

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERINSTITUCIONAL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Maria Augusta Sabadine

**TRANPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS MELHORA A FUNÇÃO
MOTORA E MODULA MARCADORES DE
ATROFIA MUSCULAR EM RATOS
DIABÉTICOS**

São Carlos

2017

MARIA AUGUSTA SABADINE

**Transplante de Células Tronco Mesenquimais
Melhora a Função Motora e Modula Marcadores
de Atrofia Muscular em Ratos Diabéticos**

Tese de Doutorado apresentada como
requisito para a obtenção do título
Doutorado em Ciências Fisiológicas
pelo Programa de Pós-Graduação
Interinstitucional em Ciências Fisiológicas
através da Universidade Federal de São Carlos.

São Carlos

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Maria Augusta Sabadine, realizada em 10/10/2017:




Profa. Dra. Angela Merice de Oliveira Leal
UFSCar



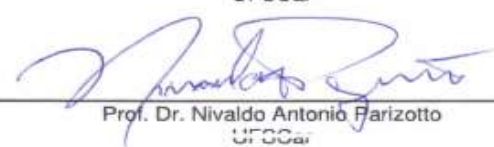
Profa. Dra. Maeli Dal Pai
UNESP



Prof. Dr. Rodrigo Bazan
UNESP



Profa. Dra. Tania de Fatima Salvini
UFSCar



Prof. Dr. Nivaldo Antonio Farizotto
UFSCar

Dedico este trabalho a todos aqueles
que sabem as dificuldades que tive,
principalmente a meus pais e amigos mais íntimos.

Agradecimentos

Quando olhamos para o nosso lado e vemos alguém que está sempre presente, uma pessoa que nunca nos deixa desanimar, só podemos estar gratos. Amigos que nos dão palavras de coragem e que lutam para nos ver felizes são raros hoje em dia. Por isso, gostaria de, em primeiro lugar, agradecer a todos que de uma forma ou de outra estiveram ao meu lado e me ajudaram a completar mais esta etapa.

Agradeço imensamente aos meus pais por estarem sempre ao meu lado e me apoiando. Sou muito grata pelo carinho e amor.

À querida Ângela Leal, minha orientadora por me apoiar em momentos difíceis durante essa trajetória e me inspirar profissionalmente. Sua experiência e conhecimento permitiram meu desenvolvimento profissional.

Ao querido Thiago Russo, não somente por abrir seu laboratório para o desenvolvimento de meu doutorado; mas também por estar sempre presente quando precisei; contribuindo com ideias, auxiliando no desenvolvimento do projeto e permitindo que eu crescesse não tão somente profissionalmente como também como pessoa.

À ambos, Ângela e Thiago, meu muitíssimo obrigado e espero poder continuar a trabalhar com vocês e que possamos desenvolver vários projetos juntos futuramente.

Agradeço meus (minhas) amigos (as) que estiveram comigo durante toda a graduação e pós-graduação que me proporcionaram momentos inesquecíveis, ajudando-me sempre a seguir em frente e a nunca desistir dos meus objetivos e sonhos; por mais duro que tenham sido alguns obstáculos. Obrigada pela amizade e por estarem sempre comigo.

Agradeço também ao técnico Sergio Dias por me ajudar com os cuidados com os ratos e a técnica Teresa por me ajudarem durante o desenvolvimento do projeto em laboratório.

À Prof. Dra. Keico por permitir abrir seu laboratório e biotério durante o período de testes com os animais.

Aos amigos de laboratório e, principalmente a Genoveva por realizar o cultivo das células-tronco.

Agradeço também a CAPES e FAPESP que viabilizaram este projeto e meus estudos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Aos professores da graduação e pós-graduação pelos ensinamentos.

Aos professores que estiveram comigo antes mesmo de eu iniciar a vida acadêmica, porque sem eles não também não estaria e chegaria até aqui. Agradeço principalmente ao Cláudio, meu “mentor” que me fez dar os primeiros passos dentro da Biologia. Você faz falta!

Agradeço todas as dificuldades que passei na vida. Elas foram grandes adversárias, mas que tornaram minhas vitórias mais saborosas.

Meu muito obrigada a todos!

“Somos todos geniais. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará sua vida inteira acreditando ser estúpido”.

(Albert Einstein)

“Gosto daquilo que me desafia. O fácil nunca me interessou. Já o obviamente impossível sempre me atraiu – e muito”.

(Clarice Lispector)

“Eu não sonhei com sucesso. Eu trabalhei para ele”.

(Estée Lauder)

“Imagine uma nova história para a sua vida e acredite nela”.

(Paulo Coelho)

Resumo

A hiperglicemia em decorrência do *Diabetes Mellitus (DM)* prejudica neurônios e músculos levando à transtornos sensório-motores e atrofia muscular, cujos quais não possuem terapia satisfatória. Por este motivo, a terapia com células-tronco é uma estratégia atraente para várias complicações do *DM* devido à sua capacidade de se diferenciar em outros tipos de células e tecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais (MSCs) na função neuromuscular, na morfologia do músculo esquelético e na expressão de marcadores moleculares associados ao controle da massa muscular. Para tanto, o *DM* foi induzido em ratos *Wistar* machos por uma única injeção de estreptozotocina. Os animais diabéticos receberam quatro injeções i.p. de MSCs derivadas da medula óssea (BM-MSC) ou veículo (DM). Os músculos tibiais anteriores foram coletados para análise morfológica e para a determinação de expressão de mRNA (atrogina-1, MuRF-1, Miostatina, MyoD, IGF-1, TWEAK, Fn-14, NFkB e p38-MAPK) e conteúdo proteico (atrogina-1, MuRF-1). O teste de Von Frey e a análise da pegada demonstraram uma melhora significativa no grupo BM-MSC quando comparados com o grupo DM. A massa muscular diminuiu nos animais diabéticos e não mudou após o transplante. O número de núcleos centralizados e quantidade de tecido conjuntivo aumentou no grupo diabético (14,05% e 34,07%, respectivamente) e reduziu no grupo BM-MSC (7,53% e 18,23%, respectivamente). A expressão de mRNA muscular de atrogina-1 e MuRF-1 foi significativamente mais elevada no grupo DM do que nos animais do grupo Controle e diminuiu em animais transplantados. A expressão de NFkB e Fn-14 apresentaram-se significativamente mais elevadas no grupo DM do que no grupo Controle e não se alteraram após o transplante. A expressão de MyoD diminuiu tanto em animais dos grupos DM quanto BM-MSC. A expressão de p38 MAPK mostrou-se significativamente mais elevada no grupo BM-MSC do que em diabéticos e Controles. A expressão de Miostatina, IGF-1 e TWEAK não diferiram entre os grupos. O conteúdo proteico de atrogina-1 e MuRF-1 aumentou no grupo de DM; todavia o conteúdo proteico de atrogina-1 diminuiu em animais do grupo BM-MSC. Os resultados demonstram a melhora da função motora e a modulação de atrogina-1, MuRF-1, Fn-14 e p38 MAPK no músculo esquelético por transplante de BM-MSCs em ratos diabéticos.

Palavras-chave: *Neuropatia Diabética. Diabetes Mellitus. Atrofia Muscular. Células Tronco Mesenquimais.*

Abstract

Hyperglycemia causes sensorimotor disorder and muscle atrophy for which there is no satisfactory therapy. Stem cell therapy is an attractive strategy for diabetic complications due to its capacity to differentiate into other cell types. This study aimed to evaluate the effects of mesenchymal stem cell (MSC) transplantation on neuromuscular function, skeletal muscle morphology and the expression of markers associated with muscle atrophy. Diabetes Mellitus (DM) was induced by Streptozotocin in *Wistar* rats. The diabetic animals received four i.p. injections (one injection per week) of bone marrow-derived MSC (BM-MSC) or vehicle (DM). Tibialis Anterior muscles were collected for morphological analysis and for the determination of mRNA (Atr-1, MuRF-1, Mst, MyoD, IGF-1, TWEAK, Fn-14, NFκB and p38 MAPK) and protein expression (Atr-1, MuRF-1). The Von Frey test and footprint analysis improved significantly in the BM-MSC group compared with the DM group. Muscle mass decreased in DM animals and did not change after transplantation. The number of central nuclei and connective tissue increased in the DM group (14,05% e 34,07%, respectively) and decreased in the BM-MSC group (7,53% e 18,23%, respectively). Muscle mRNA expression of Atr-1 and MuRF-1 were significantly higher in the DM group than the Control animals and decreased in BM-MSCs animals. The NF-κB and Fn-14 mRNA expression was significantly higher in the DM group than in the Control group. Fn-14 expression increased after transplantation. The MyoD mRNA expression decreased in both DM and BM-MSCs animals. The p38 MAPK mRNA expression was significantly higher in BM-MSCs than in the DM and Control animals. The Mst, IGF-1 and TWEAK mRNA expression did not differ among the groups. The Atr-1 and MuRF-1 protein expression increased in the DM group and the Atr-1 protein expression decreased in BM-MSCs animals. The results demonstrate the improvement of motor function and the modulation of Atr-1, MuRF-1, Fn-14 and p38 MAPK in skeletal muscle by BM-MSC transplantation in diabetic rats.

Key-words: *Diabetic Neuropathy. Diabetes Mellitus. Muscular atrophy. Mesenchymal Stem Cells.*

Índice de Figuras

<i>Fig. 1: Sistema UB-Proteassoma.....</i>	<i>28</i>
<i>Fig 2: Via de Sinalização IGF-1/Akt.....</i>	<i>30</i>
<i>Fig. 3: Via de Sinalização TGF-Miostatina.</i>	<i>33</i>
<i>Fig. 4: Via de sinalização NFkB.....</i>	<i>35/36</i>
<i>Fig. 5: Esquematização ilustrativa dos efeitos de TWEAK em diferentes passos miogênicos.....</i>	<i>38</i>
<i>Fig. 6: Mecanismos de ação do Sistema de sinalização TWEAK/Fn-14 no músculo esquelético atrofiado.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 7: Aplicações Clínicas da MSCs.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 8: Desenho experimental.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 9: Divisão do TA.....</i>	<i>56</i>
<i>Fig. 10: MSCs derivadas de medula óssea isoladas de ratos Wistar.....</i>	<i>61</i>
<i>Fig. 11: Massa corporal (g) (A) e Glicemia (mg/dL) (B).....</i>	<i>63</i>
<i>Fig. 12: Teste Von Frey (A) e análise por Pegada (B)</i>	<i>65</i>
<i>Fig. 13: Morfologia da fibra do músculo tibial anterior.....</i>	<i>67</i>
<i>Fig. 14: Expressão de RNAm no Músculo Tibial Anterior.....</i>	<i>68</i>
<i>Fig. 15: Expressão proteica de Atr-1 (A) MuRF-1 (B) no Músculo Anterior Tibial.....</i>	<i>69</i>
<i>Fig.S1: MSCs: Morfologia e Características Imunoistoquímicas, Imunofenotipagem, Diferenciação e Proliferação.....</i>	<i>100</i>
<i>Fig. S2: Ilustração da Análise de Pegada.....</i>	<i>101</i>
<i>Fig. S3: Número de fibras.....</i>	<i>102</i>

Índice de Tabelas

Tabela 1. Fenótipos de ratos KO ou transgênicos para genes envolvidos em vias anabólicas ou metabólicas do músculo esquelético.....25

Tabela 2: Indutores de Diferenciação de MSCs.....43

Tabela 3: Estudos utilizando MSCs como terapia para o diabetes experimental.....47

Tabela 4. Sequências de *primers* para a expressão genica analisada por qPCR.....57

Abreviações e Siglas

- α -MEM:** do inglês, Minimum Essential Medium alfa (Meio mínimo essencial alfa)
- β -Act:** beta-actina
- °C:** graus Celsius
- ActRI:** receptor de activina tipo I
- ActRII:** receptor de activina tipo II
- AGEs:** do inglês, Advanced Glycation End products (produtos finais de glicação avançada)
- Akt:** Proteína quinase B ou PKB ou PBK
- AP1:** Proteína Ativadora 1
- ATP:** adenosina trifosfato
- Atr-1:** atrogina-1
- ASTs:** Áreas das Secções Transversas
- BM-MSCs:** do inglês, Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells (Células Tronco Mesenquimais derivadas da Medula Óssea)
- BM-MSC:** Grupo transplantado
- C:** Grupo Controle
- CD:** *cluster* de diferenciação
- cDNA:** DNA complementar
- clAPs:** inibidores celulares da apoptose
- cm:** centímetros
- cm²:** centímetros quadrados
- CO₂:** Dióxido de Carbono
- c-Rel:** pro-oncogene c-Rel
- Ct:** do inglês, *threshold cycle*
- CT:** Célula Tronco
- DM:** Grupo Diabético
- DM:** *Diabetes Mellitus*
- DNase:** Desoxirribonuclease
- dL:** decilitro
- DOC:** do inglês, 11-deoxycorticosterone
- E1:** enzimas ativados de ubiquitina
- E2:** enzimas conjugadoras
- E3:** ubiquitina ligase
- ERK-1:** do inglês, *Extracellular signal-regulated protein kinases 1* (proteína quinase 1 regulada por sinal extracelular)
- ERK-2:** do inglês, *Extracellular signal-regulated protein kinases 2* (proteína quinase 2 regulada por sinal extracelular)
- Fig:** Figura
- FITC:** isotiocianato de Fluoresceína
- Fn-14:** do inglês, *Fibroblast Growth Factor-Inducible 14* (fator de crescimento de fibroblasto induzível 14)
- FoxO:** do inglês, *Forkhead box*
- FoxO1:** do inglês, *Forkhead box 1*
- g:** grama
- GAPDH:** do inglês, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
- GSK-3 β :** do inglês, *Glycogen synthase kinase 3 beta*
- GTPase:** do inglês, *guanosine triphosphatase* (guanosina trifosfatase)
- HDF:** *High fat Diet* (Dieta com alto teor de gordura)
- IFN- γ :** do inglês, *Interferon gamma*
- IGFs:** do inglês, *Insulin-like growth factors* (fatores de crescimento semelhante a insulina)

IGF-1: do inglês, *Insulin-like growth factor 1* (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1)

IGF-1R: do inglês, *Insulin-like growth factor 1 receptor* (receptor de IGF-1)

I κ B α : inibidor alfa de κ B

IKK: I κ B quinase

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IR: Receptor de Insulina

JNK: quinase N-terminal c-Jun

Kg: quilograma

KO: nocaute

M: Molar

MAFbx: do inglês, muscle atrophy F-box (Atrogina-1)

MAPKs: Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MEKs (MAP2K): quinases ativadora da MAPK

mg: micrograma

Mg²⁺: Cátion Bivalente de Magnésio

min: minuto(s)

