacam-se às relacionadas com as anisotropias ópticas apresentadas pelas fibras colágenas. Vidal e colaboradores (1990) relataram em seus achados com diferentes amostras de tecidos, como tecido hepático até músculos cardíacos e tendões. (VIDAL; DE CARVALHO, 1990; VIDAL; MELLO, 2010).

As anisotropias ópticas são classificadas como fenômenos de ordem espectral descritos em alguns materiais e podem ser consideradas em dicroísmo e birrefringência. Podemos definir a birrefringência como o fenômeno que ocorre ao cruzar perpendicularmente dois filtros (polarizador e analisador), que por sua vez dependem da diferença entre os índices de refração do objeto estudado. Assim, de maneira prática os materiais birrefringentes anisotrópicos apresentam brilho colorido ou não, sob o efeito do Plano de Luz Polarizada (PPL), e como exemplos de materiais biológicos que possuem esta propriedade temos as células musculares estriadas, colágenos e moléculas de DNA e RNA (CARVALHO; RECCO; PIMENTEL, 2012).

A natureza proteica do colágeno concede a ele dois tipos de birrefringência, a intrínseca e a textural. A birrefringência intrínseca, é obtida pela média de todas as transições de elétrons entre as ligações peptídicas, apontando informações a respeito da direção de vibração da ressonância dos elétrons presentes na região de ligação peptídica da molécula de colágeno e por toda a extensão da fibra. Em relação a birrefringência textural, esta depende da geometria das moléculas, das concentrações dos componentes dos feixes de colágeno e das diferenças entre seus índices de refração. Sendo assim, as análises das propriedades anisotrópicas podem fornecer informações tanto sobre a estrutura dos feixes como da qualidade dos mesmos, através da diferença entre os índices de refração analisados pela microscopia de luz polarizada (CUNHA; PARIZOTTO; CAMPOS VIDAL, 2001). Com isso, esta técnica permite observar as variações no arranjo e disposição dos componentes da matriz extracelular envolvidos em diferentes processos patológicos como fibrinogênese, ossificação e envelhecimento, além dos acometimentos teciduais decorrentes de síndromes como no caso da DM.

#### 1.3.4 Células Tronco Musculares: Células Satélites

As células musculares adultas não possuem capacidade de divisão celular por isso a regeneração após uma lesão é possível graças a presença e ativação de células satélites (Mauro 1961). Assim, depois da lesão muscular, as células satélites proliferam e diferenciam-se em mioblastos (CEAFALAN; POPESCU; HINESCU, 2014). Figura 3.

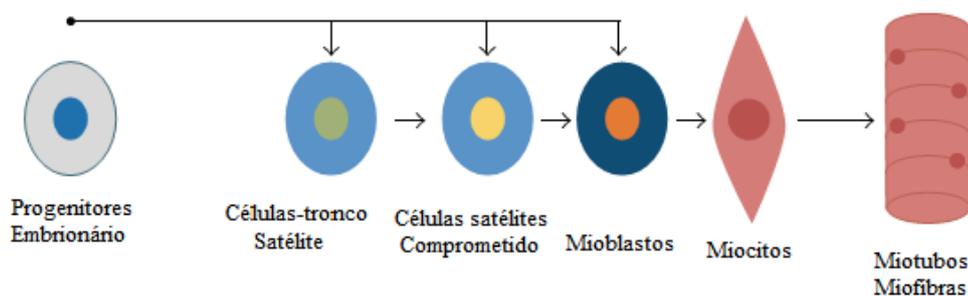


Figura 3 – Hierarquia celular durante o desenvolvimento e miogênese adulta.

Fonte: Adaptado de (ALMEIDA et al., 2016).

As células musculares satélites (CSs) são uma população heterogênea de tipos celulares, que incluem as células diretamente ligadas com a miogênese e outros tipos de células tronco com diferentes graus de potencialidade. Estas células exibem o fator de transcrição Pax-7, que é utilizado como marcador para esta população (ASAKURA et al., 2002; CEAFALAN; POPESCU; HINESCU, 2014; ZAMMIT; PARTRIDGE; YABLONKA-REUVENI, 2006).

Geralmente as células satélites estão localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular, apresentando morfologicamente um grande núcleo com uma camada de citoplasma ao seu redor (BICAS, 2004; YUSUF, F; BRAND-SABERI, 2012). Porém sua distribuição difere nas diferentes regiões do corpo, por exemplo em adultos, a quantidade de células satélites encontradas em fibras de contração lenta (tipo I), geralmente são maiores do que as encontradas nas fibras de contração rápida (tipo II) (BROEK; GREFTE; HOFF, 2010; YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013).

Nos músculos de indivíduos adultos, o desgaste pelo uso em condições normais leva a fusão ocasional de células satélites para repor as fibras perdidas. Após uma lesão, o músculo é submetido a um processo de degeneração e regeneração resultando na remodelação da inervação e vascularização do aparato contrátil (CEAFALAN; POPESCU; HINESCU, 2014). Ainda neste sentido, pode-se relacionar o processo de ativação e diferenciação das células satélites ao desenvolvimento muscular embrionário, em que os fatores regulatórios miogênicos (MyoD e Myf5) possuem um papel importante para a condução deste processo (LEHTI et al., 2005; MORROW, 2004).

As CSs quiescentes quando ativadas por desordem e/ou lesão, diferenciam-se em mioblastos, sendo o processo regulado pela expressão da MyoD e Myf5. Alguns pesquisadores sugerem que o MyoD e a Myf5 promovem a ativação das CSs e a sua diferenciação em mioblastos, enquanto a Miogenina e o MRF4 promovem a maturação da fibra muscular (ALMEIDA et al., 2016; RUDNICKI; CHARGE, 2004; YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013).

## 1.4 ALTERAÇÕES MUSCULARES NO DM

Qualquer estímulo que provoque mudança na síntese e/ou degradação das proteínas musculares, pode levar a um significativo impacto sobre a massa muscular. Desse modo, quando ocorre diminuição da síntese e/ou aumento da degradação proteica, ocorre a atrofia muscular. Esta pode ser definida como a perda involuntária de 10% da massa muscular, como consequência de condições catabólicas, como é o caso do DM, e está associada à redução da qualidade de vida e aumento da morbidade e mortalidade (CHACON HESZELE AND PRICE , 2004).

No modelo de diabetes experimental induzido por estreptozotocina (STZ), a hiperglicemia gera diversas hipóteses de alterações das vias metabólicas, que podem ser responsáveis isoladamente ou em conjunto pelas transformações funcionais e estruturais dos músculos. Estas alterações provocam aumento dos lipídeos intramusculares, diminuição de insulina, aumento de Interleucina 6 (IL-6), diminuição do Fator de crescimento relacionado à Insulina (IGF-1) (KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, 2010).

A glicosilação de proteínas plasmáticas é outro fator apontado no surgimento dos danos musculares. Este processo gera os chamados produtos de glicosilação avançada (AGE), os quais têm um papel importante nas complicações microvasculares do diabetes. Os altos níveis de AGEs, presentes em pacientes com diabetes, dão lugar a mudanças estruturais na matriz extracelular. As AGEs desregulam a ação das proteínas contráteis de miosina, principalmente, as das fibras musculares tipo II. (RAMAMURTHY et al., 2001).

No DM1, a ausência ou resistência à insulina gera profundas alterações metabólicas no músculo esquelético, como redução da captação de glicose e aminoácidos, redução da síntese de proteínas e aumento na proteólise (COTTER et al., 1989). O processo de atrofia no músculo esquelético é caracterizado pela ativação de diferentes processos proteolíticos, em particular um sistema de degradação de proteínas dependente de adenosina trifosfato (ATP) conhecido como a via ubiquitina-proteassoma (PEPATO et al., 1996). Entre os marcadores genéticos da atrofia muscular, dois genes se destacam: a atrogina-1/MAFbx e MuRF-1, havendo aumento em suas expressões quando há perda da massa muscular.

A miostatina, previamente conhecida como fator de diferenciação e crescimento 8 (GDF-8), é membro da superfamília do TGF- $\beta$  (ALEXANDRA C. MC PHERON; ANN M. LAWLER; SE-JIN LEE, 1997) conhecida como regulador negativo do crescimento do músculo esquelético. Ela inibe a proliferação de mioblastos, sem causar aparente diferenciação e aumento de apoptose (THOMAS et al., 2001). A miostatina continua a ser expressa no músculo adulto em resposta a diferentes estímulos, entretanto, seus níveis variaram de acordo com o tipo de músculo (SHARMA et al., 1999). Períodos de inatividade do músculo aumentam a expressão da miostatina (CARLSON et al., 2002). Chonkar e colaboradores (2006) demonstraram que em ratos diabéticos tipo 1, após 6

a 8 semanas da indução de DM por STZ, ocorreu uma perda significativa de peso e de massa muscular nos músculos extensor digital longo (EDL) e sóleo (SO). Além disso, foi verificada a redução da força de contração muscular nos mesmos músculos de ratos diabéticos, quando comparados ao grupo controle. Os autores concluíram que o diabetes induzido por STZ provoca atrofia muscular associada à redução na força de contração dos músculos SO (fibras lentas) e EDL (fibras rápidas) (CHONKAR; HOPKIN; ADEGHATE, 2006). Ainda neste sentido, vale ressaltar que o músculo tibial é considerado como um dos primeiros acometimentos causados pela progressão da neuropatia diabética (ND) e são decorrentes do comprometimento do nervo fibular responsável pela inervação do músculo tibial anterior (TA), motor primário da flexão do tornozelo (SACCO; , SARTOR CD , GOMES A, 2007).

#### 1.4.1 Alterações das Células Satélites no DM1

Estudos recentes apontam que as alterações no músculo decorrentes do diabetes, não podem ser explicadas completamente pela perda na rotatividade de proteínas. Desta forma, mesmo com poucos estudos, o papel das CSs é vital para entender os processos de regeneração do músculo após lesão. JEONG e colaboradores (2013) estudaram o modelo de DM1 em camundongos e relataram que as células satélites destes animais sofreram falhas na ativação após lesão muscular. (JEONG et al., 2013). Estes fatos são reforçados pelos achados de ARAGNO et al. (2004) que, descreve a redução do fator regulador miogênico e a diferenciação, prejudicada em mioblastos derivados dos animais DM1. Uma das possíveis causas apontadas para as falhas na ativação das células satélites, estão relacionadas ao atraso no turnover da MEC, situação que inibiu a migração de células inflamatórias e células satélites para as regiões da lesão (KRAUSE et al., 2013).

A figura 4, apresenta o impacto do DM1 no músculo esquelético e as consequências previstas para as CSs. As modificações que acontecem no DM incluem o estresse oxidativo, inflamação crônica e remodelação prejudicada da MEC. Em relação as CSs a doença muda o padrão de diferenciação destas células, prejudicando sua funcionalidade (FULCO et al., 2008; RYALL, 2013). Além disso, as mudanças no equilíbrio pró-oxidante / antioxidante, afetam não só o turnover proteico como também, a expressão de fatores miogênicos críticos como MyoD sugerindo, defeitos nas fases iniciais de regeneração que envolvem as CSs, ARAGNO et al. (2004). Outro ponto a ressaltar é a conversão adipogênica de CSs musculares ao ser expostas a altos níveis de estresse oxidativo (VETTOR et al., 2009).

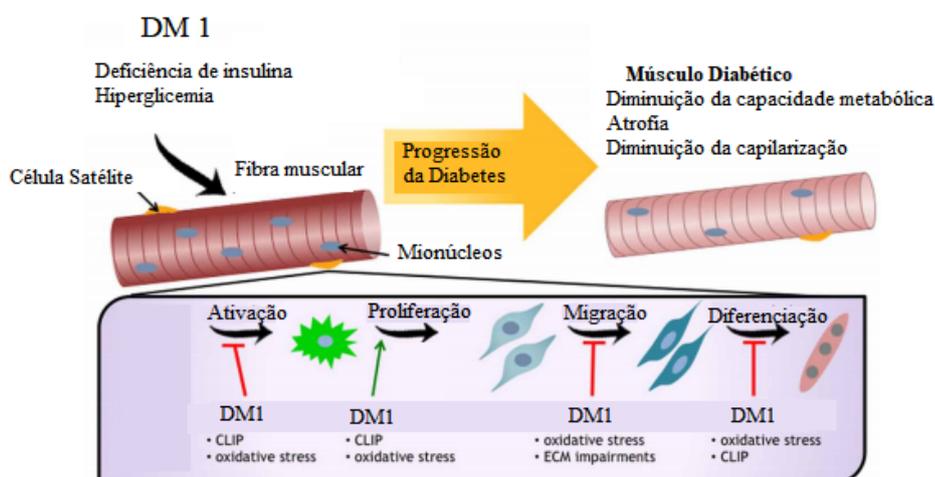


Figura 4 – Impacto do Diabetes Mellitus na saúde do Músculo Esquelético.

CLIP: chronic low-grade inflammatory profile, ECM: extracellular matrix

Fonte: Adaptado de (SOUZA et al., 2013).

Além do estresse oxidativo o DM, altera o equilíbrio de citocinas inflamatórias, constituindo um estado de inflamação crônica de baixo grau conhecido como CLIP (CHRONIC LOW-GRADE INFLAMMATORY PROFILE). Esta condição pode influenciar a atividade das CSs, como demonstrado por Toth e colaboradores, onde a IL-6 está associada a proliferação de CSs. Outra citocina inflamatória importante de destacar, é o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Esta citocina está relacionada com alterações no ciclo celular das CSs e, foi demonstrado que mioblastos tratados com TNF- $\alpha$  apresentaram um aumento na capacidade proliferativa em detrimento da capacidade de diferenciação (ALTER et al., 2008). O papel das CS no diabetes, será, sem dúvida, fundamental para entender a homeostase do músculo esquelético, surgindo como uma área de interesse, intrigante para novas investigações terapêuticas.

## 1.5 CÉLULA TRONCO

Célula-tronco é um tipo celular capaz de originar outra célula-tronco idêntica (auto-renovação). Possui divisão ilimitada e se diferencia em células especializadas podendo fazer a reconstituição funcional in vivo de um tecido. Essa célula pode ser extraída de vários tecidos, entre eles a medula óssea, que contém além de células-tronco hematopoiéticas, precursores de linhagens não hematopoiéticas que incluem as células-tronco mesenquimais (MSCs) renomeadas recentemente como células estromais multipotentes (HORWITZ et al., 2005). As células tronco são classificadas de acordo com sua capacidade proliferativa e de diferenciação em: células tronco totipotente, pluripotentes e multipotentes. As células totipotentes, em teoria, podem dar origem a um organismo inteiro; já as células tronco pluripotentes podem dar origem a qualquer tipo celular no organismo adulto. As células

tronco multipotentes possuem capacidade mais limitada de se diferenciar em diferentes tipos celulares, estando presente em praticamente todos os tecidos adultos e se diferenciando principalmente em células do tecido no qual estão inseridas (LIN; OTSU; NAKAUCHI, 2012)(Figura 5).