MKKs: do inglês, Mitogen-activated protein kinase kinase

mL: mililitro

mM: micromolar

MMPs: Matriz de Metaloproteinases

mRNA: Ácido Ribonucleico Mensageiro

MSCs: do inglês, Mesenchymal Stem Cells (Células Tronco Mesenquimais)

Mst: Miostatina

mTOR: do inglês, Mammalian Target of Rapamycin

MuRF-1: do inglês, *Muscle Ring-Finger protein-1*

Myf-5: do inglês, *Myogenic factor 5* (Fator miogênico 5)

MyoD: do inglês, Myogenic differentiation 1 (Fator de diferenciação miogênico 1)

NaCl: Cloreto de Sódio

NaF: Fluoreto de Sódio

ND: Neuropatia Diabética

NF κ B: Fator Nuclear cadeia kappa

NF κ B1: Fator Nuclear cadeia kappa 1

NIK (ou MAP3K14): do inglês, NF-kappa-B-inducing kinase (quinase indutora de NF κ B)

nM: nanomolar

NP40: do inglês, nonyl phenoxypolyethoxylethanol (nonilfenoxipoletoiletanol)

p38 MAPK: do inglês, p38 mitogen-activated protein kinase (Proteína-quinases ativadas por mitógenos p38)

p50: subunidade Madura de NF κ B p50

p52: subunidade Madura de NF κ B p52

p65: subunidade Madura de NF κ B p65

PBK: proteína quinase B ou Akt

PBS: do inglês, Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)

PE: Ficoeritrina

pH: potencial Hidrogeniônico

PI3K: fosfatidilinositol 3-fosfato quinase

PIP₂: fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato

PIP₃: fosfatidilinositol (3,4,5) - Trifosfato

PMSF: fenol-metil-sulfonil-fluoreto

pPLA: do inglês, phospholipase A (fosfolipase A)

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa

Ras: do inglês, Rat Sarcoma vírus (vírus do sarcoma de rato)

Raf (MAP3K): Proteína-quinase ativada por mitógenos 3 (quinase específica para Ser/Thr)

Rel A: do inglês, *v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A* (p65 ou NF κ B3 ou fator de transcrição RelA)

Rel B: do inglês, *v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B* (p50 ou fator de transcrição RelB)

RIPA: do inglês, *radioimmunoprecipitation buffer*

RNA: do inglês, *Ribonuclei acid* (Ácido Ribonucleico)

SDS: Dodecil sulfato de Sódio

SDS-PAGE: do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (Gel Dodecil Sulfato de Sódio de Poliacrilamida para Eletroforese)

SEM: Erro Padrão da Média

Smad: do inglês, *Mothers Against Decantaplegic homolog*

STZ: Streptozotocina

TA: Tibial Anterior

TB: Azul de Toluidina

TBST: Solução salina tamponada com Hidroximetil Aminometano (Tris) e polissorbato 20 (Tween-20)

TAK-1: do inglês, *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*

TGF- β : do inglês, *transforming growth factor beta* (Fator de transformação do crescimento beta)

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TRAFs: fatores associados ao receptor de TNF

Tris-HCl: Hidroximetil Aminometano Hidroclorido

TWEAK: do inglês, *TNF-like weak inducer of apoptosis*

UB: Ubiquitina

μ g: miligrama

μ L: microlitro

μ M: micromolar

μ M²: micromolar quadrado

V: Volts

vs: versus

Sumário

Resumo	8
Abstract.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 O Diabetes Mellitus	20
2.2 Complicações presentes no DM	21
2.2.1 Neuropatia Diabética (ND)	23
2.2.2 Alterações Musculares no DM	23
2.2.3 Vias de Sinalização	26
2.2.3.1 Sistema Ubiquitina-Proteassoma.....	27
2.2.3.2 Via de Sinalização IGF-1/Akt	29
2.2.3.3 Via de Sinalização TGF-Miostatina.....	31
2.2.3.4 Via de Sinalização NFkB	34
2.2.3.5 Via TWEAK/Fn-14	37
2.3 Tratamento do Diabetes Mellitus.....	40
2.4 Perspectivas da Terapia com Células-tronco	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 Animais	48
3.2 Indução do Diabetes Mellitus	49
3.3 Isolamento, cultura e caracterização das MSCs.....	50
3.4 Infusão de MSCs.....	51
3.5 Testes de Comportamento e Funcional.....	52
3.5.1 Teste de Von Frey	52
3.5.2 Análise de Pegada	53
3.6 Desenho Experimental	54
3.7 Histologia do Músculo Tibial Anterior.....	55
3.8 Expressão de RNAm no Músculo Esquelético	56
3.9 Expressão proteica do Músculo Esquelético	58

3.10 Análise Estatística.....	59
4 RESULTADOS	60
4.1 Caracterização de MSCs alogênicas derivadas de medula óssea.....	60
4.2 Massa corpórea e Glicemia.....	62
4.3 Testes Comportamentais.....	62
4.3.1 Teste de Von Frey	62
4.3.2 Análise por Pegada.....	64
4.4 Morfologia do Músculo Tibial Anterior	64
4.5 Expressão de RNA em Músculo Tibial Anterior.....	66
4.6 Expressão Proteica no Músculo Tibial Anterior.....	70
5 DISCUSSÃO	70
CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS	85
ANEXO 1	100
ANEXO 2	101
ANEXO 3	102

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus (DM)* é um distúrbio metabólico caracterizado pela hiperglicemia causada devido à deficiência na secreção e/ou ação da insulina¹⁻³. Atualmente, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes aproximadamente 415 milhões de pessoas no mundo são diabéticas e estima-se que em 2040 aproximadamente 642 milhões de pessoas terão a doença⁴.

Estando associado com diversas complicações sistêmicas, a hiperglicemia é o fator principal responsável pelas diversas complicações crônicas no *DM*⁵. A neuropatia diabética (ND) é a complicação mais comum na doença, sendo caracterizada pela perda gradual da sensibilidade distal e atrofia muscular, comuns no *DM* e cujos quais não possuem terapia satisfatória⁶. Além disso, já é bem estabelecido que o *DM* esteja associado com o aumento de proteólise e diminuição da síntese proteica que afeta diretamente a massa muscular e as propriedades contráteis do músculo esquelético⁷.

A atrofia no músculo esquelético é caracterizada pela perda da massa muscular causada devido ao desequilíbrio nos processos catabólicos e anabólicos; estando também associada à fraqueza muscular e ao comprometimento da capacidade física⁸. Para tanto, existem quatro vias de sinalização celular principais no músculo esquelético relacionados ao processo de remodelamento: Via ubiquitina (Ub)-proteassoma dependente, via IGF-1/PI3K/Akt, via NFκB e a via TGF-β/Miostatina⁹. Estudos experimentais e clínicos demonstraram que o sistema UB-proteassoma é considerado o mecanismo de atrofia predominante¹⁰. Por outro lado, a via PI3K/Akt é crucial para a hipertrofia muscular uma vez que controla a massa muscular pelo aumento da síntese proteica (aumentando a

expressão de IGF-1) e pela supressão da proteólise, principalmente modulando atrogina-1/MAFbx e MuRF-1, duas importantes UB-ligases¹¹⁻¹³.

Evidências recentes sugerem que a via NFkB é também um importante sistema de sinalização envolvido na perda de massa do músculo esquelético. Para tanto, existem três mecanismos que são impulsionados pelo aumento da expressão de NFkB, levando à atrofia: 1) aumento direto na expressão de MuRF-1 e expressão indireta de atrogina-1; 2) aumento da expressão de moléculas inflamatórias envolvidas na perda muscular, tais como TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e TWEAK e 3) inibição do processo de diferenciação miogênica necessário para a regeneração do tecido atrofiado¹⁴.

Em adição, foi demonstrado que o TWEAK (uma citocina com estrutura homóloga ao TNF- α) ligada ao seu receptor Fn-14 participa na diferenciação de mioblastos e miotubos e pode induzir várias respostas biológicas¹⁵ tais como crescimento e proliferação celular, angiogênese, osteoclastogênese, apoptose e diferenciação, dependendo do contexto celular¹⁶ dos tecidos. Além disso, evidências obtidas de numerosos estudos também estabelecem um papel chave para a via p38 MAPK na conversão de mioblastos para miotubos diferenciados durante a progressão miogênica¹⁷. Outrossim, estudos recentes sugeriram que p38 MAPK também pode estar ligado à proliferação celular no músculo esquelético¹⁸.

Além disso, estudos recentes têm elucidado os efeitos da miostatina (Mst, um membro da superfamília TGF- β) na função muscular e no desenvolvimento. Tem sido relatado que no músculo esquelético adulto a Mst age como um regulador negativo da massa muscular esquelética através da inibição da ativação de células satélites^{19,20}. Nesse tocante, o efeito sobre a diferenciação parece ocorrer através da regulação negativa dos fatores de diferenciação miogênica MyoD, Myf-5 e miogenina²¹.

Opções de terapias atuais para o tratamento de complicações diabéticas, incluindo disfunção neuromuscular, têm demonstrando resultados insatisfatórios ^{5,22,23}. Este cenário estimula novas pesquisas buscando terapias alternativas, como o uso de células-tronco ²⁴, que possui a capacidade de autorrenovação e diferenciação em outras células. As células-tronco mesenquimais (MSCs), particularmente, são capazes de modificar o microambiente dos tecidos lesados contribuindo para reparação tecidual e regeneração²⁵⁻²⁷, além de melhorar o perfil metabólico em vários modelos animais de diabetes ^{28,29}. Nosso grupo já descreveu os efeitos positivos do uso de múltiplas infusões de BM-MSCs alogênicas sobre a homeostase da glicose e a morfometria de ilhotas pancreáticas na hiperglicemia induzida por dieta altamente calórica (HFD) em camundongos *Swiss* ³⁰. Além disso, trabalhos prévios também demonstraram que as MSCs transplantadas em ratos diabéticos tiveram efeitos terapêuticos na polineuropatia diabética através de ações parácrinas de fatores de crescimento secretados pelas células-tronco ²⁸.

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do transplante de MSCs na função neuromuscular, na morfologia do músculo esquelético e na expressão de fatores associados à atrofia muscular. Este é o primeiro estudo que investiga os efeitos das MSCs na expressão de marcadores moleculares associados à atrofia muscular em um modelo de roedor de *DM*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O *Diabetes Mellitus*

O *DM* é um distúrbio metabólico crônico caracterizado pela hiperglicemia gerada devido deficiência na secreção e/ou ação da insulina^{1,31,32}, levando a um decréscimo na expectativa de vida. Esse comprometimento crônico transforma o *DM* em um importante problema sócio-econômico responsável por elevados gastos nos sistemas de saúde^{31,33}.

Atualmente, no mundo, 415 milhões de pessoas adultas são diabéticas e estima-se que em 2040 esse número atinja cerca de 642 milhões de pessoas⁴. Este aumento deve ocorrer, em grande parte, em países em desenvolvimento, devido principalmente ao crescimento e envelhecimento da população, à obesidade, ao sedentarismo e ingestão alimentar inadequada. Em adição, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, o Brasil é o sexto país com maior número de pessoas com diabetes³⁴.

O *DM* basicamente pode ser classificado em dois grupos: o tipo 1 e o tipo 2^{31,35,36}. O *DM* tipo 1 é resultante da destruição crônica (cerca de 70 a 80%) das células β pancreáticas produtoras de insulina através de mecanismos autoimunes³⁷, representando cerca de 5% de todos os casos de diabete mundiais^{31,36,38}. O processo de autodestruição ocorre de modo lento, iniciando-se meses ou anos antes do diagnóstico clínico da doença^{31,39,40} e, conseqüentemente, em seu período de manifestação, as células secretoras de insulina já se encontram em número reduzido ou até mesmo ausentes⁴¹. Essa destruição acarreta na falta do hormônio insulina, resultando num estado hiperglicêmico devido à redução da captura da glicose circulante por parte dos tecidos periféricos e à produção de glicose hepática⁴². A queda brusca na produção de insulina leva a necessidade de uma

reposição a partir de insulina exógena, bem como modificações no estilo de vida, como uma alimentação saudável e atividade física regular^{1,31}.

O *DM* tipo 2, por sua vez, é responsável por cerca de 90% dos casos da doença⁴³ e está associado a dois mecanismos patogênicos: resistência periférica a insulina e deficiência relativa na sua secreção^{31,43,44}. Caracteristicamente, na fase inicial ocorre uma hiperinsulinemia compensatória devido à resistência, que pode durar de meses a anos. Com a progressão da doença, todavia, os níveis de produção de insulina passam por uma queda devido ao mecanismo de disfunção e redução da massa de células β ⁴³. De modo geral, a associação de fatores genéticos (poligenia) e ambientais, como obesidade (acúmulo de gordura visceral) e sedentarismo são requisitos determinantes para o desenvolvimento da resistência à insulina e, posteriormente, do *DM* tipo 2⁴⁵⁻⁴⁷. Mesmo assim, a complexidade da interrelação entre fatores genéticos e ambientais é pouco conhecida^{48,49}. Atualmente, a base de tratamento do *DM* tipo 2 consiste na mudança de estilo de vida. Com o progresso da doença faz-se necessário a utilização de medicamentos antidiabéticos orais para controle da glicemia e, em fase mais avançada, de insulinoterapia^{1,31}.

2.2 Complicações presentes no DM

Como se observa, apesar das etiologias diferentes, os processos de destruição e disfunção das células β encontram-se presentes em ambos os tipos de diabetes, sendo mais relevante no *DM* tipo 1 – motivo pelo qual este tipo vem sendo mais estudado³¹. Esse fator culmina em uma patogenia complexa que envolve não somente fatores ambientais e genéticos como também fatores imunogênicos^{50,51}. As complicações diabéticas,

portanto, são as maiores causas da morbidade e mortalidade em pacientes com *DM* ⁵¹. Isso porque, a hiperglicemia crônica no diabetes está associada a danos de longo prazo referente à disfunção e falência de vários órgãos e tecidos especialmente olhos, rins, nervos, vasos sanguíneos, músculos cardíaco e esquelético ^{31,51}.

Esse dado é facilmente explicado uma vez que a insulina (produzida pelas células β pancreáticas) é um hormônio pleiotrópico^a que possui diversas funções, incluindo o estímulo do transporte de nutrientes nas células, a regulação da expressão gênica, modificações da atividade enzimática e regulação da homeostase energética através da ação direta no núcleo celular. Essas funções são exercidas por meio de diversas cascatas de sinalização intracelulares em tecidos específicos dependentes da insulina, como por exemplo, o fígado, tecido adiposo e músculo esquelético ⁵²⁻⁵⁷.

Para tanto, a redução na produção de insulina associada com a hiperglicemia induz mudanças em vias metabólicas e bioquímicas nos tecidos ⁵¹, de tal modo que esses distúrbios metabólicos levam a um aumento no fluxo de polióis, acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs), estresse oxidativo e alterações lipídicas, por exemplo. Essas alterações culminam em anomalias metabólicas e aumentam os fatores de riscos, gerando os processos inflamatórios ^{51,56,58,59}.

Pleiotrópico: (do grego pleio = "muito" e tropo = "mudança") é o nome dado aos múltiplos efeitos de um gene. Acontece quando um único gene controla diversas características do fenótipo que muitas vezes não estão relacionadas.

2.2.1 Neuropatia Diabética (ND)

Basicamente, o *DM* possui quatro complicações principais: neuropatia, retinopatia, nefropatia e vasculopatia ⁶⁰⁻⁶² de modo que, a ND é a maior complicação à longo prazo tanto do *DM* tipo 1 quanto *DM* tipo 2, resultando em significativa morbidade e aumento da mortalidade na vida adulta ⁶¹. Cerca de 50 a 70% dos diabéticos desenvolvem sintomas de neuropatia devido a danos no nervo sensorial ^{63,64}, cujos quais aparentam serem particularmente mais vulneráveis aos níveis elevados de glicose⁶⁴ e danos causados pelo *DM* ⁶³⁻⁶⁷. Assim, as sequelas neuropáticas colaboram para a perda da qualidade de vida dos pacientes diabéticos; apresentando riscos inerentes – como é o caso da nefropatia, vasculopatia, angiopatia, retinopatia e alterações musculares ^{31,51} –, sendo uma condição limitante para pacientes.

O distúrbio sensório-motor progressivo, decorrente da degeneração nervosa, acarreta em sintomas extremamente variáveis; podendo ser tanto silenciosa, i.e., não desenvolvimento nenhum sintoma enquanto gera os seus danos quanto se manifestando através de sintomas e/ou sinais clínicos presentes também em outras doenças ^{65,66}.

Nesse tocante, são nos axônios em que as lesões ocorrem com maior frequência, afetando principalmente seguimentos distais dos membros. Este fato resulta em perda sensorial progressiva ⁶⁵ e, conseqüentemente, leva a sintomas extremamente variáveis que podem ser gravemente dolorosos ou completamente indolores ^{65,68} (diminuição da sensibilidade, dor, hiperalgesia ou até mesmo a transtornos tróficos da pele da estrutura osteoarticular do pé, com propensão a desenvolver o chamado “pé diabético”, por exemplo)⁶⁹ bem como podem acarretar numa atrofia muscular resultante da perda da

comunicação bioquímica entre nervo e músculo^{34,66,70}. Tal atrofia contribui para a perda da capacidade regenerativa e culmina no desenvolvimento de tecido fibroso não contráctil e acúmulo de gordura, levando a perda da massa muscular⁷¹⁻⁷³.

Atualmente, as terapias disponíveis incluem tão somente o controle da glicemia e o tratamento da dor neuropática; não revertendo ou evitando a progressão da doença. Além disso, a limitação dos estudos experimentais e clínicos contribui para a inexistência de um tratamento efetivo.

2.2.2 Alterações Musculares no DM

O músculo esquelético é um sistema altamente complexo formado por milhares de unidades contrácteis chamadas fibras musculares que estão limitadas pelo sarcolema (membrana plasmática) e lâmina basal, sendo rodeadas por uma matriz extracelular de tecido conjuntivo^{74,75}. Os músculos são remodelados durante toda a vida, embora em ritmo diferente, considerando os estágios de desenvolvimento⁷⁴.

As fibras musculares têm capacidade de alterar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com os estímulos a que são submetidas; bem como alterar a quantidade ou tipo de proteínas musculares^{7,74-76}. Esta capacidade adaptativa envolvendo diferentes componentes da fibra se reflete na plasticidade muscular^{74,77}.

Em resposta a estímulos exógenos ou fatores biológicos, tais como a idade ou a nutrição, o músculo aumenta seu tamanho e a quantidade de proteínas contrácteis. A regulação do tamanho das células musculares, portanto, é um fenômeno altamente regulado, sendo um equilíbrio entre a proliferação de novas proteínas no músculo e a degradação das proteínas pré-existentes^{74,75}. Assim, eventos não controlados, muitas vezes associados a doenças, podem provocar mudança na síntese e/ou degradação das

proteínas musculares. Essa alteração pode levar a um significativo impacto sobre a massa muscular, causando um deslocamento no equilíbrio em direção a um dos lados ^{7,74-78}.

A deficiência de proteínas estruturais conduz, dessa forma, a ciclos contínuos de degeneração e regeneração da fibra muscular, devido às disfunções nas concentrações de citocinas; modificando o processo miogênese, i.e, bloqueando a formação de novas fibras musculares; acarretando em degeneração, inflamação e fibrose ^{7,71,73,76,79}.

Não é surpreendente, portanto, que no *DM* ocorram alterações nos efeitos bioquímicos sobre o músculo esquelético, onde o transporte de aminoácidos e a captação de glicose são reduzidos. Dessa maneira, a síntese proteica se altera, levando a uma elevada proteólise ^{7,80}. Isso porque a insulina é um potente estimulador do transporte de glicose no músculo ⁸¹, sendo sua ação influenciada pelo tipo de fibra muscular ⁸². Assim sendo, na ausência ou redução de insulina, o músculo se altera, remodelando-se. A remodelação, em consequência, leva a perda da massa muscular em decorrência da ativação de múltiplas vias de sinalização ^{73,83} (Tabela 1).

Tabela 1. Fenótipos de ratos KO ou transgênicos para genes envolvidos em vias anabólicas ou metabólicas do músculo esquelético.

Produto Gênico	Modelo Animal	Fenótipo	Referência
Sistema Ub-proteossoma			
atrogina-1	KO	Sem fenótipo, mas proteção a partir de atrofia induzida por desnervação.	Bodine <i>et al.</i> , 2001 ⁸⁴ .
MuRF-1	KO	Sem fenótipo, mas proteção a partir de atrofia induzida por desnervação.	Bodine <i>et al.</i> , 2001 ⁸⁴ .
Via de sinalização IGF-1/Akt			
IGF-1	Transgênico	Hipertrofia muscular, proteção contra perda muscular durante a senescência, aumento da capacidade regenerativa muscular durante a velhice, proteção contra atrofia induzida por falha no coração.	Musaro <i>et al.</i> , 2001 ⁸⁵ ; Schulze <i>et al.</i> , 2005 ⁸⁶ ; Song <i>et al.</i> , 2006 ⁸⁷ .
Akt	Transgênico	Hipertrofia muscular, proteção contra atrofia,	Lai <i>et al.</i> , 2004 ⁸⁸ ; Mammucari <i>et al.</i> 2007 ⁸⁹ ; Izumiya <i>et al.</i> 2008 ⁹⁰ .

indução de longa duração induz degeneração muscular.			
Via de Sinalização TGFβ-miostatina			
Miostatina	KO Transgênico	- Hipertrofia Muscular. - Atrofia muscular moderada em ratos machos. - Marcador de hipertrofia.	McPherron <i>et al.</i> 1997 ⁹¹ ; Grobet <i>et al.</i> 2003 ⁹² . Reisz-Porszasz <i>et al.</i> 2003 ⁹³ . Lee e McPherron, 2001 ⁹⁴ .
Citocinas inflamatórias e via de sinalização NFκB			
TWEAK	Transgênico	- Atrofia muscular. - Sem fenótipo, mas proteção contra atrofia induzida por deservação.	Mittal <i>et al.</i> , 2010 ⁹⁵ .
NF κ B1 ou p65	KO	Sem fenótipo, mas proteção contra atrofia induzida por descarga.	Hunter e Kandarian, 2004 ⁹⁶ .

Adaptado de Bonaldo et al. 2013⁸.

2.2.3 Vias de Sinalização

Como já abordado, a perda da massa muscular ou atrofia é um complexo processo que ocorre em consequência de uma variedade de respostas bioquímicas relacionadas a eventos de caráter estressante como inatividade neural ou mecânica, inflamação e estresse metabólico⁹. As vias e fatores que regulam a atrofia do músculo esquelético ainda estão sendo descobertas; todavia, nas últimas décadas, inúmeros fatores-chaves de transcrição, vias de sinalização e processos celulares envolvidos na iniciação e manutenção da atrofia sob uma variedade de condições já foram identificados (Tabela 1)⁸. Embora os gatilhos que causem a perda da massa muscular sejam diferentes em cada caso, a estimulação da proteólise é um programa comum no processo de perda da massa muscular^{9,97}.

2.2.3.1 Sistema Ubiquitina-Proteassoma

A via ubiquitina-proteassoma (UB-proteassoma), em particular, é uma das principais vias pertencentes ao sistema de degradação proteico ⁷⁹ e possuiu como marcadores genéticos da atrofia muscular dois genes principais: atrogina-1/MAFbx e MuRF-1 (pertencentes a classe das UB-ligases E3) que aumentam suas expressões na ocorrência de perda da massa muscular ^{84,98,99}.

A via se difere das demais devido ao seu consumo de ATP e se inicia com a ubiquitinação da proteína alvo (receptores celulares de membrana, ativadores ou inibidores de transcrição, moduladores de crescimento ou supressores de tumor, proteínas modificadas ou mutantes e reguladores de ciclo celular) por meio de etapas. Essas etapas envolvem três enzimas chamadas de E1 (enzimas ativadas de ubiquitina), E2 (enzimas conjugadoras) e E3 (UB-ligases)^{8,9}.

Na fase de ativação a enzima E1 ativa a molécula de UB na presença de Mg²⁺ e consumo de 1 ATP. Essa molécula, por sua vez, é transferida para a enzima E2, liberando a E1. Posteriormente, a enzima E3 forma um complexo não-covalente com a proteína-alvo e permite que o complexo E2-UB transfira a UB para o grupo amina de um resíduo de lisina da proteína-alvo. A enzima E3, por conseguinte, se solta liberando E2 e a proteína ubiquitinada (Fig. 1). O processo se repete várias vezes formando uma ou mais cadeias de UBs que são reconhecidas pelo proteassoma^{8,9,100}.

Apesar do processo de ubiquitinação ser reversível, o que permite um controle de qualidade ao sistema; as proteínas degradadas ao nível de oligopeptídeos durante a proteólise gera uma assimetria fundamental ao direcionamento do sistema ^{9,97,100}.

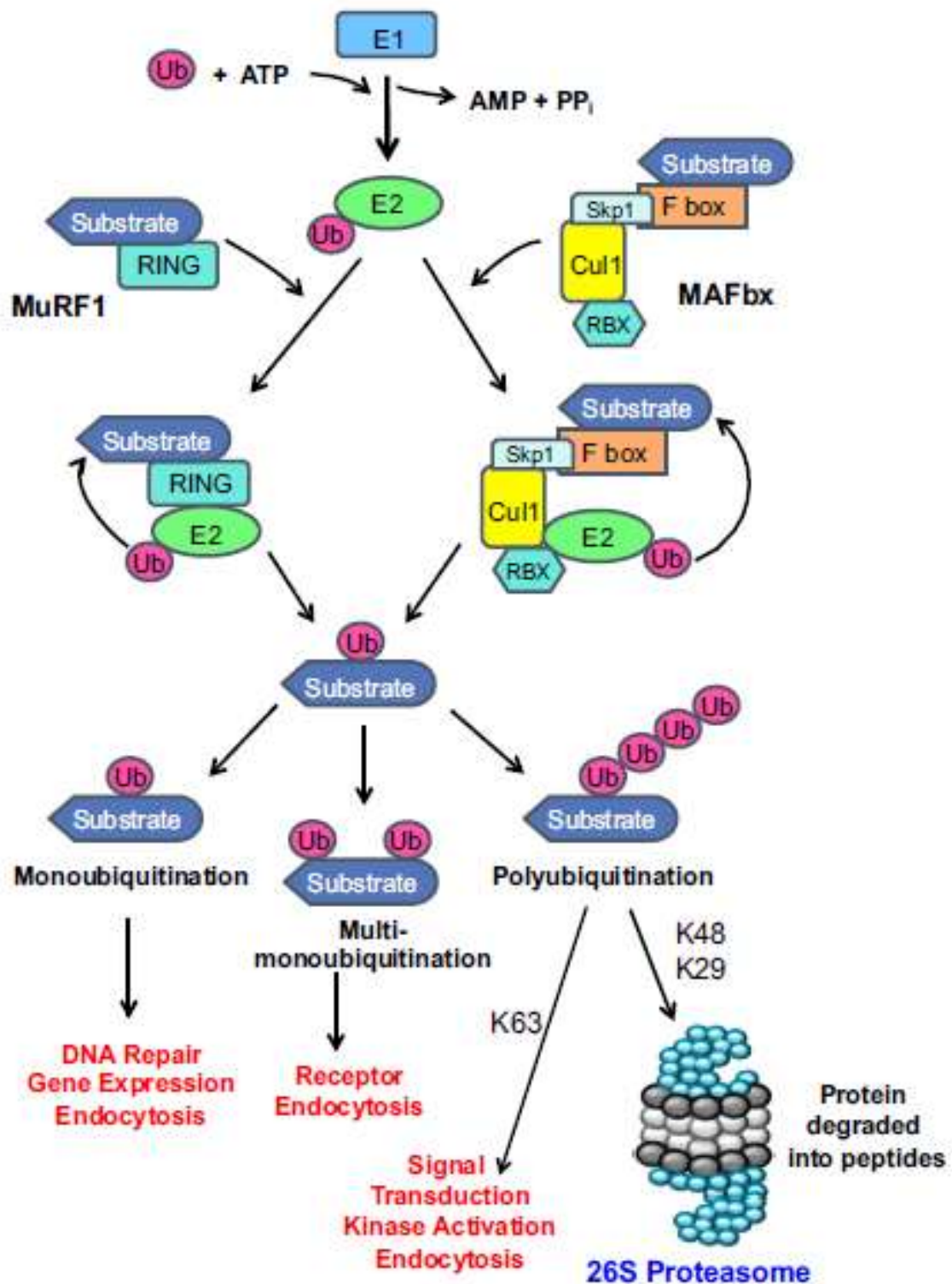


Fig. 1: Sistema UB-Proteassoma.

O processo de ubiquitinação é controlado por meio de enzimas ativadoras (E1), conjugadoras (E2) e ligases (E3). O MuRF-1 e Atr-1 são UB-ligases que controlam a ubiquitinação de substratos específicos. O processo de ubiquitinação se repete várias vezes formando uma ou mais cadeias de UBs que são reconhecidas pelo proteassoma. Fonte: Bodine et al., 2014.