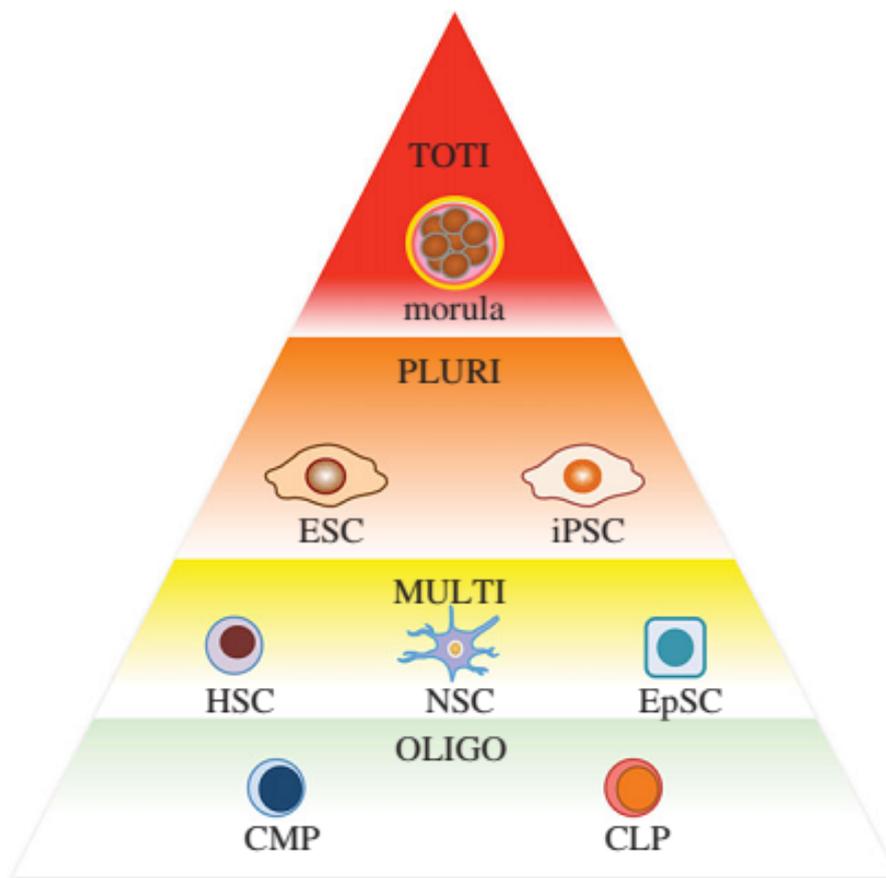


Figura 5 – Pirâmide Hierárquica das células tronco de acordo a seu potencial de diferenciação. TOTI: totipotent; PLURI: pluripotent; MULTI: multipotent; OLIGO: oligopotent; ESC: embryonic stem cell; iPSC: induced pluripotent stem cell; HSC: hematopoietic stem cell; NSC: neural stem cell; EpSC: epithelial stem cell; CMP: common myeloid progenitor; CLP: common lymphoid progenitor. Fonte: (LIN; OTSU; NAKAUCHI, 2012).

De acordo com a origem, as células-tronco podem ser divididas em: células-tronco embrionárias ou adultas. Assim, as células embrionárias, são derivadas da massa celular interna de um blastocisto entre o quinto e sexto dia. Estas células foram isoladas por Thomson e colaboradores (1998) e encontram-se bem caracterizadas; porém, seu uso em terapia celular está comprometido por questões éticas e de segurança (THOMSON et al., 1998).

Os primeiros estudos realizados em células embrionárias de ratos, demonstraram que, ao induzir a diferenciação nestas células e transferir aos indivíduos, resultaram na formação de teratomas. Em 2009, Mimeault e colaboradores, ao trabalhar com células tronco embri-

onárias humanas, relataram a possibilidade de reações de rejeição imunológica, relacionado ao fato de que as células embrionárias pertencem a outro indivíduo, além da possibilidade de formação de tumores nos indivíduos receptores (MIMEAULT; HAUKE; BATRA, 2007). As pesquisas com células-tronco provenientes do embrião humano apresentam problemas éticos complexos, assim, se discute se é incorreta a destruição da vida embrionária para fins de pesquisa e terapia celular, pois é necessário interromper o desenvolvimento do blastocisto após 5-6 dias da fecundação. Esta desestruturação do embrião significa tirar a potencialidade de se tornar um ser humano (RINGE; KAPS, 2002).

As células tronco adultas são aquelas que garantirão a manutenção e a integridade dos tecidos nos organismos já formados (CAPLAN, 2007). Estas células diferem das células tronco embrionárias no potencial de diferenciação, já que não podem formar todos os tipos celulares. As células tronco adultas se dividem em dois grupos, as germinativas e somáticas. Define-se como células tronco adultas germinativas aquelas que podem gerar 1 tipo celular dependendo do sexo do indivíduo (fêmea ou macho); já as células somáticas são multipotentes e apesar de ter capacidade de diferenciação limitada quando comparada com as embrionárias, geram múltiplas linhagens celulares e apresentam vantagens como não ter implicações éticas envolvidas no seu uso, razão pela qual apresenta potencial interessante na medicina regenerativa (GODARA; NORDON; MCFARLAND, 2008).

### 1.5.1 Células Estromal Mesenquimal Multipotente

As células tronco multipotentes estão bem descritas na literatura. Incluem as células tronco hematopoiéticas, células tronco estromais mesenquimais e células progenitoras endoteliais (todas presentes na medula óssea). Além de células tronco cardíacas; células tronco neurais, presentes no sistema nervoso central; células satélites, presentes no músculo esquelético (ZHANG et al., 2006). Dentro do grupo das células tronco adultas somáticas encontramos as células tronco mesenquimais (MSCs), nomeadas assim porque foram inicialmente isoladas da medula óssea. Desta forma, a palavra "mesenquimal" faz referência às linhagens hematopoiéticas, mesmo que este tipo de célula não possa diferenciar-se em nenhuma delas (LIN; OTSU; NAKAUCHI, 2012). A Figura 6 apresenta as células derivadas das MSCs no processo mesengênico. (SINGER; CAPLAN, 2011).

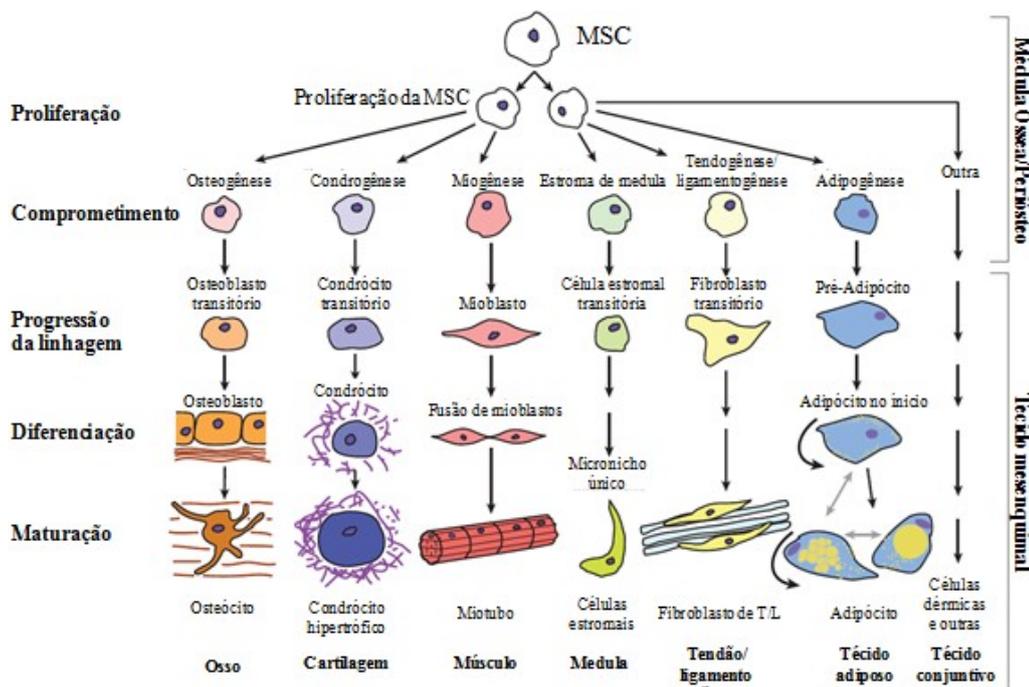


Figura 6 – Processo Mesengênico.  
 Fonte: Adaptado de (SINGER; CAPLAN, 2011).

Embora tenham sido isoladas tradicionalmente da medula óssea, também foram encontradas em numerosos tecidos adultos, como o tecido adiposo, musculo esquelético, fígado, rim pulmão, (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006), tendão e ligamento (GODARA; NORDON; MACFARLAND, 2008b).

Nosso trabalho aborda o estudo das células mesenquimais multipotentes. Estas células exibem uma morfologia típica de fibroblasto, são aderentes às superfícies plásticas, podem expandir-se por quase 40 gerações, mantendo sua capacidade multipotente (DEANS; MOSELEY, 2000).

As MSCs são de fácil isolamento, expansão e cultivo, além de terem a capacidade de se diferenciarem *in vitro* em outros tipos celulares. Elas não apresentam um marcador específico para identificação das mesmas, com isso, vários marcadores positivos e negativos são utilizados para caracterizar fenotipicamente estas células. Elas caracterizam-se pela ausência de expressão de marcadores de linhagens hematopoiéticas, e pela expressão média/alta de vários marcadores celulares tais como, algumas moléculas de adesão essenciais envolvidas na interação com células T, como demonstrado no estudo de Covas e colaboradores (2006). Elas expressam complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e não expressam MHC de classe II. Desse modo, é sugerido que as MSCs escapam da vigilância do sistema imune por possuírem antígenos de superfície que são pobremente reconhecidos pelas células T alorreativas e células NK. Estudos recentes sugerem que elas possam ser transplantadas de forma alogênica, autóloga e até mesmo xenogênica

(KERKIS et al., 2008; ZHANG et al., 2006). Tipicamente expressam um grande número de moléculas na sua superfície conhecidas como marcadores, e estas moléculas podem ser proteínas de membrana e receptores para fatores de crescimento (BOBIS, 2006). Assim, para que uma célula seja reconhecida como tal deve expressar os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90; e não expressar os marcadores de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, e HLA-DR pois eles são clássicos de células hematopoiéticas (HORWITZ et al., 2005). Embora, já tenham sido identificados muito outros marcadores de superfície para identificação de MSCs, a *International Society for Cellular Therapy* concorda que, apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, e a não expressão de marcadores hematopoiéticos, é suficiente para a imunofenotipagem dessas células e decidir para que sejam reconhecidas como células tronco (HORWITZ et al., 2005). Finalmente, a sua capacidade de se diferenciar em várias linhagens mesenquimais também tem sido utilizada como um marcador de identidade (ABDALLAH; KASSEM, 2008).

### 1.5.2 Aplicações Terapêuticas das MSCs

O uso terapêutico das MSCs se deve em parte ao potencial imunomodulatório, propriedade mediante a qual as MSCs são capazes de modular as funções de uma população de células do sistema imune através da ação parácrina. Estudos demonstram que, as MSCs ao entrarem em contato com tecidos (alógenos ou autógenos) desencadeiam a liberação de fatores solúveis que agem no sistema imune, tais como interleucinas (IL-4, IL-6) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) (NAUTA; FIBBE, 2007).

As propriedades imunomoduladoras das MSCs também podem fornecer novas vias para o tratamento das alergias. Estudos realizados demonstram que, ratos que apresentavam alergia nas vias respiratórias, após o tratamento com MSCs demonstravam atenuação da resposta do sistema imunológico, reduzindo significativamente o quadro alérgico (SUN et al., 2012). Outros estudos sobre o fato das MSCs intervirem nos processos de alergia pode ser explicado pela influência destas sobre a função dos mastócitos, principais células que secretam importantes mediadores das respostas alérgicas, como histamina, o que sugere possíveis aplicações das MSCs como uma fonte de células alternativa para o tratamento de doenças alérgicas graves (BROWN et al., 2012).

Em relação as propriedades anteriormente citadas, têm-se demonstrado, em modelos experimentais, que as MSCs são capazes de regenerar tecidos lesionados como osso, cartilagem e inclusive músculo cardíaco (KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004). Entre as principais aplicações clínicas encontradas para as MSCs estão: a reparação do tecido ósseo quando combinada com matrizes de hidroxiapatita e fosfato. Os resultados obtidos por esses tratamentos são potencializados com a adição de células *in situ*.

Terapias celulares que utilizam as MSCs no tratamento de doenças relacionadas ao coração, como insuficiência cardíaca ou tratamentos após infartos, mostraram-se promisso-

ras pois, foi comprovado melhora do quadro clínico após a administração sistêmica ou local. Tal como nos estudos realizados por Nagaya e colaboradores (2005) no qual se verificou o aumento da densidade capilar em tecidos de miocárdio infartado em ratos (NAGAYA et al., 2005).

A facilidade com que as MSCs podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* tem incitado muitos pesquisadores a propor possíveis aplicações clínicas para estas células. O estudo de Shibata e colaboradores (2008), após 4 semanas da aplicação de estreptozotocina e com quadro estabelecido de ND, observaram que as MSCs aplicadas no músculo sóleo de ratos não entraram na constituição do músculo e não se diferenciaram. Essas células vistas pela imunofluorescência permanecem ao redor das fibras musculares, podendo então exercer um efeito parácrino, através da liberação de citocinas. Eles verificaram que houve um aumento da expressão de RNAm do VEGF e bFGF muscular, além disso, os efeitos dessas células nos nervos consistiram de melhora na capilarização e aumento dos fatores neurotróficos (NGF e NT-3) (SHIBATA et al., 2008).

As MSCs representam, portanto, uma ferramenta ideal para terapias celulares em virtude de seu fácil isolamento e expansão. Considerando as complicações que o DM provoca nos músculos e nervos devido a ND, torna-se importante, conhecer as possíveis alterações morfológicas das fibras musculares, diante do tratamento com MSCs. Até o presente momento, não existem estudos que avaliam tais condições na ND.

O uso de MSCs como terapia regenerativa para impedir ou recuperar a ND permanece controverso, como demonstrado pelo estudo de JEONG e colaboradores (2011), que observou a formação de tumores quando as MSCs foram injetadas diretamente no músculo, diferentemente do proposto neste estudo que será via intraperitoneal. Entretanto, recentemente, Secco e colaboradores (2012) estudaram a combinação de MSCs (1x10<sup>6</sup>) e IGF-1 sistemicamente em ratos distróficos, observando diminuição da inflamação e da fibrose muscular, sem detecção de tumores nos animais (SECCO; JR; VIEIRA, 2012) .

As células-tronco se mostraram como um potencial agente terapêutico para a ND, uma vez que promove a neovascularização, aumenta a proliferação e diminui a apoptose das células endoteliais e das células de Schwan como demonstrado por JEONG e colaboradores (2009), além de melhorar a velocidade de condução nervosa e aumentar a expressão dos fatores neurotróficos em ratos com ND estabelecida (KIM; JIN; BAE, 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar os efeitos da aplicação de células-tronco mesenquimais sobre a função, morfológica e morfométrica das fibras musculares, expressão da fibrose muscular e efeitos protetores em modelo de neuropatia diabética em ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e caracterizar as células tronco mesenquimais de ratos saudáveis, para sua posterior infusão no modelo experimental avaliado.
- Avaliar o padrão de coordenação motora nos grupos por meio do teste funcional Rota Rod.
- Avaliar aspectos morfométricos dos músculos TA, como a densidade de tecido conjuntivo e área de secção transversa.
- Avaliar a porcentagem de birrefringência do colágeno de todos os grupos.
- Avaliar o padrão de imunexpressão do colágeno I e colágeno III no músculo TA.
- Caracterizar possíveis mecanismos moleculares de ação de células tronco mesenquimais no tratamento do músculo esquelético de animais diabéticos.

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 60 ratos Wistar adultos, (*Rattus norvegicus*: linhagem Wistar, Rodentia, Mamalia) machos, com massa média de 250 gramas provenientes do biotério central da Universidade de Campinas, (São Paulo, Brasil). Os animais permaneceram durante o período experimental no Biotério do Departamento de Fisioterapia (UFSCar), mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, em ambiente higienizado com temperatura e humidade controlada a 18-21 °C, ciclos de claro-escuro de 12h-12h e livre acesso a ração do tipo comercial (Purina, Nestlé®).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UFSCar (Protocolo nº47/2012) respeitando as normas do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Instituto de Recursos Animais de Laboratório, National research council, Washington, DC) e os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## 3.2 INDUÇÃO DO DM

Para a indução do diabetes os animais receberam injeção intraperitoneal de STZ (50mg/Kg de massa corporal) dissolvida em tampão citrato 10 mM pH 4,5. (MORROW., 2004). Após 1 semana, os animais que receberam STZ e apresentaram valores de glicemia >250 mg/dL, foram considerados diabéticos (SANCHEZ et al., 2005).