2.2.3.2 Via de Sinalização IGF-1/Akt

Evidências importantes têm sugerido que os IGFs poderiam contribuir para o processo de remodelamento muscular inibindo o sistema UB-proteassoma e a autofagia. De fato, o IGF-1 estimula o aumento da massa muscular através do aumento da síntese de proteína e miogênese enquanto reduz/inibe a proteólise e apoptose através da ativação da via PI3K/Akt/FoxO^{97,101}. Os efeitos do IGF-1 na proliferação e diferenciação são temporariamente separados: durante a proliferação o IGF-1 aumenta a expressão de fatores envolvidos na progressão do ciclo celular por intermédio das proteínas ativadas por mitogênio quinase (MAPKs) enquanto que durante a diferenciação permite a expressão de fatores regulatórios miogênicos por meio da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)¹⁰²⁻¹⁰⁷ (Fig. 2). Para tanto, o IGF-1 (produzido pelo fígado) precisa se ligar ao seu receptor IGF-1R (um receptor tirosina quinase) ou ao receptor de insulina (IR) a fim de iniciar as cascatas de sinalização^{103,108}.

Quando ativado, o PI3K fosforila lipídios de membrana plasmática, formando o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) que, em seguida é ativado, transformando-se em fosfatilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃); criando um sítio de ligação na membrana plasmática para a Akt (ou PBK)^{9,83,103}. A Akt em seu estado ativado/fosforilado medeia respostas incluindo proliferação, sobrevivência celular, migração celular e angiogênese. A via, altamente regulada por múltiplos mecanismos, muitas vezes envolvem respostas cruzadas com outras vias de sinalização como mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) e FoxO (*Forkhead box*)^{9,83,103,109}.

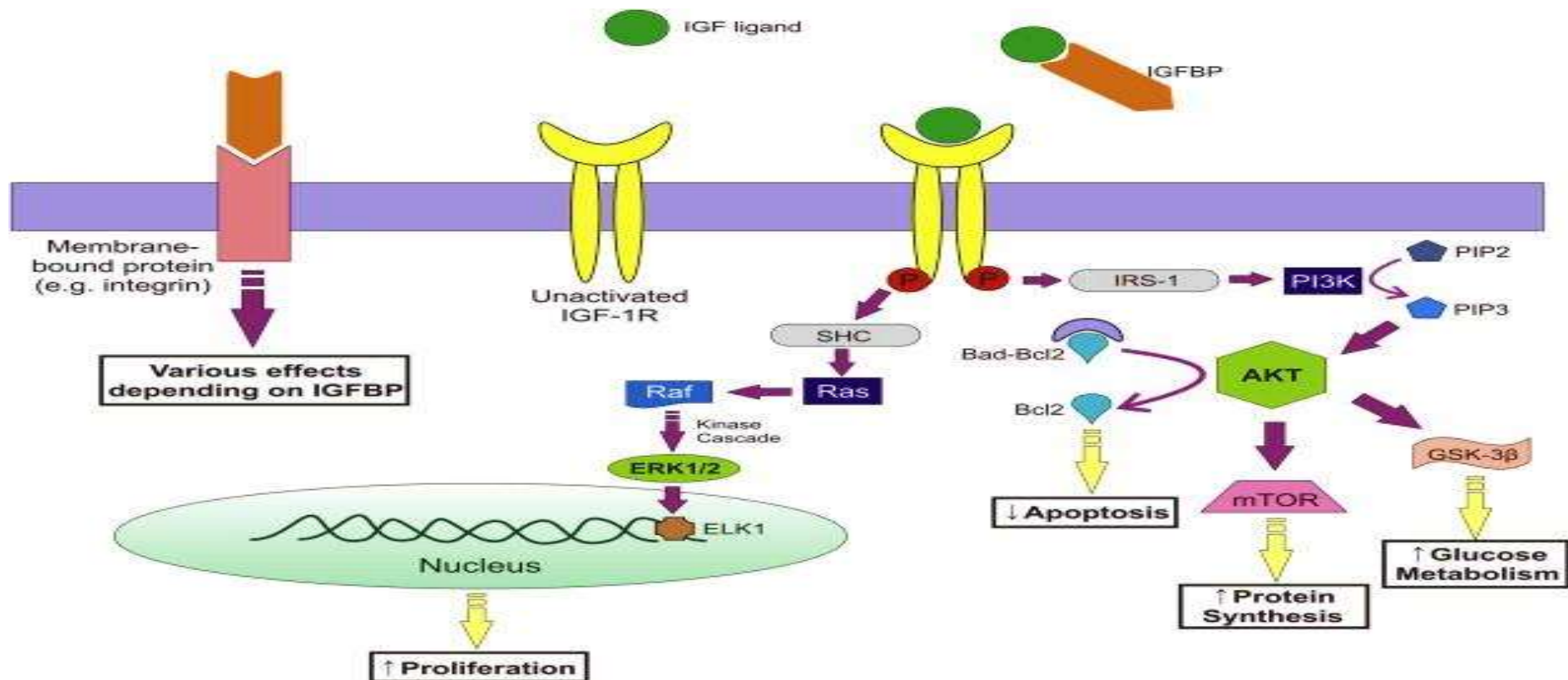


Fig 2: Via de Sinalização IGF-1/Akt.

O fator IGF-1 liga-se ao seu receptor (IGF-1R) na membrana plasmática levando a uma autofosforilação e recrutamento de adaptadores proteicos IRS-1 e IRS-2. A interação entre os adaptadores e o receptor IGF-1R ativa PI3K que converte PIP₂ em PIP₃; criando um sítio de ligação para Akt. A Akt, por sua vez, ativa vias de sinalização como mTOR, FoxO, GSK-3β que estão relacionadas as respostas celulares como sobrevivência celular, migração e angiogênese. Paralelamente, a interação IGF-1 com o seu receptor pode ativar a via das MAPKs pela modulação de Ras. As MAPKs podem acionar fatores de transcrição permitindo a ativação de genes ligados ao ciclo celular e alteração da tradução de mRNA para proteínas. Fonte: Jung et al. 2015¹⁰⁴.

Outrossim, o segundo caminho envolve as quinases relacionadas ao sinal extracelular ERK-1 e ERK-2 (também denominadas MAP quinases). Em 1993, Skolnik e colaboradores ¹¹⁰ identificaram componentes de uma via que ligava a estimulação da insulina e/ou IGF-1 com a ativação de Ras (uma GTPase). Além disso, concluíram que uma vez que Ras é acionado, este ativa Raf (ou MAP3K) e posteriormente, ativa MEKs (ou MAP2K); resultando na fosforilação e ativação de ERKs (ou MAPKs) que transmitem sinal para o núcleo ^{103,106,111}. Essa classe de proteínas (ERKs) é classificada em três categorias: 1) a família da quinase N-terminal c-Jun (JNK) ou também conhecida como proteína quinase ativada por estresse; 2) a família de regulação extracelular quinase (ERK) e 3) a família da p38 MAPK ¹¹².

Nesse tocante, as MAPKs podem ativar fatores de transcrições permitindo a ativação de genes ligados ao ciclo celular e alteração da tradução de mRNA para proteínas ¹¹¹. Assim sendo, mediante estado de atrofia, a via IGF-1/Akt é desativada e ocorre um aumento de atrogenes e consequente proteólise ^{9,13, 113}.

2.2.3.3 *Via de Sinalização TGF-Miostatina*

A expressão de Mst, membro da superfamília do TGF- β , é identificada durante os primeiros estágios da embriogênese e continua a ser expressa durante o desenvolvimento do músculo esquelético. Durante os estágios posteriores e em animais adultos, a Mst é expressa predominantemente na musculatura esquelética e tecido adiposo ^{114,115} agindo como regulador negativo da massa muscular ^{91,94,116}.

Embora o mecanismo de ativação da Mst ainda seja indeterminado, fatores específicos do tecido, como MMPs, podem ser responsáveis pelo processo de ativação e subsequente atividade inibitória da Mst no músculo esquelético^{21,117}. Além disso, a Mst regula positivamente UB-ligases relacionadas com a atrofia por meio do bloqueio da via IGF-1/PI3K/Akt e ativação de FoxO1, permitindo maior expressão de atrogina-1 independentemente de NFκB^{8,118-120}.

Uma vez que a Mst se encontra ligada ao seu receptor de activina tipo II (ActRII) permite a ativação do receptor de activina tipo I (ActRI) iniciando uma cascata de sinalização intracelular pela ativação da transcrição de reguladores Smad2 e Smad3 que se transladam para o núcleo por meio do complexo com Smad4 e Smad5 e ativam genes alvos da Mst^{21,116,117,121,122} (Fig 3). Estudos recentes, todavia, relatam a existência de caminhos alternativos não mediados por Smad que levam a transdução de sinais através das vias p38 MAPK e ERK (1/2)¹²³ durante a proliferação e diferenciação celular de modo ainda não determinado^{21,124}.

Assim sendo, o efeito sobre o número de fibras musculares é resultante da atividade da Mst sobre a proliferação e/ou diferenciação de mioblastos durante o desenvolvimento^{21,122,125,126} enquanto que o efeito sobre o tamanho das fibras está relacionado a ação da Mst sobre as células satélites musculares^{21,126}. Nesse tocante, o efeito sobre a diferenciação parece ocorrer através da regulação negativa de fatores de diferenciação miogênica como MyoD, Myf-5 e Miogenina^{122,125,127}.

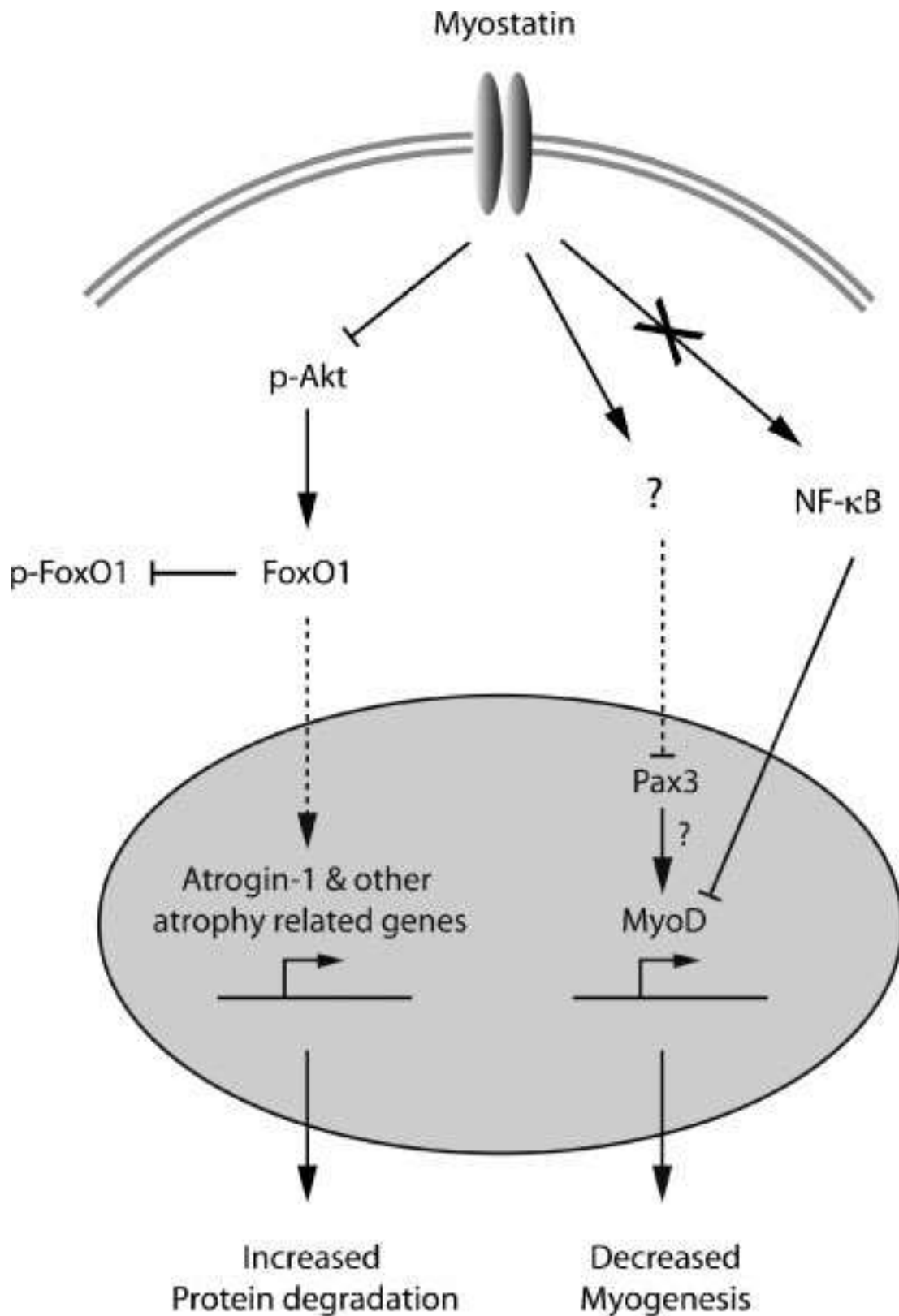


Fig. 3: Via de Sinalização TGF-Miostatina.

A via TGF- β /Mst regula negativamente o tamanho do músculo por meio da fosforilação de Smad 2 e Smad 3 e inibição da via IGF-1/Akt; permitindo a ativação de genes alvos da Mst. A via, quando ativada, bloqueia a miogênese por inibição de MyoD e parece aumentar a proteólise pelo aumento de MuRF-1 e atroquina-1 pela hipofosforilação de FoxO1. Fonte: McFarlane et al. 2006¹¹⁹.