Os animais foram distribuídos em 3 grupos:

- **Controle (C):** animais saudáveis com aplicação de Tampão fosfato-salino (PBS) para simulação do tratamento;
- **Diabético (DM):** animais diabéticos com simulação de tratamento também por PBS;
- **Diabético tratado com MSCs (DM+MSCs):** animais diabéticos tratados com a aplicação de MSCs.

Após o estabelecimento da ND, durante 1 mês, semanalmente, os animais foram pesados para determinar a massa corporal e foi feita a medida da glicemia em jejum. Amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda e os níveis de glicose no sangue foram medidos por um medidor de glicose Accu-Ckeck (Roche Diagnostic, Indianapolis, EUA).

### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A figura 7, apresenta linha do tempo envolvendo os procedimentos de indução do diabetes, tratamentos e coleta de material para análise.

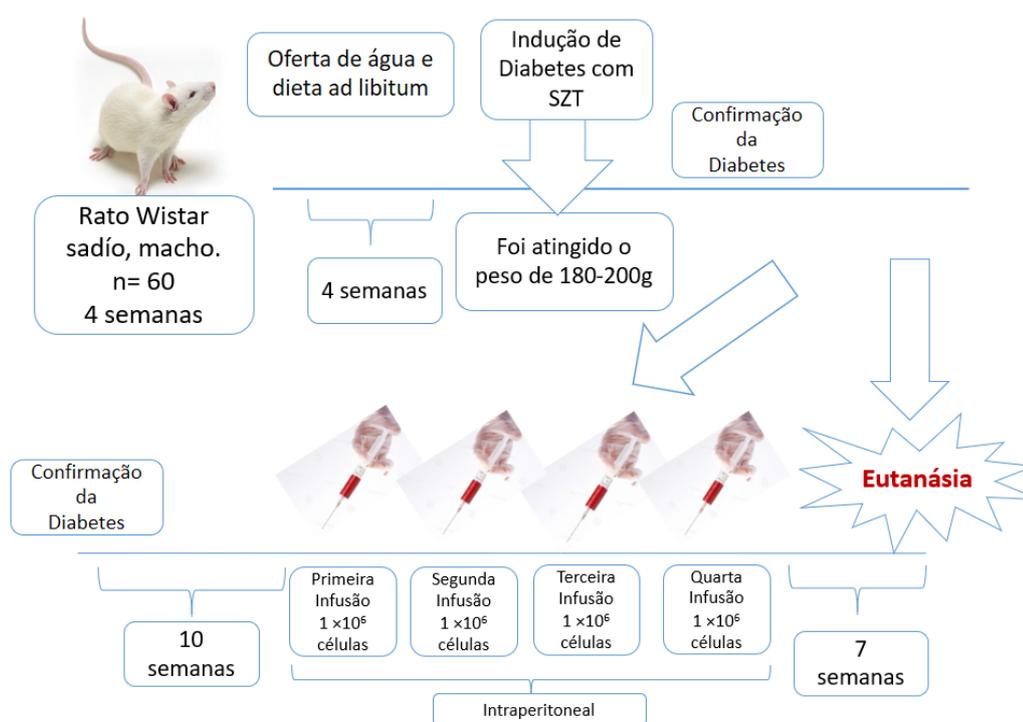


Figura 7 – Desenho Experimental.  
Fonte: acervo pessoal.

### 3.4 TESTE FUNCIONAL: TESTE ROTA ROD

O teste consiste na colocação dos animais em um aparelho composto por uma barra horizontal rugosa, localizada a 25 cm da superfície, subdividida em quatro compartimentos e programada para girar à velocidade constante de 8 rpm. O tempo é medido através de cronômetro do próprio equipamento, o qual é parado quando o animal perde o equilíbrio e cai. Cada animal passou por 5 leituras e para análise estatística foi calculada a média de permanência nessas 5 leituras. A avaliação foi realizada de forma cega para todos os grupos.

## 3.5 ISOLAMENTO, CULTURA E CARACTERIZAÇÃO DAS MSCS DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS

### 3.5.1 Isolamentos das MSCs

A extração e isolamento das células foi realizado através do sacrifícios de animais por deslocamento cervical sendo estes submetidos à remoção cirúrgica e estéril do fêmur, lavado e mantido em PBS. Num ambiente estéril, as epífises (extremidades) do fêmur foram retiradas com o auxílio de uma tesoura. Em seguida, foi realizada a extração da medula óssea através do procedimento de lavagem do osso com PBS. Após a coleta, as células mononucleares da medula óssea foram centrifugadas por 10min (1200 rpm). Após contagem,  $5 \times 10^7$  células mononucleares da medula óssea foram plaqueadas em frasco de cultura para isolamento (CHENG et al., 2012).

### 3.5.2 Cultivo Celular

As células foram cultivadas em frascos T (TPP, Suécia) e mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingir confluência de no máximo 80%. Ao atingir a confluência, iniciou-se o procedimento de expansão (passagem) de um frasco T para outros, dependendo do número de células disponível. O sobrenadante foi retirado e as garrafas foram lavadas com uma solução de PBS estéril. Em seguida foram adicionados 4 mL de Tryple (GIBCO, EUA) e mantidos por 5 minutos em incubadora a 37°C para que as células consigam desaderir da superfície do frasco T. A ação da enzima foi interrompida após a adição de 12 mL de meio de cultura  $\alpha$ -MEM. O conteúdo do frasco T foi transferido pra um tubo de 15 ml e centrifugado a 1600 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura. Foi retirada uma alíquota de 100  $\mu$ L para realizar a contagem utilizando o método de exclusão do corante azul de tripan (GIBCO, EUA). As passagens continuaram até as células atingirem o número de células necessárias para a infusão.

Após o estabelecimento da ND, durante 1 mês, semanalmente, os animais do grupo Dm+MSCs receberam injeções intraperitoneais de 500 $\mu$ L de PBS gelado contendo  $1 \times 10^6$  MSCs, já o grupo C e DM recebeu 500 $\mu$ L de PBS gelado.

Todas as formulações dos meios e suplementos utilizados neste estudo se encontram no Anexo 1. Todos os procedimentos de cultivo de células realizados neste trabalho se encontram detalhados no Anexo 2-5.

### 3.5.3 Infusão de CTMs

Assim que as células tronco mesenquimais atingirem o número desejado (quinta passagem) foram iniciadas as infusões múltiplas. Após 10 semanas da indução do DM, o grupo DM+MSCs receberam quatro injeções intraperitoneais de  $1 \times 10^6$  CTMs ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de PBS, com uma semana de intervalo entre cada uma. Os grupos DM e C receberam 500  $\mu\text{L}$  de PBS gelado.

### 3.5.4 Caracterização Imunofenotípica

A caracterização imunofenotípica das células tronco mesenquimais foi realizada na 5ª passagem (PITTENGER et al., 1999). Para a análise de citometria de fluxo, as células foram descongeladas e cultivadas em frasco T. Em seguida foram divididas em alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de PBS com  $1 \times 10^6$  células após a ação da enzima Tryple Express (GIBCO, EUA). As alíquotas foram incubadas com 5  $\mu\text{l}$  de anticorpos monoclonais ou isotipos controles diretamente conjugados a fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE) por 15 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS para a análise no citômetro de fluxo FASCalibur (Becton-Dickson, EUA) utilizando o software CELLQuest™. As análises foram realizadas no laboratório de Citometria de fluxo do centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto.

### 3.5.5 Diferenciação Celular

As células provenientes das etapas pré e pós infusão foram induzidas a diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrocitos (HORWITZ et al., 2005). Este processo consistiu em suplementar o meio de cultura com indutores específicos para cada tipo de diferenciação. No caso da diferenciação em adipócitos e osteócitos foram inoculados  $4 \times 10^4$  células por poço em uma microplaca de 24 poços. Após a adesão, o meio Alfa Mem (GIBCO, EUA) foi substituído pelo meio de diferenciação correspondente de acordo com as instruções do Kit de diferenciação StemPRO (Thermo Fisher, EUA). As placas foram mantidas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. A troca de meio foi realizada substituindo metade do volume do poço a cada 2-3 dias.

Para avaliar a diferenciação osteogênica, aproximadamente 28 dias após o cultivo, foi realizada a coloração por nitrato de prata, para isso os poços foram lavados com PBS e incubados em solução contendo 5% de nitrato de prata por 30 minutos protegido da luz. Após esse período, as culturas foram lavadas com água destilada e neutralizadas com uma solução contendo 2% de tiosulfato de sódio. A diferenciação em osteócitos foi evidenciada pelo acúmulo de cristais de oxalato de cálcio corados com Vom Kossa, que foram reconhecidos através da microscopia óptica como depósitos castanho escuro. Para

os adipócitos, os poços foram lavados com PBS e corados com Sudam II por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a lavagem com água destilada e fixação em álcool 70% (v/v). A diferenciação em adipócitos foi caracterizada pela formação de gotículas de gordura coradas em vermelho. O protocolo de diferenciação celular de condrócitos foi baseado no plaqueamento de células em formato de gotas para a formação de esferóides celulares típicos da diferenciação condrogênica. Foi utilizado o kit de diferenciação StemPRO® (Thermo Fisher, EUA) e o protocolo foi seguido conforme as especificações do fabricante. Para tanto as MSCs foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas de maneira a garantir uma suspensão de células em alta concentração. Com uma micropipeta, foram colocadas gotas de 5-10  $\mu\text{l}$  em uma placa de baixa adesão de 24 poços de modo que cada gota continha cerca de  $1,6 \times 10^5$  células. A placa foi incubada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos (sem qualquer adição de meio de cultura). Após esta incubação, adicionou-se 500  $\mu\text{l}$  do meio indutor de diferenciação em cada poço, cuidadosamente para não perturbar as gotículas de células, e mantidos na incubadora com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 14 dias. Foram realizadas trocas de 50% do meio de cultura a cada 3 dias. Após 14 dias de incubação, retirou-se cuidadosamente o meio de cultura da placa e cada poço foi lavado com PBS 1x gelado. Em seguida as células foram fixadas com paraformaldeído (2%) por 30 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas com água destilada e incubadas com 1% de Azul de Alciano à temperatura ambiente durante 1 hora.

## 3.6 COLETA DE TECIDOS

Ao final do período experimental os animais foram sacrificados por guilhotina e foi realizada a retirada dos músculos TA, sendo as amostras do TA imediatamente congelados em isopentano pré-resfriado em nitrogênio líquido. Após estes procedimentos as amostras TA foram divididas e o fragmento proximal foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C (Forma Scientific, Marietta, OH) para as análises de RNAm e proteínas. O fragmento distal foi utilizado para as medidas histológicas e morfométricas. Todos os tecidos foram pesados, divididos e estocados, de acordo com a necessidade de cada análise. RUSSO et al., 2010).

## 3.7 ANÁLISE MUSCULAR

### 3.7.1 Análise Morfométrica

Cortes transversais seriados (10  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos da porção média dos ventres dos músculos TA congelados usando micrótomos criostato (HE 505, Microm, Walldorf, Alemanha) e foram corados com 1% de azul de toluidina 1% bórax. Cortes histológicos da região transversal do ventre de cada músculo TA foram usados para medir a área de

secção transversal da fibra muscular (AST), com este fim, foram escolhidas aleatoriamente 100 fibras de cada imagem, sendo estas avaliadas usando o software AxioVS40 V4.8.2.0 SP2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Alemanha).

### 3.7.2 Análises do Tecido Conjuntivo

Para avaliar a densidade do tecido conjuntivo, cortes histológicos corados com azul de toluidina foram fotografados, utilizando um microscópio (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com uma câmera digital Sony (DSC S75, Tóquio, Japão). As fotomicrografias foram divididas em grades, analisando o número total de pontos coincidentes nas interseções retilíneas no tecido conectivo (endomísio e perimísio) pelo número total de pontos em uma grade com uma área total de  $10.800 \mu m^2$ , contendo 168 interseções retas. Os valores foram expressos em porcentagem (RUSSO et al., 2008).

### 3.7.3 Análises de % de Birrefringência de Colágeno por Microscopia de Polarização.

A organização macromolecular do tecido conjuntivo intramuscular foi analisada por birrefringência. A análise da birrefringência total do tecido conjuntivo é uma técnica altamente reprodutível para a detecção de variações no estado de agregação e na ordem molecular dos feixes de colágeno (COUTINHO et al., 2006). A birrefringência do tecido conjuntivo do músculo TA foi medida via retardo óptico, e determina a organização macromolecular do colágeno, como descrito anteriormente por COUTINHO et al. 2006. Na análise de birrefringência de colágeno, foi utilizado o software Image J (versão 1.36) para quantificar o brilho da birrefringência através do cálculo da intensidade de "pixels" por luz polarizada inferior. A intensidade dos "pixels" foi proporcionalmente relacionada à organização das fibras de colágeno. As fibras de colágeno mais grossas, expressam uma birrefringência mais forte, que é considerada uma propriedade anisotrópica das fibras de colágeno. As medidas de retardo óptico (OR) foram feitas em microscópio de luz polarizada LEICA com objetiva Pol (10X / 0.22), condensador (0,0), compensador (1 / 4), com luz monocromática de 546 nm obtida por filtro de interferência ZEISS. Três campos consecutivos de cada amostra foram fotografados com a ajuda de uma câmera acoplada ao microscópio de luz polarizada em uma ampliação de 20x.

## 3.8 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA (IH)

Os cortes histológicos do músculo TA foram inseridos em lâminas silanizadas para uma melhor adesão do material biológico. Após a desparafinização e a hidratação, as secções histológicas foram marcadas com uma caneta hidrofóbica e depois lavadas em uma solução tampão enriquecida com Tween duas vezes por 3 min. Após este período as

lâminas foram imersas em peróxido de hidrogênio durante 10 minutos e depois lavadas em PBS duas vezes cada uma por 3 min e, finalmente, foram imersas em peroxidase endógena durante 30 min. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-col 1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:200; anti-col III (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) a uma concentração de 1:200. Ambos anticorpos foram incubados durante 2 horas e lavados duas vezes em PBS. Posteriormente as lâminas foram submetidas a um anticorpo secundário (IgG anti-coelho) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a uma concentração de 1:200 em PBS durante 30 min. (CAETANO et al., 2015).

## 3.9 ANÁLISE DOS DADOS

### 3.9.1 Análises da intensidade dos pixels para IH e % de birrefringência

As fotografias obtidas para ambas as técnicas foram analisadas utilizando o Software Image J (V1.37a), especificamente o plugin Color Deconvolution. Este software reconhece as cores da imagem e as decompõe em três cores básicas: azul, vermelho e roxo. Assim foi avaliada a porcentagem de área de cor clara para as análises de birrefringência e a de coloração castanha escuro para as análises de IH que representam as áreas reconhecidas pelo anticorpo primário (COL I e COL III). Estas medidas foram expressas em porcentagem dos pixels totais em cada imagem usando Threshold color (CAETANO et al., 2015; OTTERÇO et al., 2018).

### 3.9.2 Análise Estatística

Os dados foram expressos como media e SEM. Os mesmos foram submetidos aos testes de Homogeneidade e Normalidade, com os testes de Levene e Shapiro-Wilk's, respetivamente. Para determinar as diferenças existentes entre os grupos experimentais na quantificação do número de fibras, tecido conjuntivo, analise de birrefringência, AST e teste funcional foi utilizado o teste ANOVA one way e teste post hoc de Tukey. Para analisar os dados de glicemia e massa corporal foi utilizado ANOVA two way com medidas repetitivas.

Os valores apresentados foram considerados significativos quando  $P \geq 0,05$ . Para isto utilizou-se o software GraphPad Prism. (Versão 7.04 for Windows).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 GLICEMIA E PESO CORPORAL TOTAL

O grupo Diabetes Mellitus (DM) e diabetes com infusão de MSCs (DM+ MSCs) apresentaram um aumento nos valores de glicemia e diminuição no peso corporal total nos momentos pós indução do diabetes e pré eutanásia quando comparados com o momento pré indução ( $p = 0.0001$ ). Essas diferenças não foram observadas no grupo controle (Tabela 1). Ao comparar os grupos experimentais (intergrupo) observou-se um aumento da glicemia e diminuição do peso corporal no momento pós indução e pré eutanásia entre os grupos DM e DM+ MSCs ( $p = 0.0001$ ) quando comparados com o Controle (Tabela 1). Dessa forma, verifica-se que o modelo de indução utilizado para a DM foi eficiente para desenvolver as características da doença. Já o grupo DM+ MSCs não apresentou melhora em relação a estes parâmetros.

Tabela 1 – Massa corporal (g) e glicemia de jejum (mg/dL) pré-DM, pré infusão de MSCs e pré eutanásia de animais do Grupo Controle (C), Diabetes Mellitus (DM) e Diabético tratado com MSCs (DM+MSCs).

Variável	Grupos	Pre-DM indução	Pre-infusão	Pre-eutanásia
Massa corporal (g)	C	149.7 ± 20.2	451 ± 2.9	570 ± 2.7
	DM	168.1 ± 9.4	246.4 ± 4.7*	310.5 ± 9.1*
	DM+MSCs	146.2 ± 11.7	230.8 ± 27.2*	290.7 ± 5.6*
Glicemia de jejum (mg/dL)	C	78.1 ± 8.8	73.1 ± 11.2	71.8 ± 10.8
	DM	77.1 ± 10.8	418.2 ± 8.3*	483.4 ± 10.3*
	DM+MSCs	75.1 ± 10	395.4 ± 9.78*	450.5 ± 5.6*

Valores são expressos como média ± SEM ( $n = 6$  animais / grupo). \* vs. C,  $P < 0,001$ .

### 4.2 DESEMPENHO MOTOR: TESTE ROTA ROD

Em relação às características qualitativas do desempenho motor avaliadas, observou-se uma diferença acentuada na capacidade de coordenação e cadencia na execução da tarefa, o que se evidenciou no tempo de permanência no Rota Rod, extremamente reduzido no grupo DM ( $p = 0.0001$ ), em comparação com o desempenho obtido pelo grupo Controle e sem diferenças significativas entre o grupo Controle e DM+ MSCs (Figura 8).

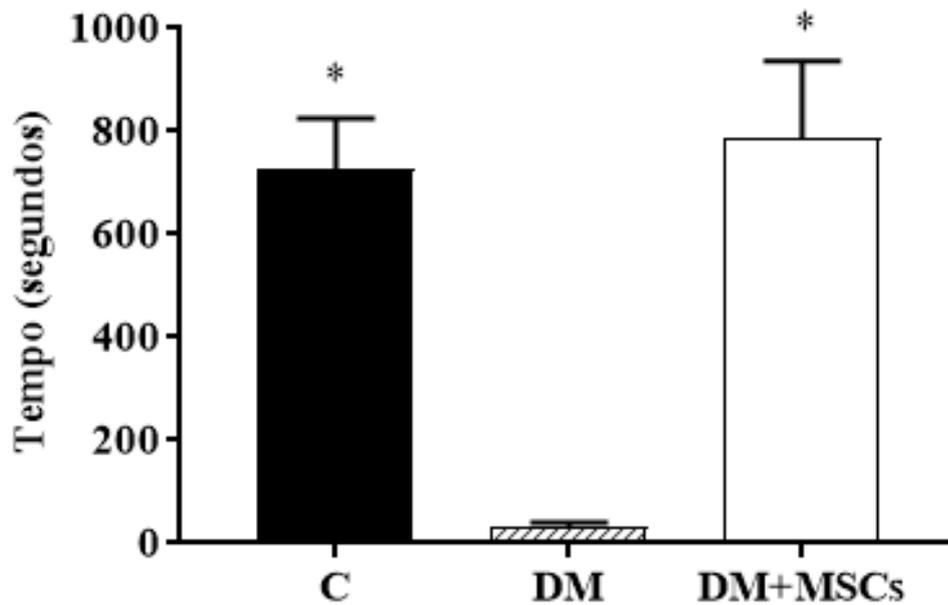


Figura 8 – Desempenho motor (segundos) do grupo controle (C), grupo Diabetes Mellitus (DM) e grupo Diabetes Mellitus + Infusion (DM + MSCs). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM (n = 6 animais / grupo). \* vs. DM, P < 0,001  
Fonte: acervo pessoal.

### 4.3 ESTABELECIMENTOS DE CULTURAS DE MSCS DE RATOS WISTAR DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA

As MSCs de rato Wistar foram isoladas a partir de medula óssea e posteriormente cultivadas de acordo com os procedimentos explicados na secção 4.3. A Figura 9 demonstra as características morfológicas das MSCs, assim observa-se células aderidas ao plástico e a morfologia fibroblastóide típica deste tipo celular.

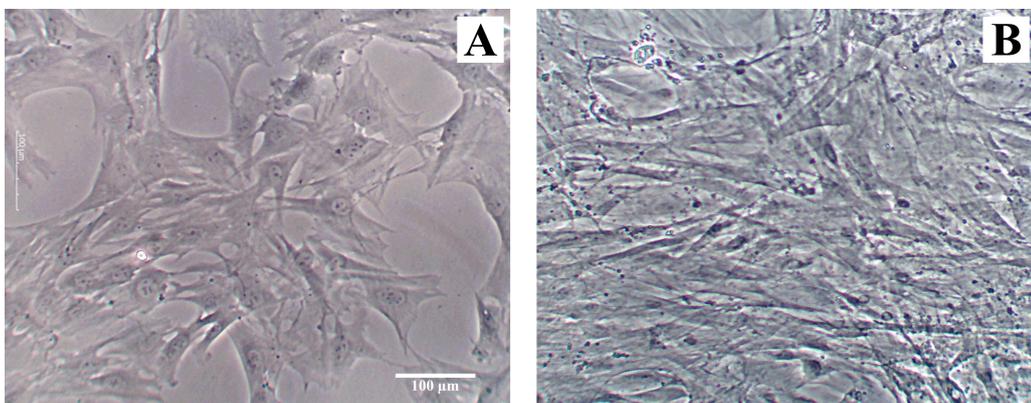


Figura 9 – Aspecto morfológico das MSCs de rato Wistar (quinta passagem) (A) Menor confluência, (B) Maior confluência.  
Fonte: acervo pessoal.

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSCS)

As MSCs foram marcadas com anticorpos monoclonais contra vários antígenos de superfície e analisadas por citometria de fluxo. Os marcadores analisados na superfície das MSCs foram: CD44, CD31, CD11b, CD29, CD45, CD73. Marcadores positivos: CD29, CD44 e CD73; marcadores negativos: CD31, CD11b e CD45. (Ver Tabela 1).

Para análise, foi desenhada uma gate na população de células viáveis (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Os eventos da gate de células viáveis (R1) foram representados por um histograma de fluorescência 2 (FL2, PE - ficoeritrina). Os valores representam a porcentagem de células positivas para aquele determinado antígeno de superfície (Figura 10).

Tabela 2 – Porcentagens dos marcadores positivos e negativos que estabelecem que as células-tronco cultivadas sejam mesenquimais

<b>Marcadores positivos</b>	<b>Marcadores Negativos</b>
CD 29 89,47%	CD 31 1,5%
CD 44 98.9 %	CD 11b 1,97%
CD 73 99 %	CD 45 1,07%

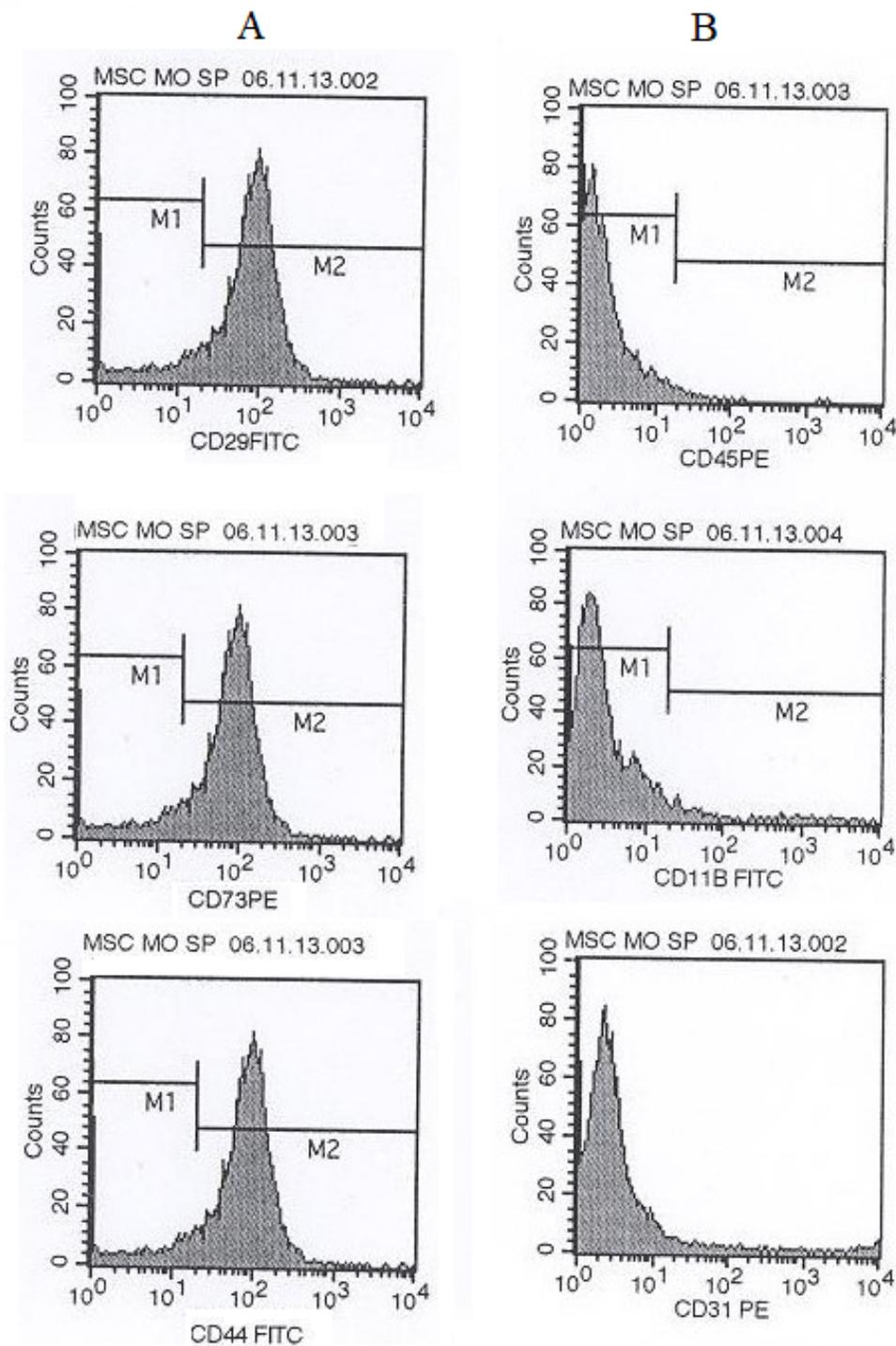


Figura 10 – Caracterização imunofenotípica da amostra de MSCs isolada de medula óssea de ratos Wistar. Na quinta passagem, as células foram tripsinizadas e marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos contra diversos antígenos de superfície expressos nas MSCs. A) Marcadores positivos (CD44, CD73, CD29). B) Marcadores positivos (CD45, CD11b, CD31).

Fonte: acervo pessoal.

## 4.5 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As MSCs provenientes da medula óssea de ratos Wistar na quinta passagem, foram induzidas a diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos. A diferenciação em adipócitos foi evidenciada pela presença de gotículas de gordura na cor vermelha no interior das células, após a coloração com Sudam II (Figura 11B). A diferenciação morfológica em osteócitos foi evidenciada pelo acúmulo de cristais de oxalato de cálcio corados com Vom Kossa, observados como manchas castanhas escuras nas células (Figura 11C). A diferenciação condrogênica foi evidenciada pela presença de glicosaminoglicanos corados em azul pelo Alcian Blue (Figura 11D).

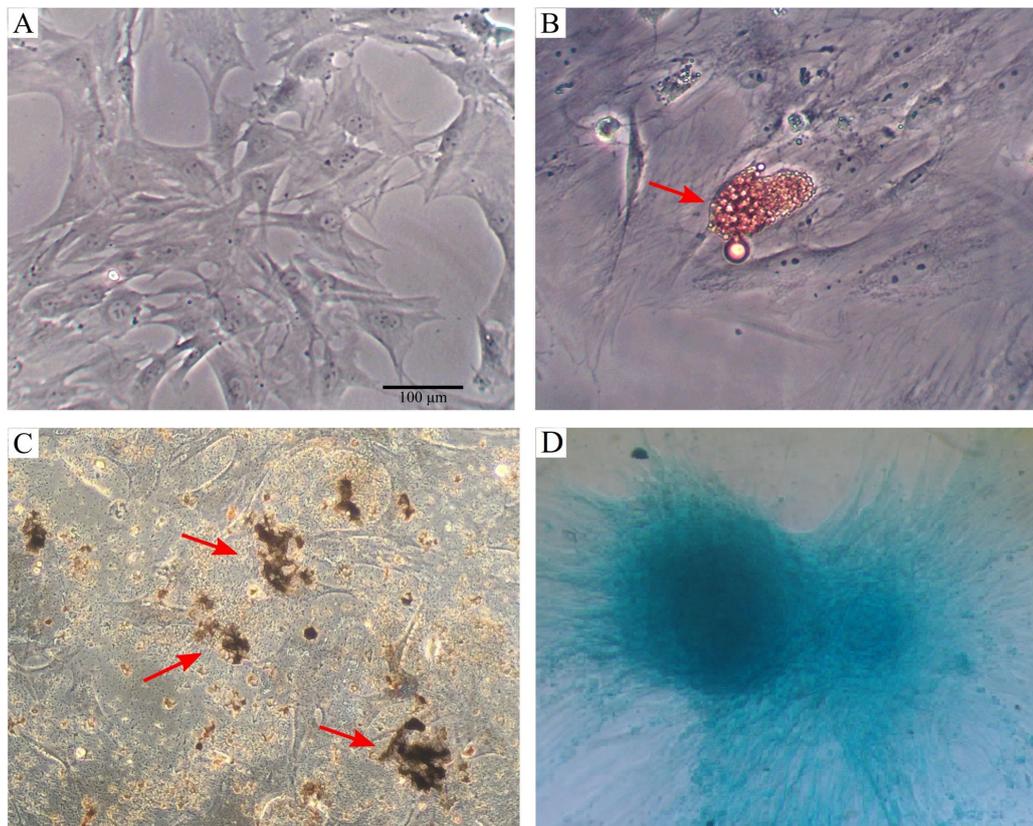


Figura 11 – MSCs derivadas de medula óssea isoladas de ratos Wistar. As MSCs foram isoladas da medula óssea de ratos Wistar saudáveis e cultivadas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM com 15% de soro bovino fetal. Quinta passagem de células aderidas ao plástico cultivadas em  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (A); diferenciadas em linhagens adipogênicas (B) ou osteogênicas (C); diferenciadas em linhagens condrogênicas (D).

Fonte: acervo pessoal.

## 4.6 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

### 4.6.1 Pesos dos músculos

Foram comparados os pesos normalizados do músculo tibial anterior nos grupos C, DM e DM+ MSCs. Observou-se diminuição do peso do TA nos indivíduos do grupo DM em relação ao peso do mesmo músculo nos indivíduos do grupo C ( $p = 0.043$ ). Também foi observada a diminuição deste parâmetro no grupo DM+ MSCs em relação ao C ( $p = 0.040$ ) (ver Tabela 3) e não foram encontradas diferenças no peso do TA entre os grupos DM e DM+ MSCs.