2.2.3.4 Via de Sinalização NFκB

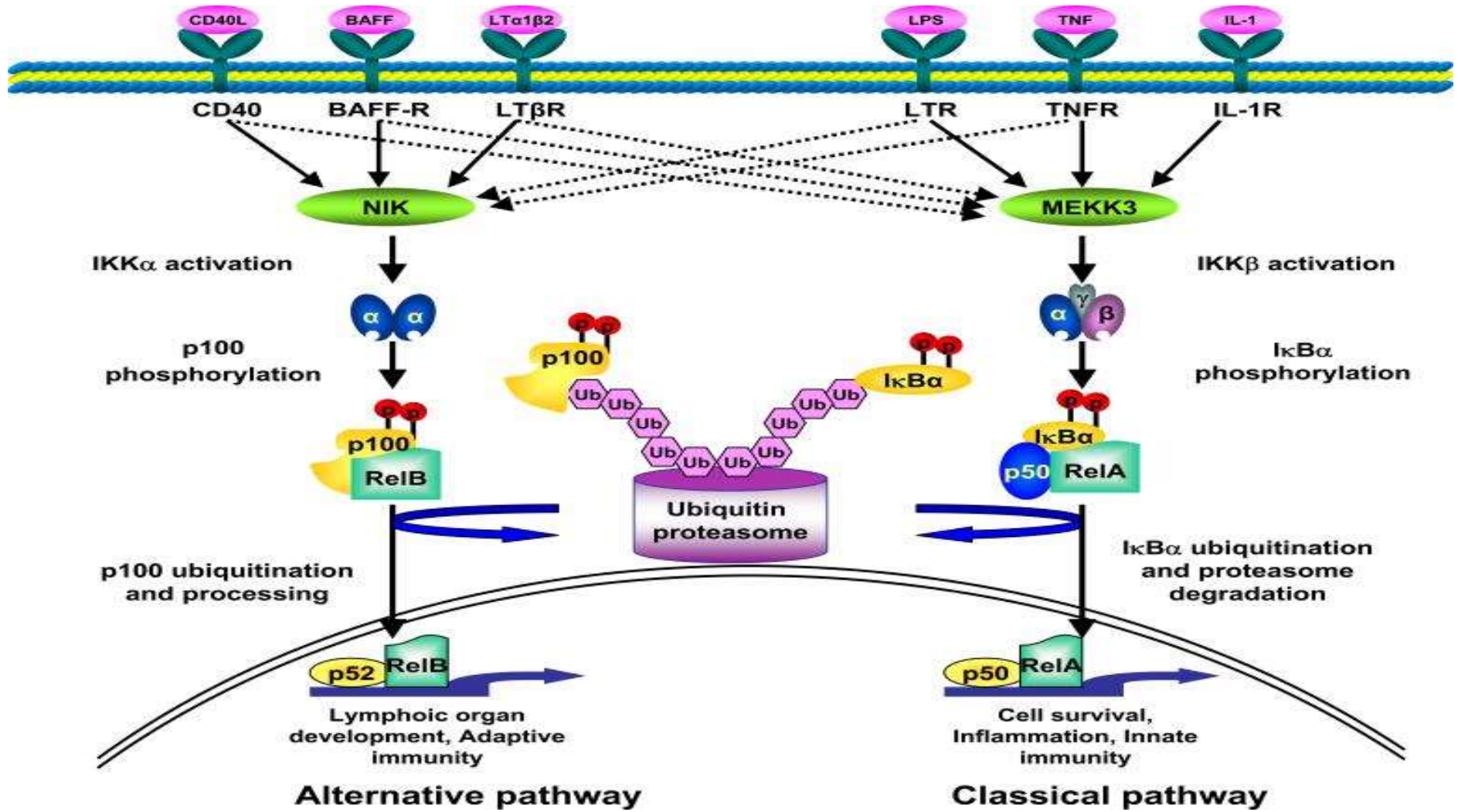
Em mamíferos, existem cinco tipos diferentes de NFκB (p65 ou Rel A, Rel B, c-Rel, p52 e a p50), nos quais medeiam uma variedade de processos de acordo com o tipo de célula e dos ativadores específicos ^{14,128,129}. Entre estes, o p65 e p50 estão presentes em quase todos os tipos celulares e são responsáveis pelo aumento da expressão de uma série de genes pró-inflamatórios e de sobrevivência celular ^{14,130}.

Antes da ativação, o NFκB é encontrado no citoplasma vinculado ao seu inibidor (IκBα)^{14,130} e é ativo em resposta a uma variedade de estímulos como estresse oxidativo e biomecânico, infecções bacterianas, vírus, exposição a citocinas pró-inflamatórias, mitógenos e fatores de crescimento ^{14,131} que iniciam diferentes vias de sinalização de transdução^{14, 130-132} ativando a enzima IκB quinase (IKK).

A interação da IKK com o complexo NFκB/IκBα fosforila IκBα, o que resulta na ubiquitinação e dissociação de IκBα do NFκB e eventual degradação de IκBα pelo proteossoma; permitindo a translocação do NFκB para o núcleo, vinculando-se a sítios específicos do DNA; regulando a expressão de múltiplos genes alvos ⁹ (Fig. 4A).

Estudos passados elucidaram diversas funções importantes do NFκB na regulação da massa muscular, especificamente quando relacionada a doenças ⁶⁰. O papel inibidor ou estimulador miogênico de NFκB é influenciado conforme o contexto celular, tipo de estímulo, nível e duração de NFκB e composição do complexo NFκB ativado ¹⁴. Bakkar e colaboradores em 2008 ¹³³ abordaram a contradição entre as funções anti e pró-miogênicas de NFκB demonstrando que a ativação constitutiva da via clássica de NFκB inibe a diferenciação miogênica; mas que, ao final do processo, a sinalização de NFκB migra para a via alternativa a fim de promover a homeostase do tecido muscular esquelético ^{14,133}.

A



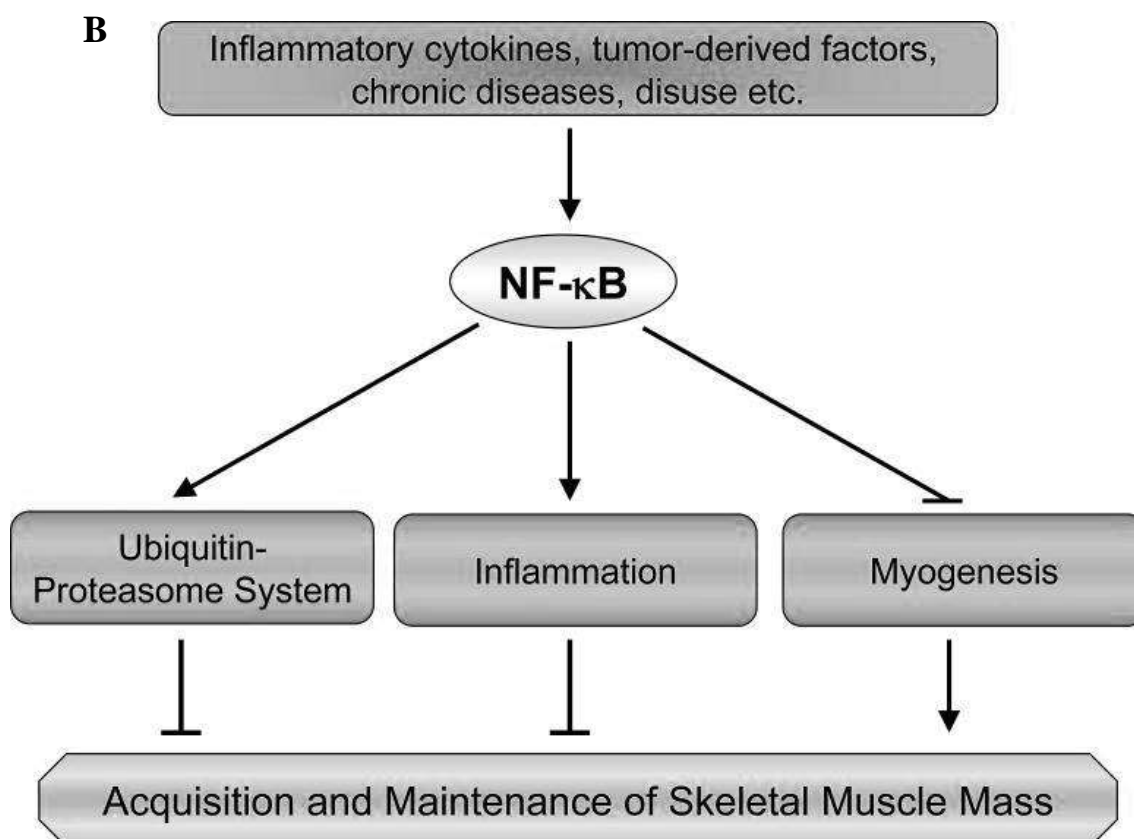


Fig. 4: Via de sinalização NFκB.

(A) A ativação de NFκB pode ocorrer por via clássica ou alternativa. O caminho clássico envolve a ativação de IKKβ que acarreta na fosforilação e degradação de IκBs. Já a via alternativa envolve IKKα e fosforilação de p100. Tanto a via clássica como alternativa permitem a regulação de genes alvo específicos. (B) Uma vez ativa, leva a atrofia por diversos mecanismos subjacentes. O NFκB pode aumentar a expressão de MuRF-1 e atrogina-1 e/ou citocinas pró-inflamatórias que levam a perda da massa muscular. Além disso, pode bloquear o processo de diferenciação miogênica por modular os níveis de MyoD. Fonte: Li et al., 2008¹⁴.

Todavia, em processos inflamatórios crônicos presentes em doenças como o diabetes, os fatores de transcrição pertencentes à via NFκB desempenham um papel fundamental na ativação das respostas imunes e inflamatórias (como aumento de citocinas pró-inflamatórias e a ativação da via TWEAK/Fn-14)^{134,135}, que, por sua vez, proporcionam a ativação da via NFκB por *feedback* positivo^{136,137} e consequentemente, contribuem para a atrofia muscular¹³⁴ (Fig. 4B).

No músculo esquelético, a via NFkB ativada é suficiente para a indução de uma UB-ligase em particular: o MurF-1¹³⁸. Essa alteração contribui para a supressão da via IGF-1/PI3K/Akt^{139, 140} e interfere no processo de diferenciação miogênica^{136,137} através da redução dos níveis celulares de MyoD por mecanismos pós-transcricionais^{14,141-143} levando à perda da massa muscular (Fig. 4B).

2.2.3.5 Via TWEAK/Fn-14

Embora o potencial papel das citocinas pró-inflamatórias na perda da massa muscular em doenças crônicas seja reconhecido, pouco se sabe sobre os exatos gatilhos e eventos que acarretam a atrofia muscular⁹⁵. Evidências recentes sugerem que a via de sinalização TWEAK/Fn-14 é um sistema importante na regulação da atrofia muscular, regeneração e função metabólica¹⁴⁴; principalmente por afetar múltiplos passos do processo miogênico¹⁴⁴ (Fig.5).

Em consistência com o seu papel como mediador de inflamação, o TWEAK foi descrito como sendo uma poderosa citocina que, quando superexpressa, provoca anormalidades musculares significativas, exacerbando a atrofia¹⁶ através da sua ligação com seu receptor Fn-14^{16,95,145} via Fn-14-dependente.

Mesmo assim, estudos realizados por Dogra e colaboradores em 2007¹⁶ descreveram que a expressão do receptor Fn-14, e não de TWEAK, é o fator limitante para ação catabólica da via no músculo esquelético e, portanto, agiria de maneira receptor-independente. Isso porque, ao contrário dos níveis de Fn-14 reduzidos em tecidos saudáveis, em condição de processo inflamatório crônico e dano tecidual, os níveis do receptor encontram-se altamente induzidos^{95, 146,147}.

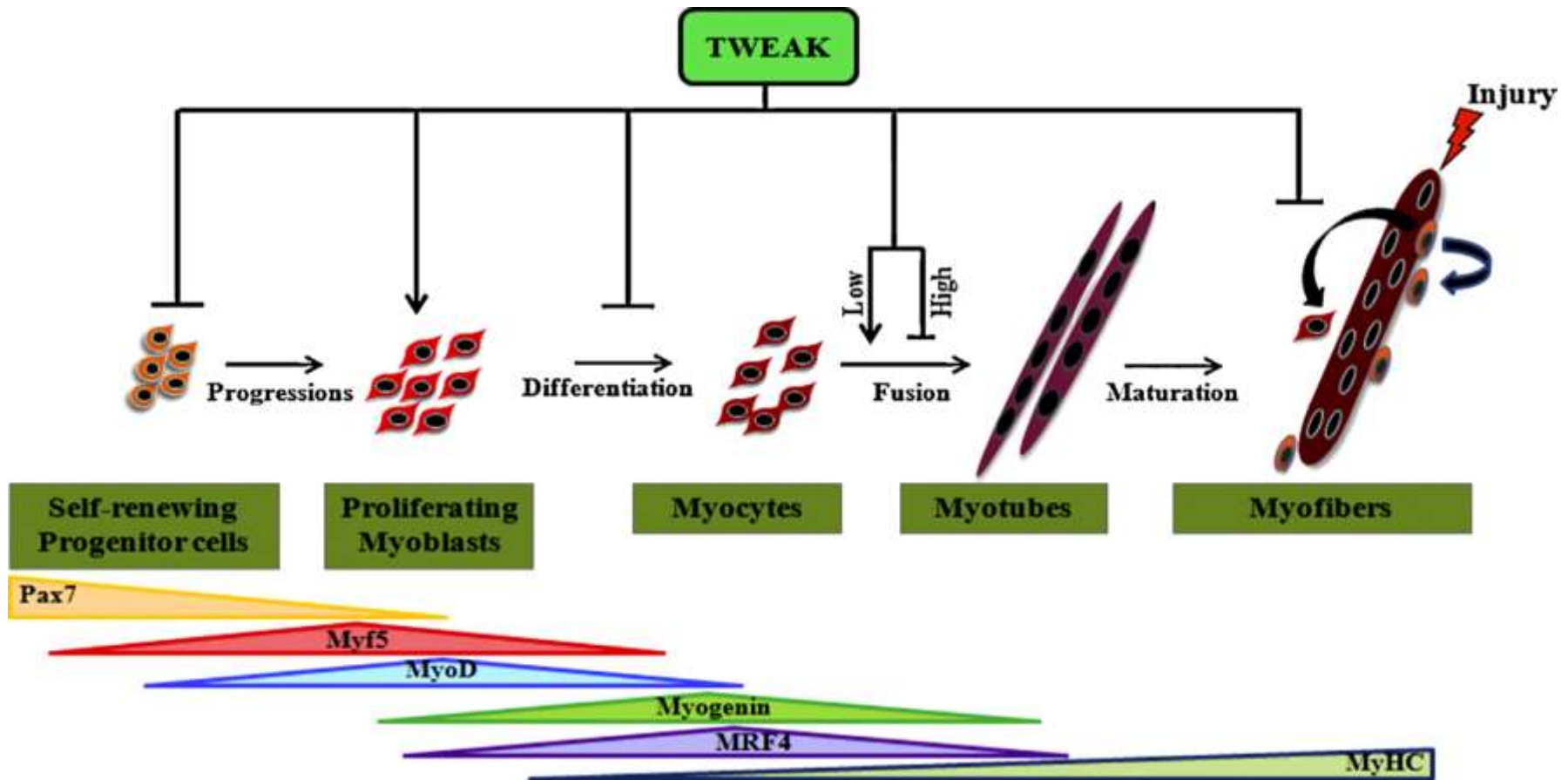


Fig. 5: Esquemática ilustrativa dos efeitos de TWEAK em diferentes passos miogênicos.

O TWEAK diminui a autorrenovação das células progenitoras e aumenta a progressão de linhagens miogênicas, resultando na formação de mioblastos. Quando os níveis de TWEAK encontram-se aumentados, inibe a diferenciação. Quando os níveis de TWEAK encontram-se reduzidos, promove a fusão mioblástica. Após lesões ou sob condição de doenças, o TWEAK atenua a regeneração de miofibras danificadas. Proteínas específicas são expressas em vários estágios da miogênese são mostradas abaixo de cada etapa. Fonte: Tajrishi et al., 2014 ¹⁴⁴.

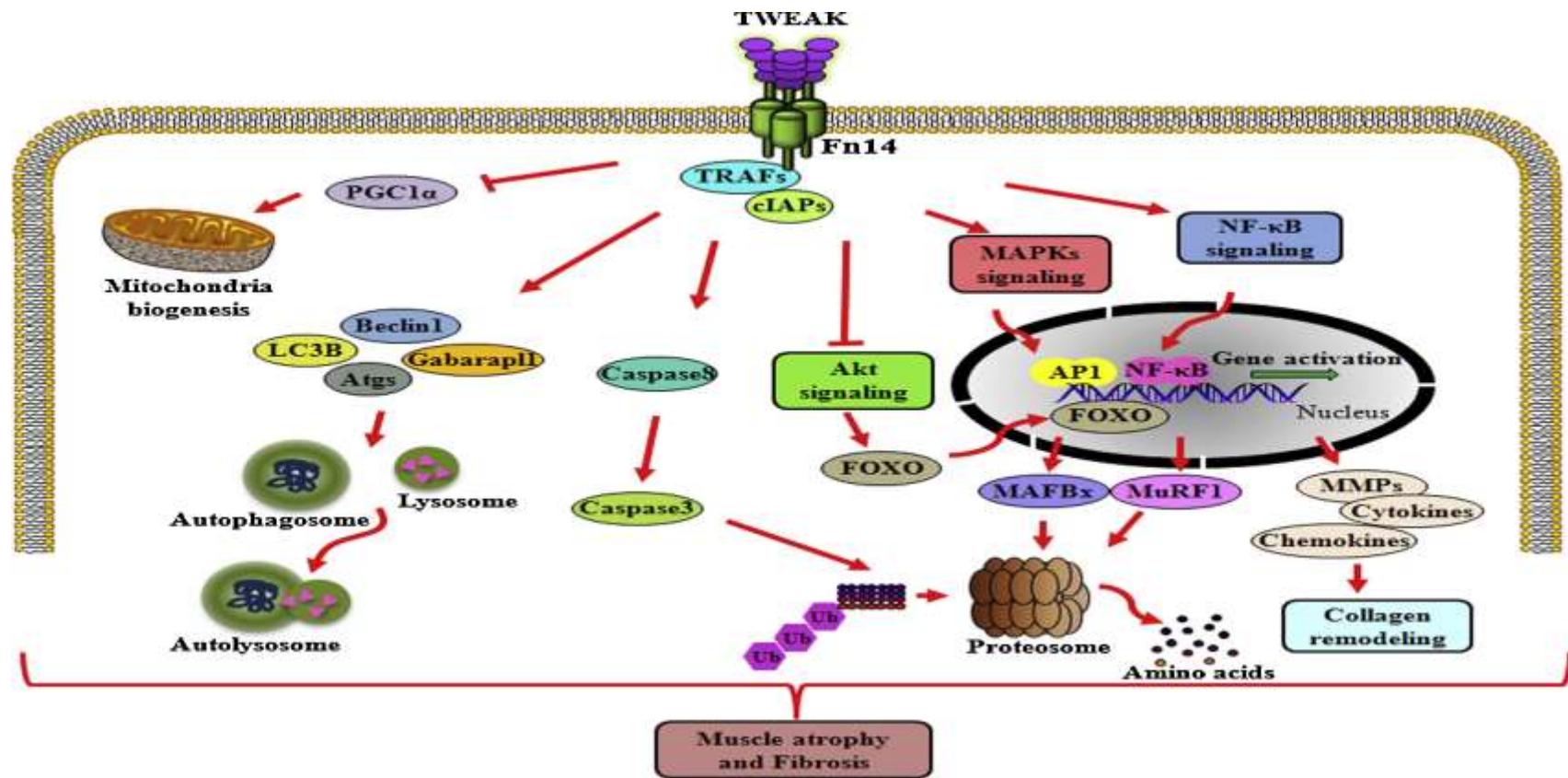


Fig. 6: Mecanismos de ação do Sistema de sinalização TWEAK/Fn-14 no músculo esquelético atrofiado.

Quando o TWEAK se liga ao seu receptor Fn-14 permite o recrutamento de cIAPs e TRAFs (reguladores da morte celular e resposta celular ao estresse) que acarretam na ativação de TAK-1, NIK e várias MKKs. A ativação de TAK-1 estimula IKKs levando a ativação de NFκB canônico. O NIK, por sua vez, fosforila e ativa IKKs levando a ativação de NFκB pelo caminho alternativo. A via TWEAK/Fn-14 também ativa as cascatas de sinalização MAPKs permitindo a ativação do fator de transcrição API e expressão gênica. Os genes ativados também incluem citocinas, quimiocinas e MMPs que contribuem para a remodelação do colágeno e fibrose. O sistema TWEAK-Fn14 inibe a sinalização Akt e, conseqüentemente, a ativação dos fatores de transcrição da família FoxO; resultando na ativação da degradação proteolítica através da expressão melhorada de MAFBx e MuRF-1. Fonte: Tajrishi et al., 2014¹⁴⁴.

Assim, o aumento somente de Fn-14 é suficiente para induzir inúmeras respostas celulares como invasão e migração ¹⁴⁴ ativar sinais pró-miogênicos e estimular a formação de miotubos. Mesmo assim, embora esteja claro o papel limitador de Fn-14 na perda muscular mediada por TWEAK, os mecanismos adjacentes pelos quais o Fn-14 é regulado positivamente no músculo esquelético atrofiado ainda permanecem desconhecidos. Zheng e colaboradores em 2008 ¹⁴⁸, através de análises *in silico*, mostraram que o gene para Fn-14 possui sítios de ligações em consenso com diversos fatores de transcrição como MyoD, NFkB, AP-1 e SP-1. Além disso, o gene para Fn-14 parece conter regiões ricas em CpG em seu promotor o que indica que a expressão de Fn-14 possa também ocorrer por meio de mecanismos epigenéticos ^{144, 145, 149}.

Uma vez que as concentrações de TWEAK aumentam, a via TWEAK/Fn-14 induz a sinalização NFkB, MAPKs e do sistema UB-proteassoma (Fig. 6); aumentando a fibrose, atrofia muscular e número de fibras tipo II no músculo esquelético. Além disso, também gera a degeneração do tecido em respostas aos danos ^{16, 95, 150-152} através da inibição da miogênese pelo bloqueio do ciclo celular dos mioblastos e indução da degradação de MyoD ¹⁴⁴.

2.3 Tratamento do Diabetes Mellitus

O tratamento do *DM* tem como principal objetivo a manutenção da normalidade glicêmica frente à ingestão alimentar variável. Este controle se faz necessário a fim de reduzir as complicações tardias ¹⁵³. Basicamente, as terapias atuais para o *DM* incluem dieta, insulina, agentes hipoglicêmicos orais e, mais recentemente, transplante de ilhotas pancreáticas ³¹.

A terapia convencional com insulina ou terapia intensiva com insulina são os recursos mais utilizados³¹. A reposição através de insulina exógena tem sido a técnica terapêutica primária no controle dos níveis glicêmicos plasmáticos. Apesar disso, a injeção de insulina exógena não consegue mimetizar a secreção de insulina de células β pancreáticas normais quando os níveis de glicose sanguínea se alteram o tempo todo^{30,31}. E, desse modo, a administração de insulina de forma rigorosa pode levar a um aumento de episódios de hipoglicemia e hiperglicemia³⁰ e, conseqüentemente, levar a complicações tardias como a ND e/ou alterações musculares.

Ensaio clínicos de tratamentos com ciclosporina, azatioprina/corticóides, ou anticorpo monoclonal anti-CD3, visando à preservação funcional das células β , vêm sendo realizados com resultados significativos, mas insuficientes para aplicação clínica rotineira⁷¹. Desde a década de 70 o transplante de ilhotas pancreáticas vem sendo proposto como alternativa terapêutica para o DM¹⁵⁴. Todavia, somente em meados de 1990, houveram-se relatos de sucesso neste campo¹⁵⁴.

As limitações nesse tipo de transplante, entretanto, as quais incluem a baixa quantidade de doadores para transplantes alogênicos, dificuldade de obtenção das ilhotas pancreáticas e a necessidade de imunossupressão constante tornam este procedimento não tão eficaz¹⁵⁵.

“O maior desafio no tratamento do diabetes é, portanto, prover aos pacientes uma fonte de insulina que regule, fiel e constantemente, os níveis de glicose sanguínea”³⁵. Esse cenário estimula novas pesquisas em busca de alternativas terapêuticas, como a diferenciação *in vitro* de células tronco em células β humanas para posterior transplante e tratamento com células-tronco adultas^{31,156}.

2.4 Perspectivas da Terapia com Células-tronco

A utilização da terapia com células-tronco vem ganhando força ao longo dos últimos anos nas mais diversas áreas biológicas¹⁵⁷. O interesse pelo tratamento regenerativo e utilização da terapia celular, sobretudo o uso de células-tronco (CT) pluri ou multipotentes, vem oferecendo alternativas para o transplante de ilhotas pancreáticas, pâncreas e o uso de linhagens celulares produtoras de insulina^{158,159}. Inúmeros estudos avaliam a contribuição de diferentes linhagens de células-tronco frente à regeneração das células β e, por conseguinte, do controle dos níveis glicêmicos^{31,160-169}.

As células-tronco nada mais são do que células primitivas indiferenciadas que possuem a capacidade de se autorrenovar, i.e, de se multiplicar e manter o seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e se diferenciar em células de outras linhagens^{25,26}. Entre os tecidos que apresentam células-tronco podemos citar o tecido adiposo, cordão umbilical, fibroblastos, endométrio, células do fígado, medula óssea, músculo, polpa dentária, entre vários outros¹⁶⁰⁻¹⁶⁹.

Nesse tocante, a medula óssea é uma fonte importante de fácil acesso para células-tronco adultas, uma vez que se destaca por possuir células-tronco continuamente durante a vida adulta³¹. Além disso, contém células-tronco hematopoéticas e precursores de linhagens não-hematopoéticas que incluem as células-tronco mesenquimais (MSCs)^{25,26}
^{157,160,161}.

As MSCs da medula óssea, por sua vez, possuem diversas vantagens quando utilizadas para reparo de tecidos, já que detém a capacidade de se autorreplicar e se diferenciar, tanto *in vivo* como *in vitro*, em osso, cartilagem, gordura, tendão e músculo, dentre outros tecidos¹⁷⁰⁻¹⁷². Para tanto, alguns sinais químicos e/ou biológicos atuam

como indutores da diferenciação de MSCs, tais como IGF-1, TGF- β , VEGF, BFGF e ascorbato ou ainda vias de sinalização, como MAPK e Smads ²⁵ (Tabela 2). Além disso, apresentam poucos marcadores imunofenotípicos específicos na membrana que são utilizados para sua caracterização, como CD105, CD73 e CD90 e não expressam marcadores CD34, CD45, CD14 ou CD11b, por exemplo ^{25,173} (Anexo 1).

“Essas células constituem uma população rara de progenitores multipotentes que contribuem para a homeostase tecidual, na regeneração de tecidos mesenquimais, tais como ósseo, cartilaginoso, muscular, adiposo, ligamento, tendão, estroma medular, além de exercerem um papel fundamental na hematopoiese.”¹⁷¹.

Tabela 2: Indutores de Diferenciação de MSCs.

Indutores	Sinais	Ação
Fatores de Crescimento	TGF- β^* , IGF-1, EGF, PDGH, BFGF, VEGF	Diferenciação celular (condrócitos, osteócitos, endotélio)
Vias de Sinalização	MAPK, Smads	Produção de proteínas de matriz celular, incluindo colágeno tipo II, agregan, requeridos para a formação de cartilagem
Fatores de transcrição	SOX9, SOX5, SOX6	
Outros fatores/sinais	Wnt, 1,25-diidroxivitamina D3, 2-fosforo-ascorbato, β -glicerofosfato, Dexametasona, Insulina, Indometacina, isobutilmetilxantina, glicocorticoides, hidrocortisona, β -mercaptoetanol, nicotinamida	Diferenciação neural, adipogênica, miogênica, em ilhotas pancreáticas

*O mais potente deles. Fonte: Bydlowski et al., 2009 ²⁵.

As MSCs são capazes de produzir e secretar um grande número de moléculas bioativas (fatores de crescimento, citocinas, interleucinas e interferon γ) que auxiliam o reparo/regeneração de regiões lesionadas ¹⁷⁴, inibem a formação de cicatriz e a apoptose e induzem a angiogênese e proliferação de células-tronco ou progenitoras intrínsecas ¹⁷⁵. “Essa atividade complexa, multifacetada, causada pela atividade secretora das MSCs é

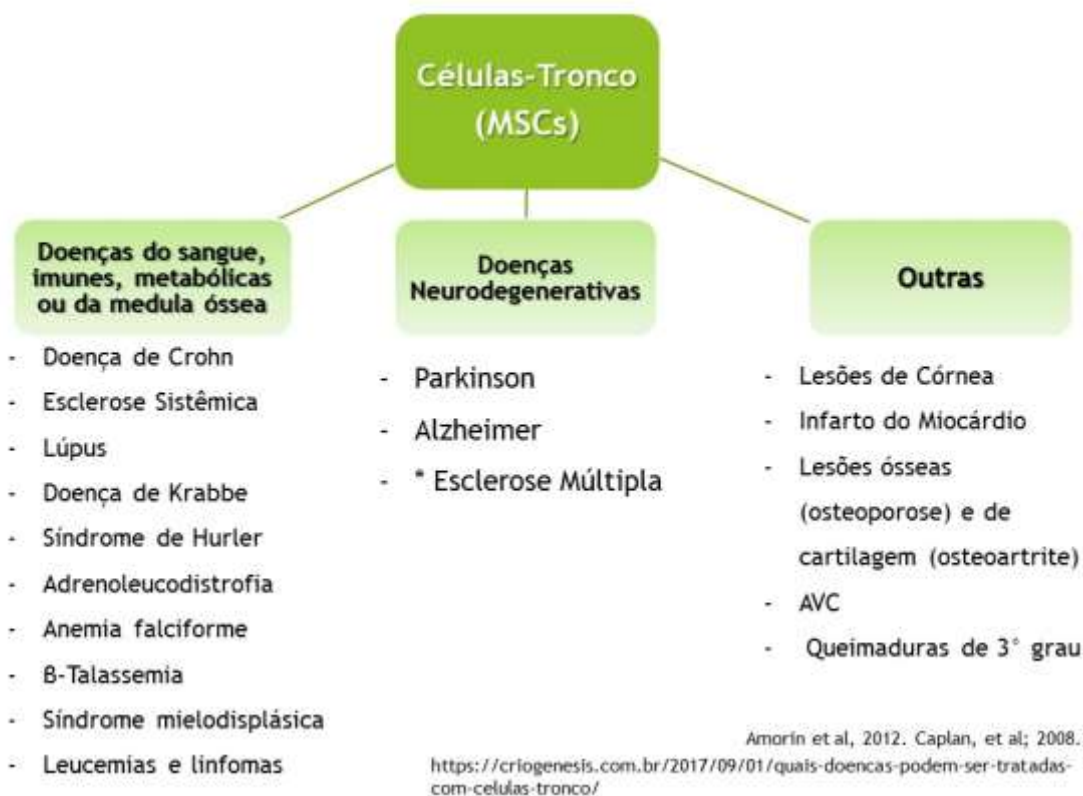
referida como atividade trófica, sendo distinta da capacidade das MSCs em se diferenciar”

175.