### 4.6.2 Áreas de Secção Transversa (AST)

Os resultados mostram diminuição da AST nos grupos D e MSC em relação ao grupo C (Figura 12). Através da análise morfológica, observou-se que o grupo controle apresenta fibras musculares íntegras, com forma poligonal, núcleos periféricos e feixes musculares bem organizados (Figura 12A). Já nos músculos do grupo diabético (Figura 12B) evidencia-se atrofia generalizada das fibras musculares, as quais apresentam forma mais arredondada, se comparadas ao grupo controle (Figura 12A). Em detalhe (Figura 12D), foram observadas fibras com núcleos centralizados (Figura 12D, seta), indicando que processos regenerativos estão acontecendo. O mesmo padrão morfológico foi observado no grupo diabético infundido com MSCs (Figura 12C e 12E). Adicionalmente, foram detectadas fibras fragmentadas (Figura 12F, cabeça de seta) e acúmulo de gordura intramuscular (Figura 12G, asterisco) nos grupos diabéticos, infundidos ou não.

Os grupos DM ( $p = 0.0001$ ) e DM+ MSCs ( $p = 0.0001$ ) mostraram uma diminuição na AST do músculo tibial anterior quando comparados com o grupo C (ver Tabela 3).

Tabela 3 – Área de secção transversa (AST) fibra muscular ( $\mu m^2/g$  massa corporal), percentual de tecido conjuntivo muscular e número de fibras musculares no grupo controle (C), grupo Diabetes Mellitus (DM) e grupo Diabetes Mellitus + Infusion (DM + MSCs).

Parâmetros morfométricos	C	DM	DM+MSCs
Massa Muscular (g)	1,0 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
AST ( $\mu m^2/g$ body mass)	1,0 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1*	0,5 $\pm$ 0,1
Percentagem de tecido conjuntivo (%)	17,9 $\pm$ 0,5	34,5 $\pm$ 1,1*	19,4 $\pm$ 1,2 <sup>†</sup>
Número de fibras musculares	8,7 $\pm$ 1,2	20,2 $\pm$ 2,0*	42,2 $\pm$ 1,7* <sup>†</sup>

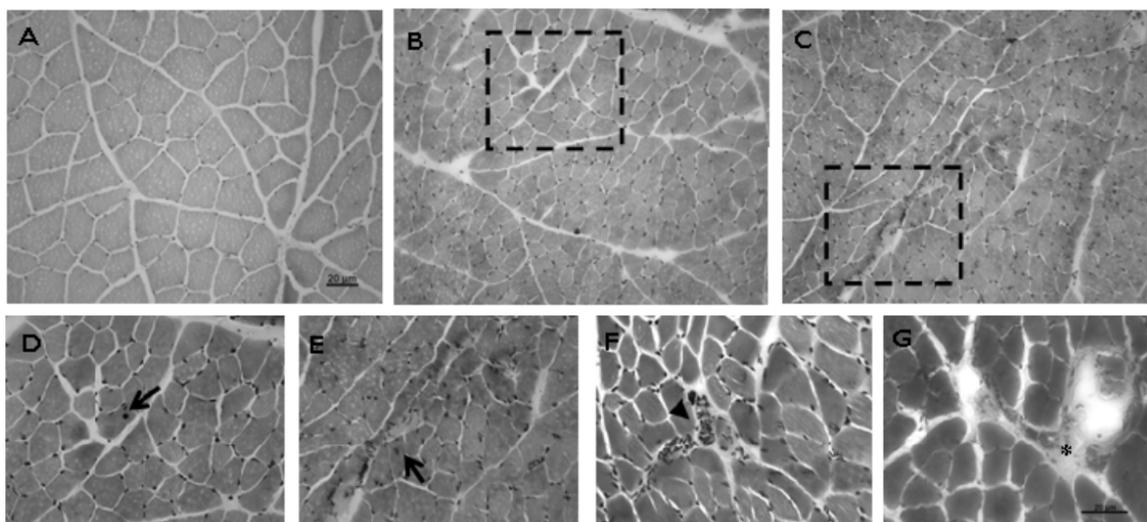


Figura 12 – Análise morfológica do músculo TA (A-G). A) Grupo Controle (C); B) Grupo Diabetes Mellitus (DM); C) Grupo Diabetes Mellitus tratado com MSCs (DM+MSCs); D) Fibras musculares com núcleos centralizados (seta); E) Fibras musculares com núcleos centralizados (cabeça de seta); F) Fibras musculares fragmentadas (seta); G) Fibras musculares com acúmulo de gordura intramuscular (asterisco).

Fonte: acervo pessoal.

#### 4.6.3 Análise do Tecido Conjuntivo

Em relação a porcentagem de tecido conjuntivo, observou-se aumento significativo no grupo DM (Figura 13B) em relação aos grupos C (Figura 13A) e DM+ MSCs (Figura 13C) ( $p = 0.0001$ ) (Figura 13) (Tabela 3).

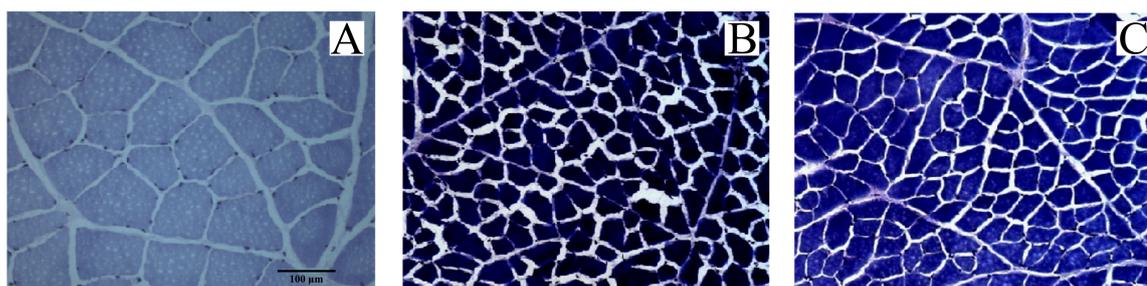


Figura 13 – Densidade do tecido conjuntivo. A) Grupo controle (C); B) grupo Diabetes Mellitus (DM); C) grupo Diabetes Mellitus tratado com MSCs (DM+MSCs). Seções transversais de fibras musculares do músculo tibial coradas com azul de toluidina (TB). †  $p < 0,05$  entre os grupos C e DM. \*  $p < 0,05$  entre os grupos DM e DM + Inf. Barra: 100  $\mu m$ .

Fonte: acervo pessoal.

## 4.7 ANÁLISE DE BIRREFRINGÊNCIA

A análise de birrefringência no músculo TA apresentou diminuição significativa no grupo DM quando comparado com o grupo C ( $p = 0.0001$ ) e o grupo DM+ MSCs ( $p = 0,0001$ ). Embora o grupo DM+ MSCs apresentou um aumento na porcentagem de birrefringência, ainda exibe diferenças com o grupo C ( $p = 0.0001$ ) (Figura 14).

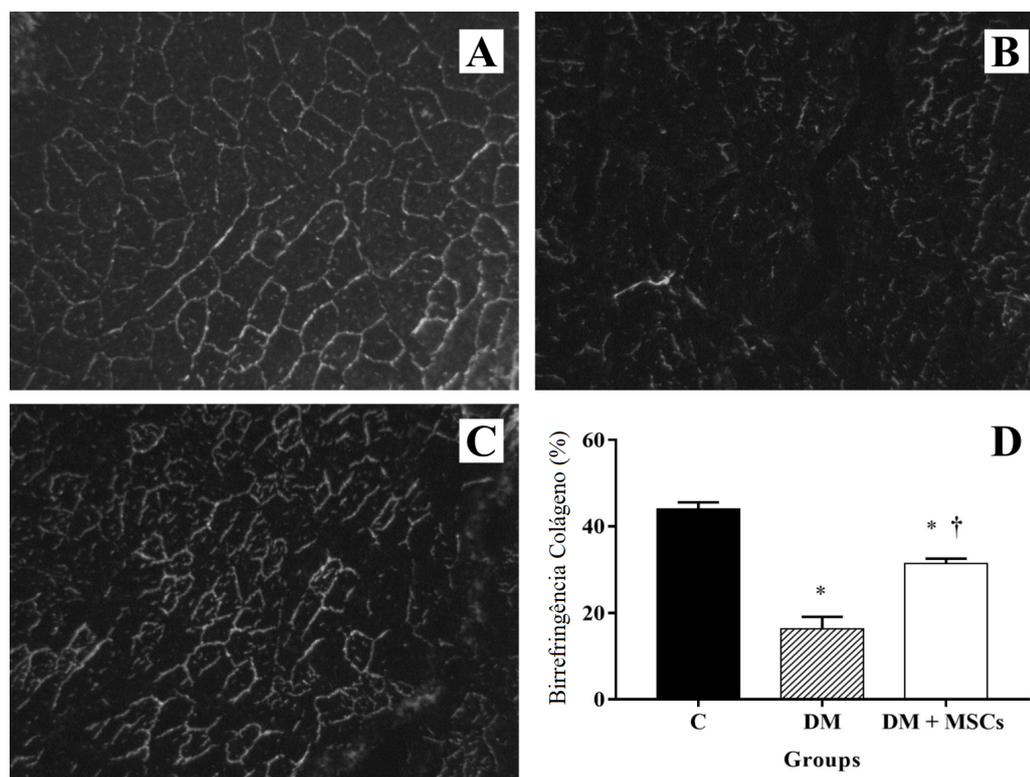


Figura 14 – Birrefringência das fibras de colágeno no tecido conjuntivo TA. A) Grupo C; B) Grupo DM; C) grupo DM + MSCs; D) Porcentagem de birrefringência de colágeno. Os valores são expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 6$  animais / grupo). \* vs. C,  $P < 0,001$ ; † vs. DM,  $P < 0,001$ . Barra de escala =  $100 \mu\text{m}$ . Fonte: acervo pessoal.

## 4.8 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

### 4.8.1 Imunoexpressão do Colágeno I

A imunoexpressão de Colágeno tipo I (Col I), foi determinada a partir da análise dos matizes castanhos escuros, encontrados nas fibras musculares. A imunoexpressão do Col I foi significativamente menor no grupo DM em comparação com os grupos C e DM + MSCs ( $P < 0,05$ ) (Figura 15).

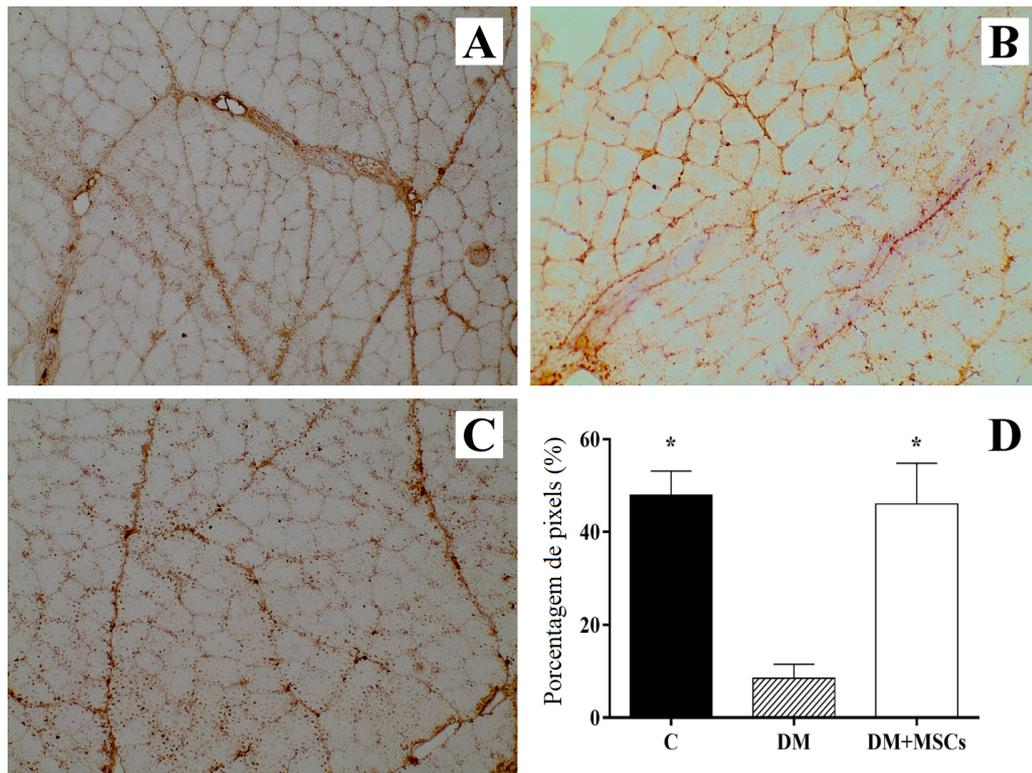


Figura 15 – A, B e C, fotomicrografias representativas da imunopressão do colágeno I (Col I) (setas) no músculo TA do Grupo Controle (C), Grupo Diabetes Mellitus (DM) e Grupo Diabetes Mellitus tratado com MSCs (DM+MSCs), respectivamente. D, análise quantitativa da imunopressão do Col I (porcentagem de pixels %) no músculo TA. \* vs. DM,  $P < 0,001$ . Barra de escala =  $100 \mu m$ .

Fonte: acervo pessoal.

#### 4.8.2 Imunoexpressão do Colágeno III

A imunoexpressão de Colágeno tipo III (Col III), foi determinada a partir da análise dos matizes castanhos escuros, encontrados nas fibras musculares. A imunoexpressão do Col III foi significativamente menor no grupo DM em comparação aos grupos C e DM + MSCs ( $P < 0,05$ ), no entanto, aumentou no grupo DM + MSCs em comparação com o grupo DM (Figura 16).

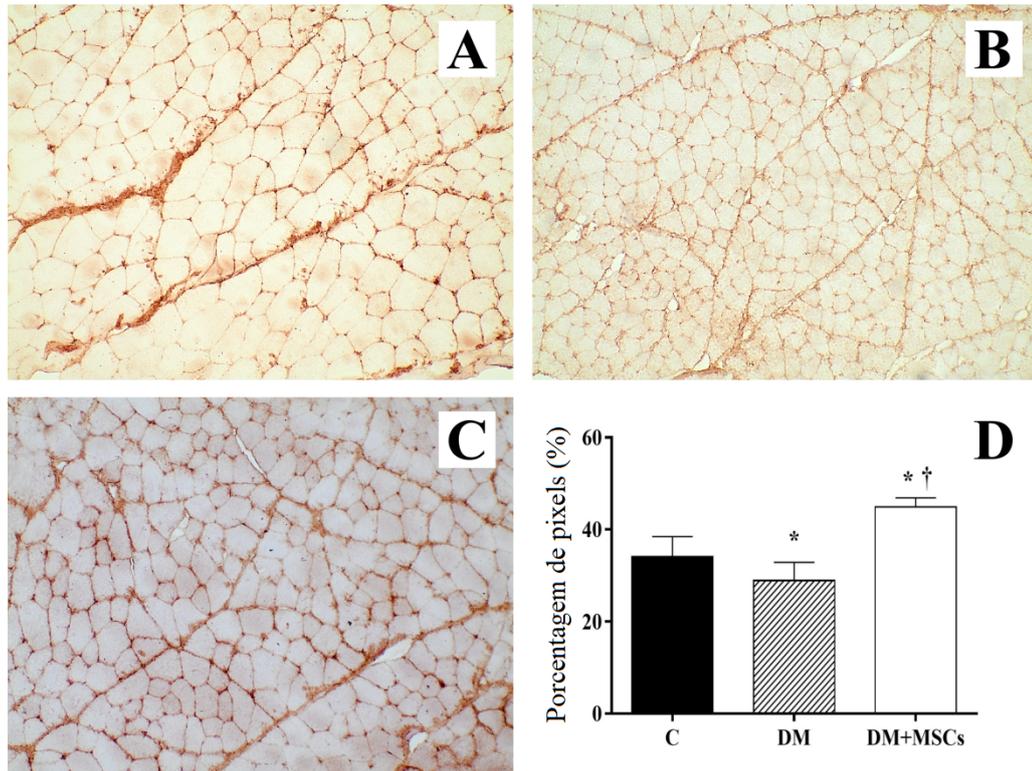


Figura 16 – A, B e C, fotomicrografias representativas da imunoposição do colágeno III (Col III) (setas) no músculo TA do Grupo Controle (C), Grupo Diabetes Mellitus (DM) e Grupo Diabetes Mellitus tratado com MSCs (DM+MSCs), respectivamente. D, análise quantitativa de Col III (porcentagem de pixels %) no músculo TA. \* vs. C,  $P < 0,001$ ; †vs. DM,  $P < 0,001$ . Barra de escala =  $100 \mu m$ .

Fonte: acervo pessoal.

## 4.9 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO

A Área de Secção Transversa (AST) correlacionou-se positivamente com a birrefringência do colágeno ( $r = 0,88$ ;  $P < 0,001$ ) e desempenho motor ( $r = 0,59$ ;  $P = 0,02$ ) e negativamente com a porcentagem de tecido conjuntivo ( $r = -0,74$ ;  $P < 0,01$ ) e número de fibras musculares ( $r = 0,71$ ;  $P < 0,01$ ) (Figuras 17A-17D). O desempenho motor correlacionou-se positivamente com a birrefringência de colágeno ( $r = 0,83$ ;  $P < 0,0001$ ) e negativamente correlacionado com a porcentagem de tecido conjuntivo ( $r = -0,94$ ;  $P < 0,0001$ ) (Figuras 17E-17F).

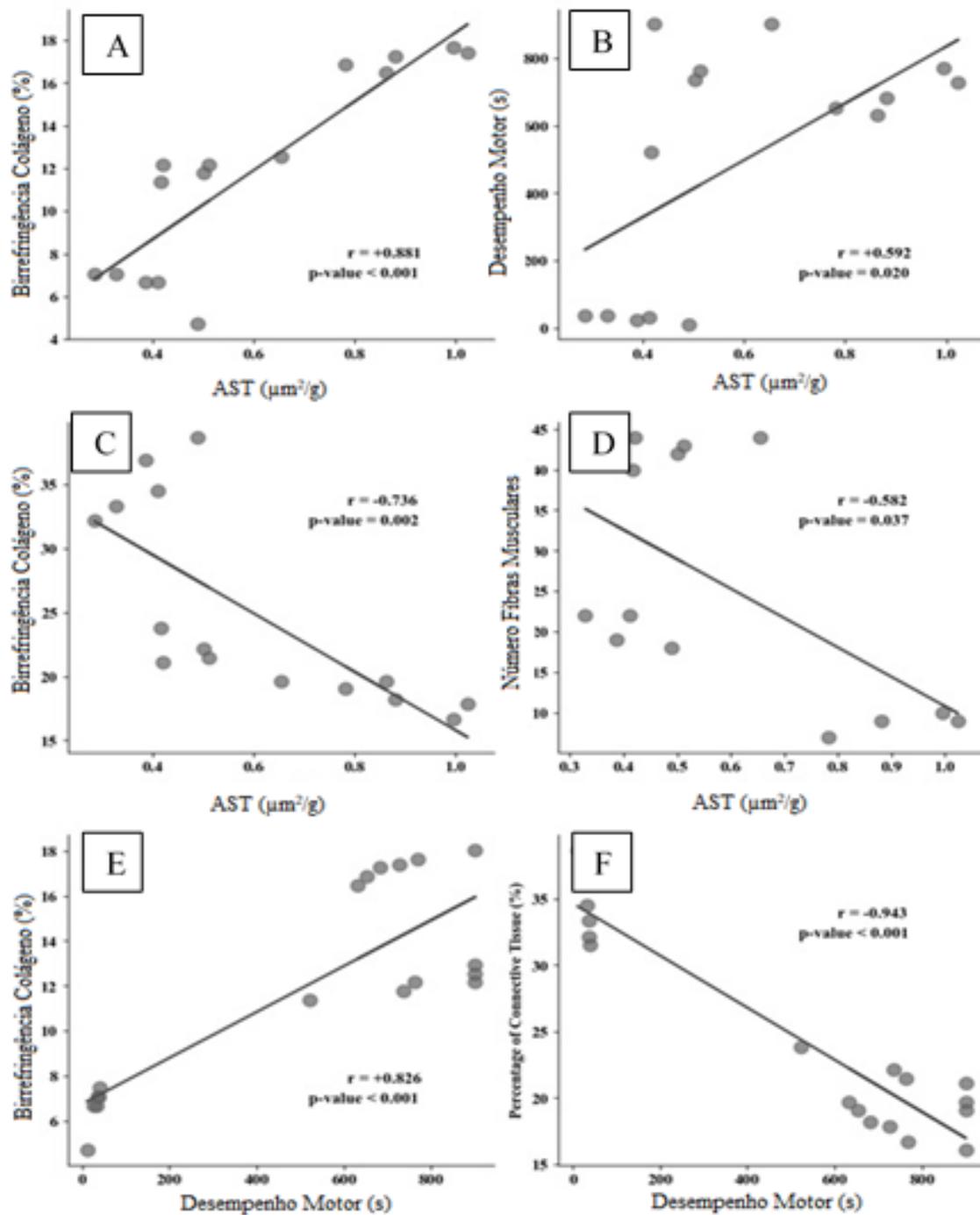


Figura 17 – Análise de correlação. A Área de Secção Transversa (AST) correlacionou-se positivamente com a birrefringência de colágeno (A) e o desempenho motor (B) e negativamente com a porcentagem de tecido conjuntivo (C) e o número de fibras musculares (D). O desempenho motor correlacionou-se positivamente com a birrefringência de colágeno (E) e negativamente com a porcentagem de tecido conjuntivo (F).

Fonte: acervo pessoal.

## 5 DISCUSSÃO

Diabetes descreve uma desordem metabólica de múltipla etiologia, caracterizado por hiperglicemia crônica decorrente de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A literatura sugere que a hiperglicemia pode ser globalmente pró-inflamatória, ter efeitos específicos e bloquear o sistema imune inato. Isso possivelmente contribui para aumentar a lesão muscular em indivíduos diabéticos. Além de mudanças na função celular, outros componentes da resposta imune inata contribuem para o estado pró-inflamatório na hiperglicemia, como mostrado por alguns autores, onde *in vitro*, os monócitos humanos mostram um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 dependente da glicose (GODOI et al., 2011).

Indivíduos diabéticos apresentam múltiplas alterações no músculo esquelético, muitas delas relacionadas com neuropatia diabética, que atinge por sua vez o tecido conjuntivo. Devido a isso, é comum observar nestes indivíduos o desenvolvimento da atrofia neural e muscular que ao longo do tempo resulta em fraqueza e incapacidade física (PEPATO et al., 1996; UMEGAKI, 2016; VOLPATO et al., 2012). Por sua vez, a fraqueza muscular é desencadeada pela redução das miofibras e do calibre muscular ocasionando diminuição da atividade motora (CASEIRO et al., 2015; SABADINE et al., 2018) com aumento da degradação proteica juntamente com diminuição da síntese de proteínas nos músculos esqueléticos (FUJIMAKI et al., 2015).

Relatos da literatura correlacionam os distúrbios musculares ocasionados pelo diabetes com as funções motoras, como os relatados por Volpato e colaboradores (2012), onde indivíduos idosos diabéticos sofrem alterações na densidade, qualidade e força muscular, o que se traduz em desordens e lentidão no teste de marcha.

Sabadine e colaboradores (2018), relataram em seu estudo que as modificações morfológicas desencadeadas pela DM afetam diretamente a atividade motora refletindo em alterações significativas na marcha. Por outro lado, Souayah e colaboradores (2009), demonstraram que apesar da perda de unidades motoras acarretarem mobilidade reduzida, nenhuma diferença significativa no tempo do teste Rota Rod foi observada, sendo sugerido uma possível compensação nas fibras musculares afetadas, o que pode proporcionar um equilíbrio na função (SOUAYAH et al., 2009).

No presente estudo a coordenação motora foi testada pelo teste Rota Rod encontrando-se diferenças significativas entre os grupos. Desta forma nossos resultados discordam dos achados de Souayah e colaboradores. Entretanto vale ressaltar que os tempos experimentais avaliados nos estudos foram diferentes, sendo proposto no presente estudo avaliações até a 10<sup>a</sup> semana após a indução da DM1, promovendo assim um efeito mais acentuado da

doença, o que pode ter interferido nos mecanismos compensatórios relatados.

Outro achado importante nos animais com DM, foi a perda de massa do músculo tibial anterior (constituído predominantemente por fibras do tipo II) e a confirmação da atrofia pela análise da área de secção transversa. Aughsteen e colaboradores (2006) demonstraram em seu estudo diminuição da área de secção transversa (AST) nos músculos reto femoral e extensor longo digital, dois músculos também constituídos por fibras do tipo II, após 4 semanas após a instalação da DM. Com tais achados é indispensável a correlação com a capacidade das fibras musculares em alterar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com os estímulos a que são submetidas e, com isso, ativarem vias proteolíticas específicas.

Diante destas descobertas, o estudo foi conduzido e direcionado à investigação dos mecanismos intrínsecos relacionados à atrofia muscular, pois foi observado aumento na porcentagem de tecido conjuntivo no músculo tibial anterior nos animais pertencentes ao grupo diabético. Tais características induzem ao estabelecimento de uma fibrose tecidual local e por isso, a avaliação das MMPs 2 e 9 poderiam auxiliar no entendimento mais preciso relacionado aos processos de remodelação e produção da MEC.

A MEC também é responsável em regular a atividade das células adjacentes, participa do desenvolvimento, reparo e da função da integridade do músculo esquelético. Tem sido relatado que as interações entre MEC e células-tronco existentes no músculo são recíprocas e que estas células quando ativadas sintetizam vários componentes da MEC, incluindo colágenos, fibronectina e MMPs (DE LISIO et al., 2014; GUÉRIN; HOLLAND, 1995).

Em relação ao colágeno especificamente, importantes achados foram encontrados em nosso estudo, pois foi possível constatar mediante análise morfométrica, o aumento na porcentagem de tecido conjuntivo no músculo TA dos animais diabéticos, o que reforça a informação de que a incorporação de glicose em proteínas da MEC observadas em tendões de animais com DM está associada a distúrbios funcionais musculares (PATEL; SABBAGHI; CARROLL, 2018), com alterações significativas nas propriedades físico-químicas dos feixes de colágeno.

Um dos primeiros trabalhos que descreve as mudanças que ocorrem no colágeno glicosilado, foi apresentado por Andreassen e colaboradores (1998). Contudo, os autores apontam as diferenças encontradas nas propriedades de autofluorescência e na agregação cristalina do colágeno de animais diabéticos e também o colágeno não glicosilado. Diglot e colaboradores (2001), também demonstraram tais alterações, em que o acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs) diminuem o *turnover* de colágeno *in vitro* (DEGROOT et al., 2001), o que prejudica a produção desta proteína e conseqüentemente o processo de recuperação e reparo muscular.

Mediante os relatos anteriores, fica evidente que o DM altera as propriedades físico-químicas dos feixes de colágeno e podem ocasionar degradação da MEC, o que afeta diretamente a síntese do colágeno. Porém, a escassez de relatos sobre esta relação e sua participação na integridade da MEC dificulta o entendimento e a correlação dos resultados encontrados (CONNIZZO et al., 2014; KNAŠ et al., 2015; WOOD; O'NEILL, 2012). Sabe-se somente que no processo de reparo tecidual ocorre a proliferação e diferenciação de fibroblastos que são responsáveis pela síntese de colágeno, sendo o colágeno tipo III considerado imaturo e sintetizado nas fases iniciais do processo, e após processo de maturação passa a ser considerado colágeno do tipo I, sendo este mais resistente e com caráter estrutural (KNAŠ et al., 2015).

Alguns autores abordam o uso da anisotropia óptica, especificamente a birrefringência, para determinar o aspecto e o direcionamento das fibras de colágeno (CONNIZZO et al., 2014; WOOD; O'NEILL, 2012), assim como descrito por Vidal e colaboradores (2010), em diferentes tipos de tecidos incluindo o tendão. As alterações na birrefringência intrínseca das fibras de colágeno provocadas pelo diabetes evidenciam a ocorrência de modificações nos níveis de cristalinidade. Entretanto, estas alterações aparentemente podem também estar relacionadas a diferentes variáveis, como fatores externos, dentre eles o fluxo sanguíneo, taxa de difusão, requerimentos nutricionais, bem como o grau de cronicidade da doença (Wang et al 2003; Mentink et al 2002).

Em nosso estudo foi possível observar uma diminuição da birrefringência das fibras nos ratos diabéticos e um aumento do número de fibras nos ratos diabéticos tratados, o que induz ao entendimento que as múltiplas infusões de CTM, contribuíram para o aumento da organização macromolecular do colágeno. Sendo assim, vale destacar a forte correlação positiva entre a % de birrefringência das fibras de colágeno com a AST e a atividade motora, pois embora tais correlações não expressem necessariamente "causa e efeito", ajudam a estabelecer associações importantes no microambiente em torno das fibras musculares, em que a organização e maturação do colágeno indica a melhora funcional do músculo diabético tratado com MSCs.

Lehti e colaboradores (2005), investigaram os efeitos do diabetes no músculo esquelético de ratos, em um modelo compatível com o do nosso estudo. Eles demonstraram diminuição na expressão gênica de vários colágenos, advindos da diminuição de glicoproteínas não colagênicas e proteoglicanos (LEHTI et al 2005). Estes achados reforçam os achados de Han et al. (1995), que também encontraram diminuição referente ao metabolismo do colágeno no músculo quando acometido pela síndrome metabólica (HAN X et al 1995). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que tal complicação (expressão gênica reduzida de colágenos, glicoproteínas não-colágenas e proteoglicanos) muscular foi parcialmente atenuada quando tratada com treinamento físico regular (HAN; SIN; YOON, 2013; LEHTI et al., 2005).

Similarmente, DeGroot e colaboradores (2001), acreditam que as alterações no metabolismo do colágeno e consequentemente na MEC estão estreitamente relacionadas com o acúmulo de AGEs, ocasionando diminuição na taxa de renovação ao inibir a síntese da proteína. No presente estudo, observamos que no grupo tratado houve uma diminuição do Col I quando comparado com o grupo Controle e o grupo DM1. Já em relação ao Col III, obteve-se um aumento quando comparado ao grupo Controle. Este fato pode indicar uma melhora da qualidade muscular em que os processos de remodelação foram ativados aumentando a síntese de proteína nos animais do grupo diabético tratado com MSCs.

É importante destacar que a aplicação de MSCs de forma sistêmica e local vem sendo cada vez mais investigada para tratar diferentes patologias (MICHELLE S. DOTZERT, et al 2016). No tecido muscular, a infusão local e sistêmica de MSCs visa contribuir diretamente para a miogênese sendo cruciais para promover a diferenciação e a resolução dos quadros inflamatórios e degenerativos, além de auxiliar o processo de reparo em modelo experimental. No entanto, o mecanismo molecular da ação das MSCs no reparo das fibras musculares e ainda na função motora global não são completamente compreendidos (BEST; GHARAIBEH; HUARD, 2013; CASEIRO et al., 2015).

Recentes investigações têm utilizado a terapia com MSCs para o tratamento da DM1, de modo ativar as células satélites degradadas, e tentar reduzir os níveis de glicemia (FUJIMAKI et al., 2015; SENA et al., 2010). Por outro lado, Caseiro et al., 2015 relataram que a aplicação sistêmica as MSCs são capazes de interagir com os tecidos musculares e com suas funções detectadas de forma local no músculo de interesse, porém não observaram evidências de efeitos sistêmicos relacionados à glicemia, corroborando os nossos resultados.