Outra propriedade interessante das MSCs além do seu fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de sinais indutores regulatórios está relacionado ao seu potencial imunomodulatório que as torna candidatas importantes para terapias celulares em uso alogênico. Isso porque as MSCs mediam efeitos imunorreguladores tanto na imunidade inata quanto adaptativa, indiretamente, através de fatores solúveis, ou diretamente, via contato físico direto. Todavia tais propriedades imunomodulatórias ainda não estão totalmente estabelecidas ¹⁷³.

“Uma vez implantadas, as células-tronco seriam capazes de interagir com o microambiente circundante e facilitar a regeneração dos tecidos vizinhos através da secreção de certos fatores e renovação das funções biológicas (como o sistema imunológico) ou agindo troficamente [...]”¹⁷⁵.

Apesar destas considerações e da necessidade de mais conhecimentos básicos para melhor compreender os processos envolvidos na diferenciação e manutenção das MSCs, muito já tem sido estudado quanto as suas possíveis aplicações. Assim sendo, as MSCs estão sendo consideradas ferramentas de reparação, regeneração, substituição e renovação de células/tecidos lesados ou mortos e, portanto, apresentam um potencial muito grande para o tratamento de diversas doenças como Parkinson, esclerose múltipla, Doença de Alzheimer, AVC, lúpus, linfomas e leucemias, diabetes, entre outras ¹⁷³ (Figura 7).



* também considerada doença imune.

Figura 7: Aplicações Clínicas da MSCs. As MSCs têm se tornado as candidatas ideais para os protocolos da medicina regenerativa devido ao seu fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas. Podem ser consideradas ferramentas de reparação, regeneração, substituição e renovação de células/tecidos lesados ou mortos e, portanto, apresentam um potencial muito grande para o tratamento de diversas doenças como Parkinson, esclerose, Alzheimer, AVC, lúpus, linfomas e leucemias, diabetes, entre outras.

Muitos estudos têm mostrado que o transplante de MSCs melhora o perfil metabólico de diversos modelos animais diabéticos e, conseqüentemente, os perfis fisiológicos (Tabela 3) ¹⁷³. Entretanto, os mecanismos responsáveis por tais melhoras ainda estão sendo esclarecidos. Diversas pesquisas são citadas em literatura, como é o caso de Shibata e colaboradores em 2008 ²⁸ e Naruse e colaboradores em 2011 ²⁹ que utilizaram infusão de MSCs em modelo de neuropatia e verificaram que ratos diabéticos induzidos por STZ e infundidos com MSCs apresentaram significativa melhora sobre os mecanismos de hiperalgesia, alodinia e função neural em detrimento da melhora

glicêmica. Lee e colaboradores em 2006¹⁷⁶ mostraram que células tronco mesenquimais humanas (hMSCs) migraram e promoveram reparo tecidual do pâncreas e glomérulos renais em camundongos NOD/Scid diabéticos¹⁷⁶ normalizando a glicose sanguínea dos camundongos diabéticos e aumentando a concentração de insulina no soro em relação aos animais não-tratados, todavia não foi detectada insulina humana na circulação¹⁷⁶. Ou ainda como demonstrado por Karnieli e colaboradores em 2007 que utilizaram MSCs de adultos humanos para a produção de insulina *in vitro*¹⁷⁷. Já Ezquer e colaboradores em 2008¹⁷⁸ mostraram que a administração sistêmica de MSCs aumentou o número de ilhotas pancreáticas e preveniu nefropatia em camundongos com DM-1; revertendo a hiperglicemia e normalizando a glicosúria por no mínimo dois meses após uma única infusão de MSCs (5×10^5 céls)¹⁷⁸.

Nesse tocante, na grande maioria dos estudos utilizando MSCs no tratamento de complicações diabéticas, o efeito terapêutico das MSCs não parece estar associado com sua transdiferenciação nas células residentes que foram danificadas, mas sim parece estar mais relacionado com sua capacidade anti-proliferativa e anti-inflamatória, além da capacidade de estimular a sobrevivência e proliferação de células progenitoras residentes através da produção de citocinas e fatores de crescimento solúveis, ou seja, de seu efeito parácrino¹⁷⁹. Além disso nota-se que a melhora da hiperglicemia e da complicação estudada se dá em períodos curtos de diabetes (5 a 20 dias). Essa melhora não ocorre em períodos a longo prazo (1 a 6 meses) em ratos induzidos por STZ¹⁷⁹. Outrossim, poucos são os estudos que abordam efeitos das MSCs na ND e nas alterações musculares associadas (em decorrência da própria ND ou em decorrência do DM).

Tabela 3: Estudos utilizando MSCs como terapia para o diabetes experimental.

Autores	Modelo diabético	Fonte MSCs	Dose e via de administração	Período da doença	Resultados
Lee et al., 2006 ¹⁷⁶	4 doses de STZ em camundongos machos Nod Scid	Humana	2 doses de 2×10^6 céls. Ventrículo esquerdo	6 e 11 dias após STZ	Reversão da hiperglicemia, regeneração de glomérulos renais e ilhotas pancreáticas
Ezquer et al., 2008 ¹⁷⁸	5 doses de STZ em camundongos machos C57BL/6	Singênica	1 dose de 5×10^5 céls. Veia caudal.	20 dias após STZ	Reversão de hiperglicemia, glicosúria, albuminúria.
Urbán et al., 2008 ¹⁸⁰	5 doses de STZ em camundongos fêmeas C57BL/6	MSC+BMC MSC: alogênica ou singênica	1 dose de 1×10^6 BMC+MSCs ($2,5 \times 10^4$; 5×10^4 ou 1×10^5 céls). Veia caudal	15 dias após STZ	1×10^6 BMC + 1×10^5 MSCs foram suficientes para reverter a hiperglicemia BMC ou MSC sozinhas não funcionaram. Inibição de linfócitos T específicos.
Shibata et al., 2008 ²⁸	1 dose de STZ em ratos machos Sprague-Dawley	Alogênica	1 dose de 1×10^6 céls no Sóleo e músculo direito da coxa	8 semanas após STZ	Melhora da hipoalgesia e aumento de VEGF e bFGF. Efeito parácrino das MSCs.
Naruse et al., 2011 ²⁹	1 dose de STZ em ratos machos Sprague-Dawley	Autologênica	1×10^6 céls em 10 pontos unilaterais do quadríceps e bíceps femurais e sóleo	4 semanas após STZ	Melhora da hiperalgesia e alodinia. Resgate da função neural e melhora da dor neuropática.
Bueno e al., 2015 ³⁰	Dieta hipercalórica em camundongos <i>Swiss</i>	Alogênica	4 doses de $5-8 \times 10^6$ céls intraperitoneal	24 semanas após STZ	Aumento da sensibilidade à insulina, redução da hiperglicemia e apoptose das ilhotas pancreáticas.

Assim sendo, 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 avaliem as alterações e/ou adaptações que ocorrem nas fibras musculares, principalmente moleculares, após a infusão de MSCs.

O uso de MSCs como terapia regenerativa para impedir ou recuperar a ND permanece controverso, como demonstrado pelo estudo de Jeong e colaboradores em 2011¹⁸¹, que observou a formação de tumores quando as MSCs foram injetadas diretamente no músculo. Entretanto, recentemente, Secco e colaboradores em 2012¹⁸² estudaram a combinação de MSCs injetadas intraperitonealmente e IGF-1 sistemicamente em ratos distróficos, observando diminuição da inflamação e da fibrose muscular, sem detecção de tumores nos animais.

Como a neuropatia diabética afeta tanto nervo quanto o músculo, torna-se interessante entender os possíveis efeitos de um tratamento terapêutico envolvendo MSCs. Isso porque, como visto, as MSCs representam uma ferramenta potencial para o tratamento de complicações diabéticas apesar desse potencial ainda não ser totalmente explorado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos *Wistar* machos adultos obtidos através da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP - São Paulo, Brasil) foram aclimatados e mantidos em gaiolas de polipropileno sob temperatura umidade e iluminação controladas (12/12 h de ciclo claro-escuro) e com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos (Processo 051/2012) e foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Instituto de Recursos de Animais de Laboratório, Academia Nacional De Ciências, Washington, DC) e os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Indução do Diabetes Mellitus

Após sete dias de aclimação, os animais (225 ± 25 g), 5 a 11 animais/grupo, foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Controle (C), Diabético (DM) e Diabético tratado com MSCs (BM-MSC). Os ratos diabéticos receberam streptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, 60 mg / kg, intraperitoneal) e os ratos do grupo Controle receberam veículo (citrato de sódio, intraperitoneal) de acordo com Morrow em 2004¹⁸³. Após 1 semana, os ratos com um nível de glicose no sangue acima de 250 mg / dL foram considerados diabéticos e foram utilizados nos experimentos¹⁸³.

A massa corporal e a glicemia de jejum foram determinadas semanalmente. Foram colhidas amostras de sangue da veia da cauda e os níveis de glicemia foram medidos pelo medidor de glicose Accu-Check (Roche Diagnostic, Indianapolis, EUA).

3.3 Isolamento, cultura e caracterização das MSCs

As células da medula óssea foram isoladas das tíbias e fêmures de ratos *Wistar* machos, com idades entre 6-8 semanas de acordo com Bueno e colaboradores em 2015³⁰. Após lavagem e centrifugação, as células foram ressuspensas em meio α -mínimo (Gibco, Auckland, Nova Zelândia) suplementado com 15% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, EUA) e 100 ug/ml de penicilina (Gibco) (Gibco) e 2 mM de L-glutamina (Gibco) colocado em um frasco de cultura (75 cm²) para isolar o estroma mesenquimal multipotente (densidade de 5 x 10⁶ células nucleadas/frasco). As células foram incubadas numa atmosfera umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 °C. As células não aderentes foram removidas através da troca do meio após 3 dias de cultura. As culturas primárias confluentes foram lavadas com PBS e ressuspensas por incubação com tripsina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) a 37 °C durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado RPMI1640 (Gibco), suplementado com 10%^b de soro bovino fetal (HyClone, Logan, UT, Canadá) para neutralizar o excesso de tripsina. As células foram centrifugadas e semeadas num frasco de cultura de 75 cm² (densidade de 5 x 10⁶ células nucleadas / frasco) contendo 15 mL de meio de cultura. Passagens subsequentes foram realizadas de forma semelhante até a quinta passagem.

As células foram caracterizadas na 5^a passagem. Para isso, uma alíquota de MSCs tripsinizadas da quinta passagem foi corada com anticorpos monoclonais conjugados com ficoeritrina (PE) contra anticorpos monoclonais conjugados com CD31, CD45 ou isotiocianato de fluoresceína (FITC) contra CD29, CD44 e 11b (Becton-Dickinson / BD, San Jose, CA, EUA) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Tanto CD29 como CD44 foram considerados como marcadores de MSCs. As células coradas foram lavadas

e analisadas imediatamente no citômetro de fluxo FACSort utilizando o software CellQuest (BD).

As células aderentes foram ainda caracterizadas de acordo com o seu potencial diferencial osteogênico e adipogênico *in vitro*. A diferenciação osteogênica foi induzida por cultura de MSCs confluentes durante 3 semanas em meio α -mínimo (Gibco) suplementado com 7,5 %^b de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, EUA), 1 μ M dexametasona, 200 μ M ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 10 mM β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich). Para observar a deposição de cálcio, as culturas foram analisadas pela coloração de von Kossa³⁰. A diferenciação adipogênica, por sua vez, foi induzida por cultura de MSCs confluentes durante duas semanas em meio α -mínimo (Gibco) suplementado com 15%^b de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT, EUA), 100 mM dexametasona (Prodome, Campinas, SP), 10 μ g / mL Insulina (Sigma-Aldrich) e 100 uM de indometacina (Sigma-Aldrich). As células foram então analisadas por coloração Sudão II-Scarlat^{30,172, 184}.

3.4 Infusão de MSCs

Foram utilizadas MSCs de medula óssea entre quarta a quinta passagem para infusões múltiplas. Após 10 semanas da indução do *DM*, os ratos BM-MSc receberam quatro injeções intraperitoneais de 1×10^6 MSCs ressuspensas em 500 μ L de PBS, com uma semana de intervalo entre cada uma. Os grupos diabéticos e Controle receberam 500 μ L de PBS.

b: As concentrações de soro bovino fetal variam de acordo das exigências de cada linhagem.

3.5 Testes de Comportamento e Funcional

Todos os ensaios comportamentais e funcionais foram realizados antes da indução do diabetes, imediatamente antes do transplante de MSCs e 10 semanas após o transplante de MSCs. O teste de Von Frey e Análise de Pegada foram utilizados para caracterizar o modelo de neuropatia diabética e disfunção neuromuscular como descrito anteriormente^{185,186}.

3.5.1 Teste de Von Frey

O comportamento relacionado com a dor induzido por estimulação mecânica foi medido com teste de pata mecânico nociceptivo com o filamento medidor de pressão eletrônico Von Frey de (estesiômetro eletrônico Von Frey, IITC Inc., Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, EUA)¹⁸⁵. Os ratos foram colocados individualmente numa gaiola de madeira (15 x 15 x 15 cm) com um chão de arame e aclimataram na câmara de ensaio durante pelo menos 15 minutos antes das medições. Subsequentemente, um único filamento de Von Frey de 0,5 mm de espessura foi aplicado perpendicularmente à superfície plantar da pata traseira direita com uma pressão gradualmente crescente medida em gramas. O levantamento abrupto da pata, lambe ou agitar foi registado como uma resposta positiva.