É importante indicar como limitação potencial do presente estudo a falta de análise de componentes envolvidos no remodelamento da MEC como MMPs e Inibidor de Tecidos de Metaloproteinases (TIMPs). Segue como sugestão, que trabalhos futuros que envolvam o mesmo tema, se dediquem a investigar o potencial mecanismo molecular envolvido na ação da MEC e sua relação com o processo de reparo quando a síndrome metabólica está instalada. Como inovação, o presente estudo aborda as características observadas com relação a atividade motora bem como as desordens do colágeno encontradas no ambiente muscular e reforça que tais resultados auxiliem nas futuras pesquisas para alternativas de tratamento para diabéticos mediante o uso de células tronco.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que o transplante de MSCs pode melhorar a função motora e aumentar a organização macromolecular do colágeno em um modelo de DM do tipo 1.

As MSCs influenciaram positivamente o músculo esquelético diabético e podem ser consideradas uma potencial terapia para minimizar os danos musculares desencadeados por esta patologia.

# 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: From basic biology to clinical applications. *Gene Therapy*, v. 15, n. 2, p. 109-116, 2008.

ALMEIDA, C. F. et al. Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem Cell International*, v.16, p. 7-21,2016.

ARNESEN, S. et al. The Effects of Collagen Type I Topography on Myoblasts In Vitro. *Connective Tissue Research*, v. 45, p. 238-247, 2004.

ASAKURA, A. et al. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*, v. 159, p. 123-134, 2002.

BALDWIN, K. M.; HADDAD, F. highlighted topics. *J Appl Physiol*, v. 92697, p. 345-357, 2001.

BERCHTOLD, M. W. et al. Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function , Plasticity , and Disease. *Physiological Reviews*, v. 80, p. 1215-1265, 2000.

BEST, T. M.; GHARAIBEH, B.; HUARD, J. Stem cells, angiogenesis and muscle healing: A potential role in massage therapies *Postgraduate Medical Journal*, v. 89, p. 666-670, 2013.

BICAS, H. E. A. Células satélites musculares. *Arq Bras Oftalmol.*, v. 67, p. 681-687, 2004.

BISHARA, N. B. et al. Matrix protein glycation impairs agonist-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 193, p. 80-92, 2002.

BOBIS, S. ET AL. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, v. 44, p. 215-230, 2006.

BROEK, R. W. T. E. N.; GREFTE, S.; HOFF, J. W. V. O. N. D. E. N. Regulatory Factors and

Cell Populations Involved in Skeletal Muscle Regeneration. *J. Cell. Physiol*, v. 224, p. 7-16, 2010.

BROWN, J. M. et al. Bone Marrow Stromal Cells Inhibit Mast Cell Function Via a COX2 Dependent Mechanism. *Clin Exp Allergy*, v. 41, p. 526-534, 2012.

CAETANO, G. F. et al. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, v. 103, p. 1013-1022, 2015.

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, v. 213, p. 341-347, nov. 2007.

- CARLSON, B. M. et al. The biology and restorative capacity of long-term denervated skeletal muscle. *The Biology and Restorative Capacity of Long-Term Denervated Skeletal Muscle*. *Basic Appl Myol*, v.12, p. 247-254, 2002.
- CASEIRO, A. R. et al. Trends in Mesenchymal Stem Cells' Applications for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. *Progress in Stem Cell Transplantation*, v. 1, p. 138-163, 2015.
- CEAFALAN, L. C.; POPESCU, B. O.; HINESCU, M. E. Cellular Players in Skeletal Muscle Regeneration. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-21 2014.
- CHACON HESZELE AND PRICE. Insulin-Like Growth Factor I: The Yin and Yang of. *Endocrinology*, v. 145, n. 11, p. 4803-4805, 2004.
- CHARGE, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Ver*, v. 84, p. 209-238, 2004.
- CHENG, C. et al. Isolation and Characterization of Novel Murine Epiphysis Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, v. 7, p. 7-14, 2012.
- CHONKAR, A. et al. Contraction and cation contents of skeletal soleus and EDL muscles in age-matched control and diabetic rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1084, p. 442-451, 2006.
- CONNIZZO, B. K. et al. Diabetes alters mechanical properties and collagen fiber re-alignment in multiple mouse tendons. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 42, p. 1880-1888, 2014.
- COTTER, M. et al. Effects of long-term streptozotocin diabetes on the contractile and histochemical properties of rat muscles. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, v. 74, p. 65-74, 1989.
- COUTINHO, E. L. et al. Bouts of passive stretching after immobilization of the rat soleus muscle increase collagen macromolecular organization and muscle fiber area. *Connective Tissue Research*, v. 47, p. 278-286, 2006.
- CRUZ, N. G. et al. The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 99, p. 85-92, 2013.
- CUNHA, A. DA; PARIZOTTO, N. A.; CAMPOS VIDAL, B. DE. The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (Tendo calcaneus) of the rat. *Ultrasound in Medicine and Biology*, v. 27, p. 1691-1696, 2001.
- DE LISIO, M. et al. Substrate and strain alter the muscle-derived mesenchymal stem cell secretome to promote myogenesis. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 5, p. 1-12, 2014.
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, v. 28, p. 875-884, 2000.
- DEGROOT, J. et al. Accumulation of Advanced Glycation End Products Decreases

- Collagen Turnover by Bovine Chondrocytes. *Experimental Cell Research*, v. 266, n. 2, p. 303-310, jun. 2001.
- FERREIRA, R. S.; FAZAN, V. P. S. Diabete como modelo de neuropatia autonômica. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 39, n. 1, p. 28-38, 2006.
- FRONTERA, W. R.; OCHALA, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int*, v. 96, p. 183-195, 2015.
- GODARA, P.; NORDON, R. E.; MCFARLAND, C. D. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 407, n. September 2007, p. 397-407, 2008.
- GODOI, V. DE et al. Avaliação da lesão muscular após estiramento controlado em ratos diabéticos. *ConScientiae Saúde*, v. 10, p. 201-209, 2011.
- GUÉRIN, C. W.; HOLLAND, P. C. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells. *Developmental Dynamics*, v. 202, p. 91-99, 1995.
- HAN, J. W.; SIN, M. Y.; YOON, Y. S. Cell therapy for diabetic neuropathy using adult stem or progenitor cells. *Diabetes and Metabolism Journal*, v. 37, p. 91-105, 2013.
- HICKEY, S. et al. The insulin action-fiber muscle group specific type relationship in humans is. *The American Physiological Societyphysiological Society*, v. 32, p. 50-54, 1995.
- HIGAKI, Y. et al. a Mechanism That Is Distinct From the Insulin and Contraction Pathways in Rat Skeletal Muscle. *Diabetes*, v. 50, p. 241-247, 2001.
- HOOD, D. A. Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle Invited Review: Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, v.90, p. 1137-1157, 2001.
- HORNBERGER, L. K. et al. Synthesis of Extracellular Matrix and Adhesion Through 1 Integrins Are Critical for Fetal Ventricular Myocyte Proliferation. *Circ Res.*, v. 87, p. 508-515, 2000.
- HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Curr Opin Hematol*. v. 7, p. 393-395, 2005.
- JEONG, J. et al. Malignant Tumor Formation After Transplantation of Short-Term Cultured Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Experimental Myocardial Infarction and Diabetic Neuropathy. *Circ Res*, v.108, p. 1340-1347. 2011.
- KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B. M. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 5, p. 209-214, 2004.

- KERKIS, I. et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy ( GRMD ) dogs: Local or systemic Journal of Translational Medicine, v. 13, p. 1-13, 2008.
- KHALIL, C. A. et al. Cause-specific mortality in diabetes: Recent changes in trend mortality. European Journal of Preventive Cardiology, v. 19, p. 374-381, 2012.
- KIM, B. J.; JIN, H. K.; BAE, J. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve the Functioning of Neurotrophic Factors in a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. Lab Anim Res, v. 27, n. 2, p. 171-176, 2011.
- KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, T. J. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. Pediatric Diabetes, v.12, p. 345-364, 2010.
- LEHTI, T. M. et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of extracellular matrix proteins in mouse skeletal muscle. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 290, p. E900-E907, 2005.
- LEMISCHKA, I. R. Stem cell biology: A view toward the future. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1044, p. 132-138, 2005.
- LIEBER, R. L. Skeletal Muscle Anatomy. In: Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity Baltimore, Md. : Lippincott Williams & Wilkins, c2002, p. 1-109.
- LIN, H.; OTSU, M.; NAKAUCHI, H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. Philosophical Transactions of the Royal Society, v.368, p. 4-6, 2012.
- MC PHERRON ALEXANDRA C.; ANN M. LAWLER; SE-JIN LEE. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- B superfamily member. Nature, v.387, p. 345-355,1997.
- MENTINK, C. J. A. L. et al. Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin. Clinica Chimica Acta, v. 321, n. 1-2, p. 69-76, 2002.
- MIMEAULT, M.; HAUKE, R.; BATRA, S. K. Stem Cells: A Revolution in Therapeutics - Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies. Nature, v. 82, n. 3, 2007.
- MORROW, T. J. Animal Models of Painful Diabetic Neuropathy: The STZ Rat Model. Current Protocols in Neuroscience, p. 1-11, 2004.
- NAGAYA, N. et al. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells. Circulation, v. 112, p. 5-7, 2005.
- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Review in translational hematology Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood, v. 110, n. 10, p. 3499-3507, 2007.
- OTTERÇO, A. N. et al. Mailing address. Journal of Photochemistry & Photobiology, B:

Biology, v. 183, p. 22-29, 2018.

PATEL, S. H.; SABBAGHI, A.; CARROLL, C. C. Streptozotocin-induced diabetes alters transcription of multiple genes necessary for extracellular matrix remodeling in rat patellar tendon. *Connective Tissue Research*, v. 59, p. 447-457, 2018.

PEPATO, M. T. et al. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin-diabetic rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 271, n. 2, p. E340-E347, 1996.

PETTE, D. W. G. The Adaptive Potential of Skeletal Muscle Fibers. *Can. J. Appl. Physiol.*, v.27, p. 423 -448, 2002.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, v. 284, p. 143-148, 1999.

PURSLOW, P. P. The structure and functional significance of variations in the connective tissue within muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v. 133, p. 947-966, 2002.

RAMAMURTHY, B. et al. Changes in myosin structure and function in response to glycation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 15, p. 2415-2422, 2001.

RINGE, J.; KAPS, C. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften*, v.89, p. 338-351, 2002.

RUSSO, T. L. et al. Electrical stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression but does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle and Nerve*, v. 37, p. 593-600, 2008.

RUSSO, T. L. et al. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v. 31, p. 45-57, 2010.

SABADINE, M. A. et al. Effects of mesenchymal stromal cells on type 1 diabetes mellitus rat muscles. *Muscle and Nerve*, v. 58, p. 583-591, 2018.

SACCO; SARTOR C.D , GOMES A, J. S. E. C. R. AVALIAÇÃO DAS PERDAS SENSÓRIO-MOTORAS DO PÉ E TORNOZELO DECORRENTES DA NEUROPATIA DIABÉTICA. *Rev. bras. fisioterapia*, v. 11, p. 27-33, 2007.

SECCO, M.; JR, C. B.; VIEIRA, N. M. Systemic Delivery of Human Mesenchymal Stromal Cells Combined with IGF-1 Enhances Muscle Functional Recovery in LAMA2 dy / 2j Dystrophic Mice. *Stem Cell Rev and Rep*, v. 9, p. 93-109, 2012.

SENA, C. M. et al. Diabetes mellitus: New challenges and innovative therapies. *EPMA Journal*, v. 1, n. 1, p. 138-163, 2010.

- SHARMA, M. et al. Myostatin , a Transforming Growth Factor- Superfamily Member , Is Expressed in Heart Muscle and Is Upregulated in Cardiomyocytes After Infarct. *Journal of cellular Physiology*, v. 9, p. 1-9, 1999.
- SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. and Clinical Practice Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 87, p. 4-14, 2010.
- SHENKMAN, B. S. et al. Skeletal Muscle Activity and the Fate of Myonuclei. *Acta Naturae*, v. 2, p. 59-65, 2010.
- SHIBATA, T. et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes*, v. 57, n. 11, p. 3099-3107, 2008.
- SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, v. 6, p. 457-478, 2011.
- SNOW, L. M.; THOMPSON, V. Influence of Insulin and Muscle Fiber Type in N - ( Carboxymethyl ) -Lysine Accumulation in Soleus Muscle of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *Pathobiology*, p. 227-234, 2009.
- SOUAYAH, N. et al. Motor unit number estimate as a predictor of motor dysfunction in an animal model of type 1 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 297, p. E602-E608, 2009.
- SOUZA, D. M. D. et al. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *R. bras. Ci. e Mov*, v. 4, n. December, p. 1-7, 2013.
- SUN, Y.-Q. et al. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Embryonic stem cells/ induced Pluripotent stem cells*, v. 30, p. 2692-2699, 2012.
- TAKALA, T. E.; VIRTANEN, P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*, v. 10, p. 321-325, 2000.
- THOMAS, M. et al. Myostatin , a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 40235-40243, 2001.
- THOMSON, J. A. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *SCIENCE*, v. 282, p. 1145-1148, 1998.
- UMEGAKI, H. Sarcopenia and frailty in older patients with diabetes mellitus. *Geriatrics and Gerontology International*, v. 16, p. 293-299, 2016.
- VELLEMAN, S.G., COY, C.S., GANNON, L., WICK, M., M.; D.C., 2000.  $\beta$  1 Integrin Expression During Normal and Low Score Normal Avian Myogenesis 1. *Poult. Sci*, v. 79, p. 1179-1182, 2000.
- VIDAL, B. D. C.; DE CARVALHO, H. F. Aggregational State and Molecular Order of

Tendons as a Function of Age. *Matrix*, v. 10, p. 48-57, 1990.

VIDAL, B. DE C.; MELLO, M. L. S. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: An approach to spatially resolved supramolecular organization. *Acta Histochemica*, v. 112, p. 53-61, 2010.

VOLPATO, S. et al. Role of muscle mass and muscle quality in the association between diabetes and gait speed. *Diabetes Care*, v. 35, p. 1672-1679, 2012.

WOOD, R. J.; O'NEILL, E. C. Resistance Training in Type II Diabetes Mellitus: Impact on Areas of Metabolic Dysfunction in Skeletal Muscle and Potential Impact on Bone. *Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 2012, p. 1-13, 2012.

YIN, H.; PRICE, F.; RUDNICKI, M. A. NICHE. Satellite cells and the muscle stem cell Niche. *Physiol Rev.*, v. 329, p. 23-67, 2013.

YUSUF, F.; BRAND-SABERI, B. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem Cell Biol*, v. 138, p. 187-199, 2012.

ZAMMIT, P. S.; PARTRIDGE, T. A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 54, p. 1177-1191, 2006.

ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Medical Hypotheses*, v. 69, p. 310-321, 2007.

ZHANG, S. et al. Comparison of Various Kinds of Bone Marrow Stem Cells for the Repair of Infarcted Myocardium: Single Clonally Purified Non-Hematopoietic Mesenchymal Stem Cells Serve as a Superior Source. *Journal of Cellular Biochemistry* 99:1132-1147, v. 1147, p. 1132-1147, 2006.

# Anexos

# ANEXO A – PREPARO DE SOLUÇÕES

## 1. Suplementação do meio $\alpha$ -MEM (Alpha Modifications Minimum Essential Medium)

- 10% SFB  $\rightarrow$  100mL
- 1% Antibiótico Pen/Srept  $\rightarrow$  10ML
- Glicose (2g/L)  $\rightarrow$  1g
- Glutamina ( 4,5mM)  $\rightarrow$  0,3654g
- Arginina (3mM)  $\rightarrow$  0,4358g \* para experimentos em longa escala.
- Hepes ( 18mM)  $\rightarrow$  4,2894g
- Bicarbonato (15mM)  $\rightarrow$  1,260g
- Completar até 1 L de água ultrapura (MilliQ).
- Para esterilização utilizar sistema de filtração (filtros de nitrocelulose 0,22 $\mu$ m).

## 2. Meio de Congelamento

Para o preparo de 30ml:

- 3mL de DMSO para cultura celular
- 27 mL de SFB.
- Esterilizar por filtração.(Filtro de seringa 0,22  $\mu$ m)

## 3. PBS 10X

- NaCl – 80g
- KCL– 2g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 12g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2g.
- Adicionar 800 mL de água ultrapura (MilliQ)
- Acertar o pH para 7,4.
- Adicionar água ultrapura (MilliQ) até 1000 mL (acertar volume no balão volumétrico).
- Agitar para misturar.
- Transferir para garrafa de vidro.
- Autoclavar para esterilizar

#### 4. PBS 1X

- Colocar num balão volumétrico 100 mL de PBS 10 X
- Completar com 900 ml de água ultrapura (MilliQ).
- Transferir para uma garrafa de vidro e autoclavar.

## ANEXO B – Contagem de células utilizando a câmara de Neubauer (hemacitômetro)

1. Colete a amostra assepticamente no fluxo laminar;
2. Limpe a Câmara de Neubauer e pressione a lamínula sobre ela. Verifique se houve a formação dos anéis de Newton (um conjunto de anéis coloridos semelhantes a um arco-íris). A ocorrência dos Anéis de Newton indica uma selagem firme entre a lamínula e o hemacitômetro. Somente dessa forma, o instrumento está pronto para o uso (Figura 18).

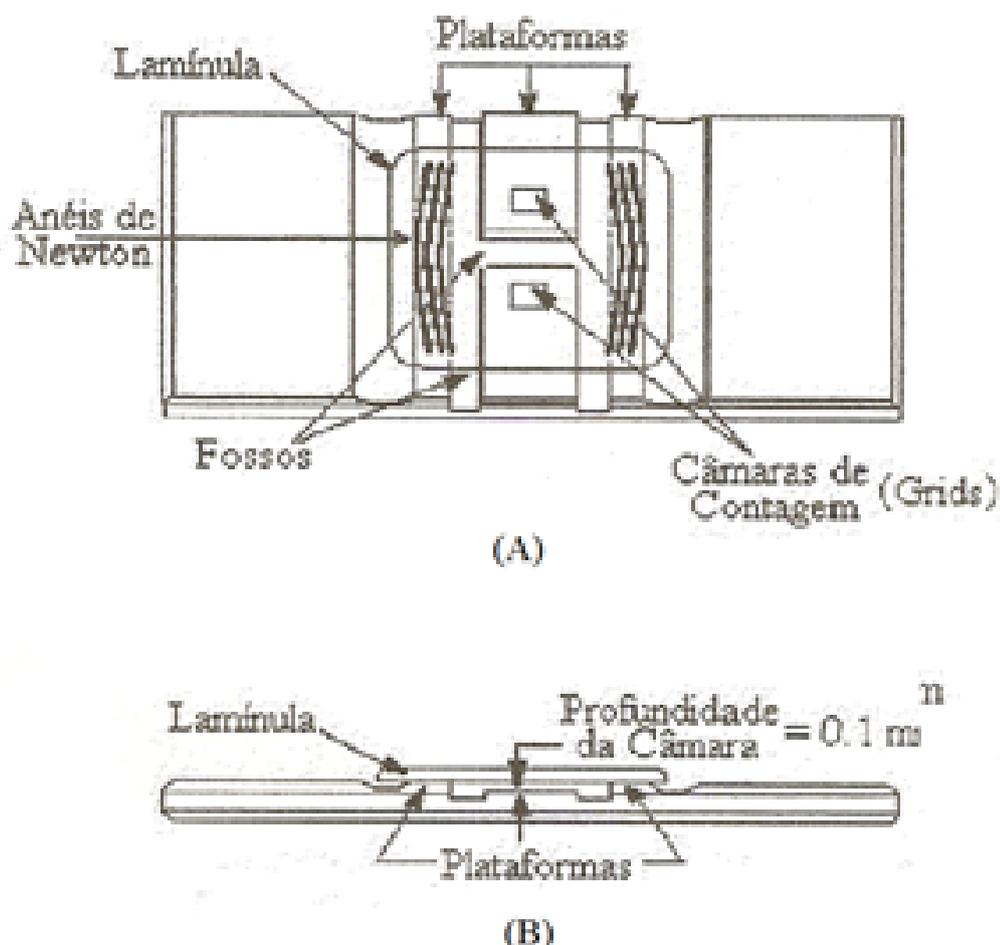


Figura 18 – Vista superior (A) e lateral (B) da Câmara de Neubauer.

3. Faça a diluição da amostra no corante azul de tripan 0,4%:  
 $20\mu\text{LL}$  de células /  $20\mu\text{LL}$  de corante ( $D=2$ )  
( $D$  é o fator de diluição)

4. Coloque a amostra diluída no corante em ambos os grids de contagem da câmara de Neubauer, assegurando que não há bolhas de ar e que não há lugares secos. Não deve haver vazamentos para fora do reservatório em torno dos grids;
5. Faça a contagem das células nos 4 quadrados grandes dos dois grids duas vezes, para cada amostra (Figura 18). Por convenção, células tocando a linha superior e linha a esquerda do quadrado são contadas, enquanto que aquelas que tocam a linha inferior e linha a direita do quadrado não são contadas. Considerando-se as linhas triplas do quadrado, a linha do meio é utilizada para definir os seus limites.

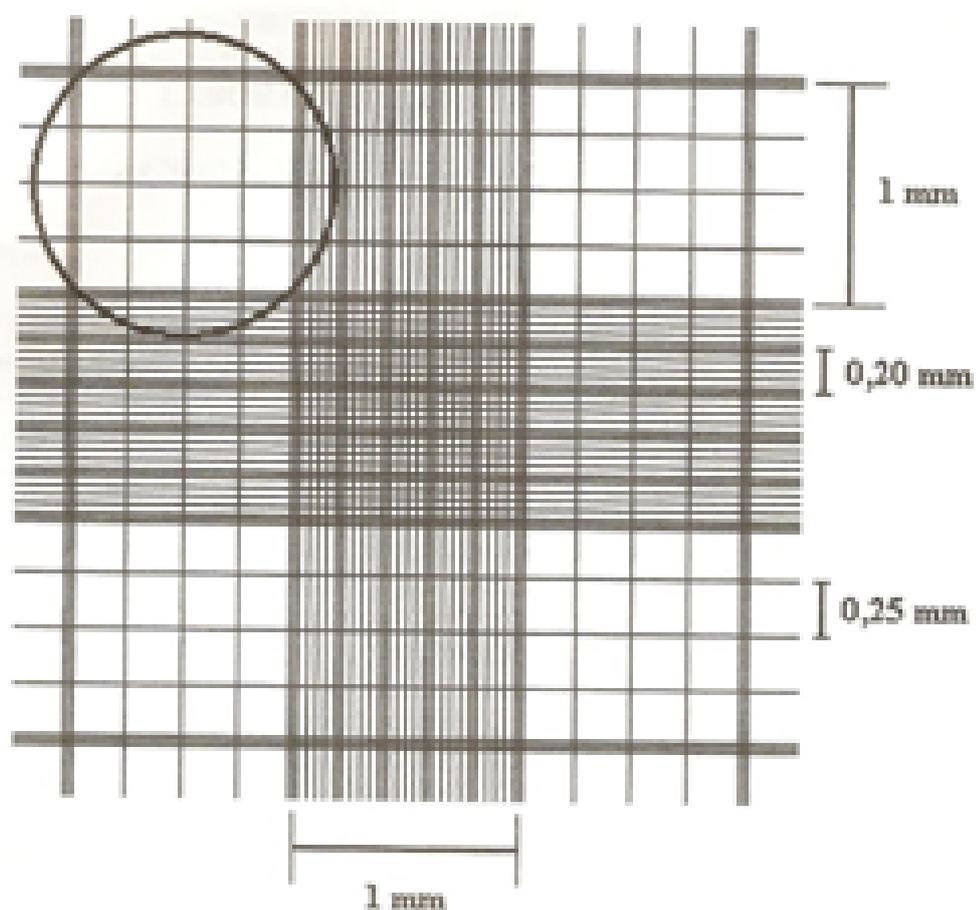


Figura 19 – Grid de contagem. Em destaque, a visão de um quadrado grande.

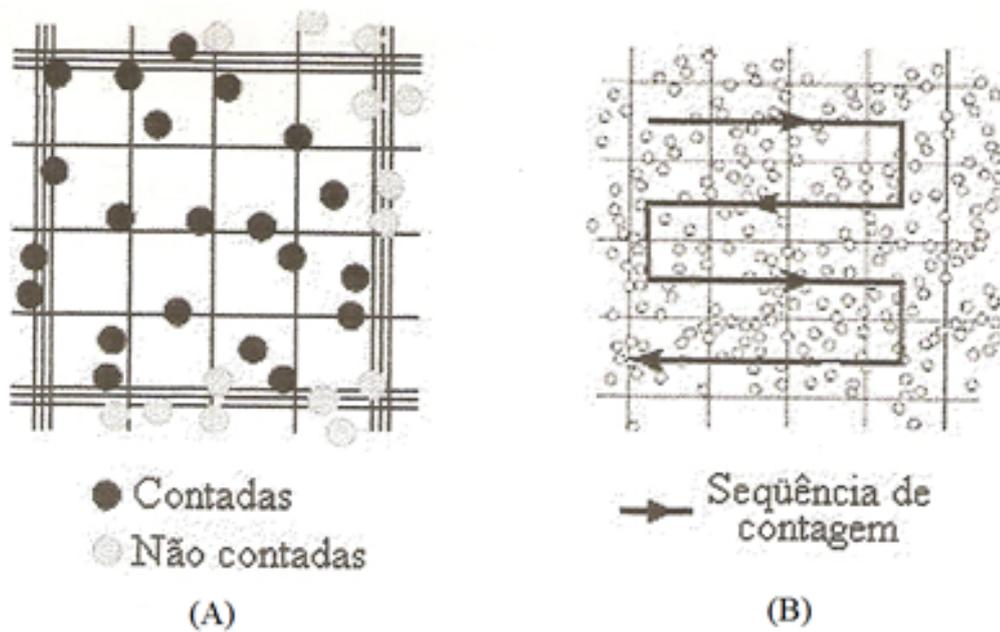


Figura 20 – Diferenciação de células a serem contadas de outras que não devem ser contadas em um quadrado (A) e sugestão de sequência a ser seguida quando da contagem de um quadrado (B).

6. Conte as células. Preste atenção na metodologia do corante utilizado. Sendo o corante o azul de tripan, conte as células não coradas (viáveis) com um contador na mão esquerda e as células coradas (não viáveis) com outro contador na mão direita;
7. Anote a contagem de cada quadrado em separado. Cada grid da câmara equivale a um evento;
8. Faça a média da contagem de cada quadrado grande. Em seguida, o cálculo da concentração celular, da viabilidade celular, da variância e do desvio padrão;

$$Densidade\ Celular(células \div ml) = (nv - nd) * D \div 10^{-4} \quad (B.1)$$

$$Viabilidade(\%) = (nv \div (nv + nd)) * 100 \quad (B.2)$$

Onde:

nv = número de células viáveis;

nd = número de células não viáveis;

D = Fator de diluição;

Volume de um quadrado grande da Câmara de Neubauer =  $10^{-4}$ ml.

$$(1mm \times 1mm \times 0,1mm = 0,1mm^3 = 10^{-4}ml) \quad (B.3)$$

Para fins práticos:

Nº de céls vivas  $\times 10^4 \longrightarrow$  Passar para Nº de céls  $\times 10^6$

Nº de céls vivas  $\times 10^6 \longrightarrow 1000 \mu\text{L}$

Nº de céls que você precisa  $\times 10^6 \longrightarrow X$

Fazer a regra de 3 para achar o valor de X.

# ANEXO C – Descongelamento de células

- Esquentar o meio de cultura utilizado até a temperatura adequada (37 °C).
- Separar duas alíquotas do meio de cultura , 9mL num falcom e 4mL num frasco T de 25 cm<sup>2</sup>.
- Retire o criotubo do Nitrogênio líquido. Utilize equipamentos de segurança (Máscara, luvas térmicas e óculos.)
- Deixe dentro do fluxo até descongelar.
- Após o descongelamento retirar o conteúdo do criotubo e colocar no falcon que contém o meio de cultura.
- Centrifugar 5 min 1500 rpm
- Retirar o sobrenadante com extremo cuidado sem encostar no pellet.
- Adicionar 1mL de meio de cultura, resuspending vigorosamente.
- Transferir o meio e as células para o frasco T.
- Colocar na Incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

# ANEXO D – Cultivo de células

- Após 3 a 4 dias do descongelamento as células passaram pelo procedimento de cultivo.
- Retire a garrafa da incubadora.
- Passe álcool 70% na base do microscópio invertido.
- Verifique as células no microscópio invertido
- Ligue o banho maria e coloque meio, PBS e tripsina/EDTA para aquecer
- Siga todos os procedimentos do uso do fluxo laminar
- Em fluxo remova o meio antigo girando a garrafa sem encostar as bordas, transferindo o conteúdo para um Becker (descarte). Utilize pipetas de 10mL.
- Lave as células com 3 ml (garrafa peq), 10ml (garrafa media) e 15ml (garrafa grande) de PBS, movimentando levemente as garrafas.
- Remova o PBS girando a garrafa sem encostar as bordas transferindo o conteúdo para o descarte.
- Coloque tripsina/EDTA (2,5 mL pq, 4 mL media e 10 mL grande), para cultivo de células com adesão forte utilize o scraper.
- Feche a garrafa.
- Leve para a incubadora por 5 a 7 minutos.
- Bata na garrafa para soltar as células aderidas
- Olhe no microscópio. As células devem se encontrar no formato arredondado.
- No fluxo adicione meio para neutralizar a tripsina (3 ml para garrafas pequenas, 6 ml para medias e 12 ml para grandes)
- Transfira o conteúdo para um tubo (15 ml)
- Centrifugue por 5 min, 1200 rpm, 10 °C (fibroblastos, mioblastos, macrófagos)
- Passe álcool no tubo
- Remova o meio girando cuidadosamente a garrafa
- Desmanche o pellet

- Ressuspenda as células em 1ml de meio
- Realize o procedimento de contagem das células.
- Separe em outros frascos Ex: 3 frascos com 200  $\mu\text{L}$  da suspensão de células em cada frasco com meio (5 ml para garrafa de 25  $\text{cm}^2$ , 12 ml para garrafa de 75  $\text{cm}^2$  e 30ml para garrafa de 125 $\text{cm}^2$ )
- Feche as tampas das garrafas
- Identifique a garrafa com caneta de retroprojektor  
Nome  
Tipo celular  
Data  
Passagem
- Limpar a base do microscópio com álcool 70%
- Olhar no microscópio
- Levar garrafas para a incubadora.
- Siga os procedimentos do fluxo para finalização de trabalho.

# ANEXO E – Congelamento de células

- Após tripsinizar e centrifugar as células despreze o meio cuidadosamente.
- Desmanche o pellet
- Ressuspenda no meio utilizado.
- Misture suavemente com pipeta
- Separe 20  $\mu\text{L}$  de suspensão e adicione 20  $\mu\text{L}$  de azul de trypan num microtubo
- Homogeneize devagar por 3 vezes
- Coloque 10  $\mu\text{L}$  em cada miolo da câmara Newbauer e vá ao microscópio (aumento 20x)
- Para congelar precisamos de  $1 \times 10^6$  células no mínimo por criotubo.
- Centrifugar 5 min 1500 rpm
- Identificar o tubo criogênico (nome célula, data, Nºde células, seu nome e passagem **super importante**).
- Desprezar o sobrenadante do tubo (15ml) centrifugado.
- Desmanche o pellet.
- Ressuspender no meio de congelamento (1ml para cada criotubo)
- Adicionar as células ao criotubo.
- Homogeinizar rapidamente
- Transferir imediatamente para o freezer  $-80\text{ }^\circ\text{C}$
- No dia seguinte transferir o tubo criogênico para a respectiva estante no nitrogênio líquido.