3.5.2 *Análise de Pegada*

A função motora distal coordenada foi analisada pela análise de pegada ¹⁸⁶. Os animais foram testados em uma passarela confinada (42 x 8 cm) com um abrigo escuro no final. Após três testes de condicionamento durante os quais os animais pararam para explorar o corredor, os ratos tiveram suas patas traseiras mergulhadas em tinta preta, e as pegadas foram deixadas em papéis brancos (previamente colocados no assoalho do corredor) enquanto caminhavam pela trilha¹⁸⁷. As pegadas foram então escaneadas e o ângulo de desvio do eixo mediano do pé em relação ao eixo de movimento (isto é, o ângulo da pata traseira) foi medido em uma pegada claramente visível de cada animal ¹⁸⁸ (Anexo 2).

3.6 Desenho Experimental

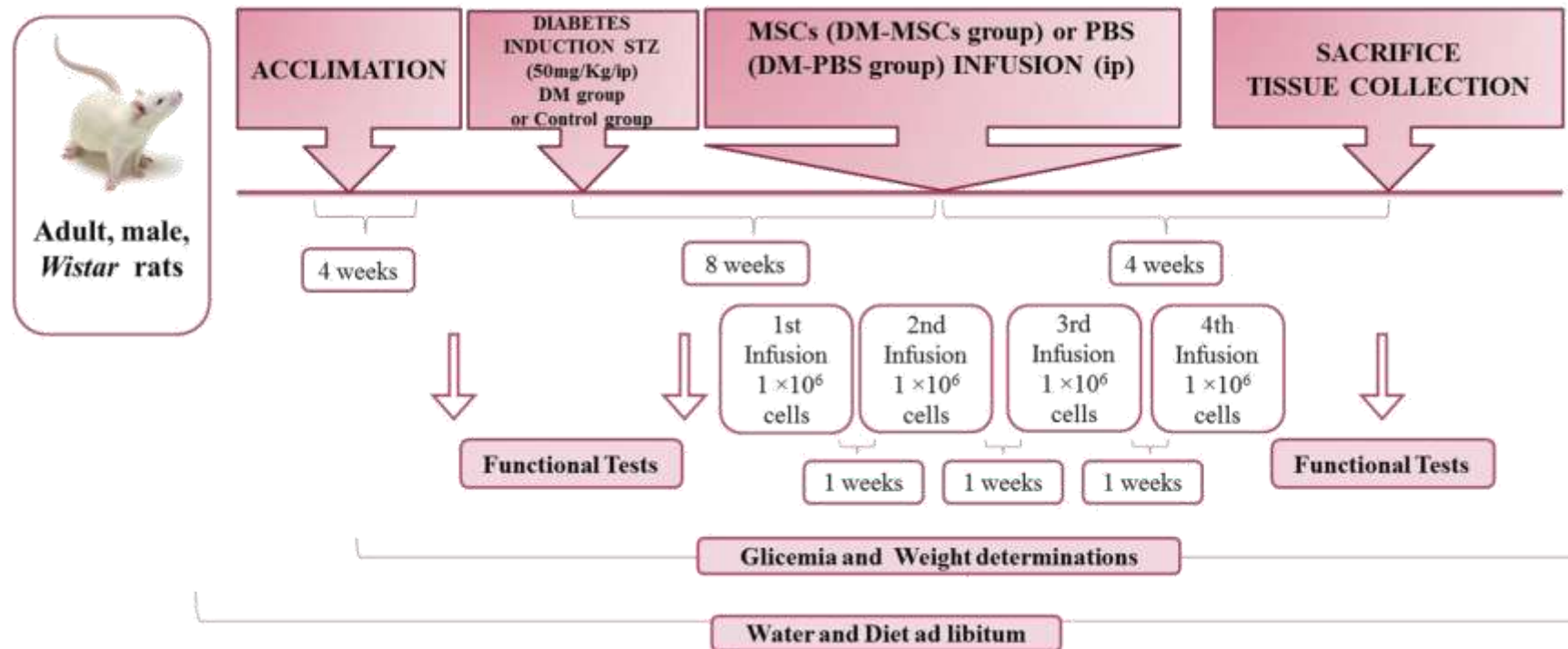


Figura 8: Desenho experimental. Ratos saudáveis machos foram aclimatados por 4 semanas e, em seguida, foram divididos em 3 grupos experimentais: Controle (C), Diabéticos (DM) e Diabéticos tratados com MSCs (BM-MSC). Ratos dos grupos DM e BM-MSC foram induzidos por STZ. Todos os animais receberam água e dieta ad libitum e seu peso e glicemia foram mensurados semanalmente. Após 8 semanas da confirmação do DM, o grupo BM-MSC recebeu semanalmente 4 injeções de MSCs por um período de 4 semanas. Após 11 semanas a partir da última infusão, todos os ratos foram eutanasiados e os músculos TA coletados. Todos os grupos passaram por testes funcionais (pegada e Von Frey).

3.7 Histologia do Músculo Tibial Anterior

Os músculos tibiais anteriores (TA) foram coletados de ambas as pernas e em seguida, foram divididos. O fragmento proximal (dividido em 2 partes) foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C (Forma Scientific, Marietta, OH) para a análise de RNAm e proteínas e o fragmento distal foi utilizado para as medidas histológicas e morfométricas^{189,190} (Figura 9).

O corte histológico da secção transversal (10 µm) da região ventral de cada músculo foi obtido através de criostato (Microm HE 505, Jena, Germany), e corado com kit de Tricoma de Masson para avaliar a morfologia geral do músculo, seguindo as normas do fabricante (HT15; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO)¹⁹¹ e corados com Azul de Toluidina/1% Borax (TB) para quantificar o número de fibras totais, tecido conjuntivo e núcleos centralizados. Imagens da região central do ventre foram obtidas usando microscópio (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipado com câmera Carl Zeiss AxioCam HRc para a visualização das áreas das fibras musculares (AST). As ASTs de 100 fibras aleatórias de cada imagem foram mensuradas usando o programa AxioVS40 V4.8.2.0 SP2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany), como previamente descrito³⁸. A quantificação da densidade de tecido conjuntivo foi calculada dividindo o número total de pontos coincidentes nas intersecções de linhas retas no tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) pelo número total de pontos em uma grade com área total de 10.800 µm² contendo 168 intersecções^{192,193}. Em adição, a porcentagem de fibras contendo núcleos centralizados foi calculada para cada grupo dividindo o número total de fibras

com núcleos centralizados pelo número total de fibras em imagens de ampliação de 400 vezes¹⁹⁴.

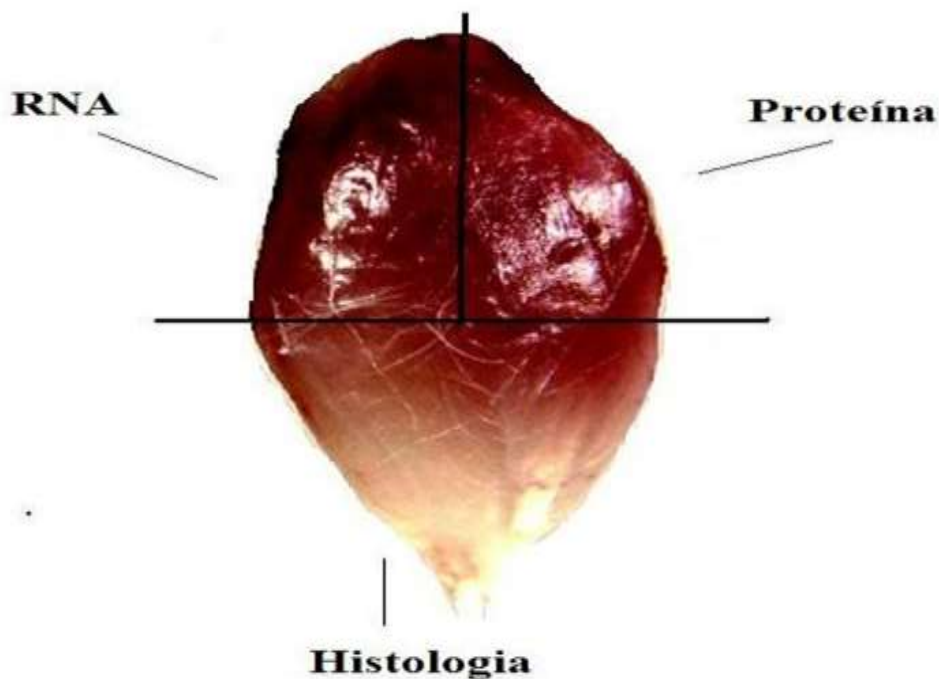


Figura 9: Divisão do TA. O fragmento proximal (dividido em 2 partes) foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C (Forma Scientific, Marietta, OH) para a análise de RNAm e proteínas e o fragmento distal foi utilizado para as medidas histológicas e morfométricas.

3.8 Expressão de RNAm no Músculo Esquelético

O RNA total foi extraído a partir das amostras congeladas de músculos tibiais anteriores usando Trizol Reagent (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Um μg de RNA foi tratado utilizando DNase I (Sigma) e sintetizado em cDNA utilizando *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-rad), de acordo com as instruções do fabricante.

A expressão dos genes foi determinada por qPCR. Os *primers* foram concebidos utilizando o Primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram avaliados os genes atrogina-1, MuRF-1, Mst, MyoD, IGF-1, NFkB, TWEAK, Fn-14 e p38 MAPK e os genes endógenos pPLA, GAPDH e β -act. Foi também realizado um branco sem amostra para molde (apenas água), *primers* e *SYBR green*.

Os níveis de transcrição de RNAm para cada grupo foram analisados simultaneamente e as reações foram realizadas em duplicata utilizando o corante fluorescente de *SYBR green* para detecção (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) e 180 nM de cada *primers* num volume final de 20 μ l. O qPCR foi realizado e monitorizado utilizando o Sistema de Detecção de PCR em Tempo Real CFX 96 TouchTM (Versão 3.0, Bio-Rad, Hercules, Califórnia). Os dados foram analisados utilizando o método do limiar de ciclo comparativo (Ct). A expressão do gene alvo foi normalizada através do GAPDH porque este gene não é afetado pela atrofia muscular. A quantidade relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. As seqüências de *primers* utilizados para o qPCR são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Seqüências de *primers* para a expressão genica analisada por qPCR.

<i>Primer</i>	Name	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	5'-CCA CCA ACT GCT TAG CCC- 3'	5'-GCC AAA TTC GTT GTC ATA CC -3'
pPLA	phospholipase A	5'-TGG CAA ATG CTG GAC CAA AC-3'	5'-TGC CTT CTT TCA CCT TCC CAA-3'
B-act	β -actin	5'-CAG GCA TTG CTG ACA GGA TG- 3'	5'-TGC TGA TCCACA TCT GCT GG-3'
Atr-1	Atrogina-1	5'-TAC TAA GGA GCG CCA TGG ATA CT-3'	5'-GTT GAA TCT TCT GGA ATC CAG GAT-3'
MuRF-1	Muscle RING-Finger protein-1	5'-TGT CTG GAG GTC GTT TCC G-3'	5'-ATG CCG GTC CAT GAT CAC TT-3'
Mst	Myostatin	5'-GTG ACG GCT CTT TGG AAG ATG-3'	5'-AGT CAG ACT CGG TAG GCA TGG-3'
MyoD	Myogenic differentiation 1	5'-GGA GAC ATC CTC AAG CGA TGC-3'	5'-AGC ACC TGG TAA ATC GGA TTG-3'
IGF-1	Insulin-like growth factor 1	5'-GCT TGC TCA CCT TTA CCA GC-3'	5'-AAG TGT ACT TCT TTC CTT CTC-3'
NFkB RelA/p65	Fator nuclear kappa B RelA/p65	5'-CAT TGA GGT GTA TTT CAC GG-3'	5'-GGC AAG TGG CCA TTG TGT TC-3'

TWEAK	Tumor Necrosis Factor-like Weak	5'-GCT ACG ACC GCC AGA TTG GG-3'	5'-GCC AGC ACA CCG TTC ACC AG-3'
Fn-14	Fibroblast Growth Factor-Inducible 14	5'-AAG TGC ATG GAC TGC GCT TCT T-3'	5'-GGA AAC TAG AAA CCA GCG CAA-3'
p38 MAPK	<i>p38</i> mitogen-activated protein kinase	5'-CGA AAT GAC CGG CTA CGT GG-3'	5'-CAC TTC ATC GTA GGT CAG GC-3'

3.9 Expressão proteica do Músculo Esquelético

As proteínas foram extraídas em tampão RIPA e inibidores contendo Tris-HCl (10 mM), pH 7,5; NaCl (150 mM); NP40 (1%); SDS (0,1%); Glicerol (10%), DOC (1%); Pirofosfato de sódio (10 mM); Ortovanadato de sódio (1 mM); Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF - 2 mM); NaF (10 mM) e Inibidor de protease (Sigma). Os extratos musculares foram homogeneizados (3 ciclos de 30 segundos cada) e subsequentemente, foram sonicados em potência máxima durante 15 s a 4 ° C (Sonics Vibra-CellTm VCX 130 - Biovera) por duas vezes. A solução foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 min a 4 ° C. O sobrenadante foi removido e imediatamente transferido para um congelador a -80 ° C para armazenamento até à análise de *Western blotting*. Para determinar o teor de proteína total numa alíquota a partir do sobrenadante utilizou-se a metodologia de *Bradford*.

Para a análise por *Western blotting*, foram adicionados tampão *Laemmli* à uma alíquota das amostras, seguido por aquecimento a 95 ° C durante 5 min. Cada alíquota continha 80 µg de proteína, aplicada em eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio a 12% (p / v) de bisacrilamida (Invitrogen, EUA) (SDS-PAGE) com um sistema tampão de corrida Tris / glicina. A transferência foi realizada em membrana de nitrocelulose utilizando uma unidade de eletrotransferência *semidry* (Bio-rad) a 10 V durante 40 minutos. Foi utilizado um padrão pré-colorido para determinar o peso

molecular das proteínas (Kalidoscope Standards Prestained, Bio-Rad, Brasil). As membranas foram coradas com *Red Ponceau* para confirmar a qualidade de execução e depois lavadas com TBST e incubadas com anticorpos contra atrogina-1 (IgG, 1: 500, EMC Biosc.); Murf-1 (IgG, policlonal, 1: 500, Gene- Tex, USA) e α -Tubulina (IgG, monoclonal, 1: 1000, Sigma, EUA) para normalização.

Em seguida, as membranas foram enxaguadas em TBST e incubadas com anticorpo secundário (IgG, anticorpo completo ligado a peroxidase de coelho ou IgG, anticorpo completo ligado a peroxidase de rato, 1: 1000). A análise densitométrica das bandas foi realizada utilizando o software Gene Tools da imagem, versão 3.06 (Syngene, Cambridge, Reino Unido), utilizando um sistema de quimioluminescência (Chemic DocTM MP Imaging System, Bio-Rad, Hercules)¹⁹¹.

3.10 Análise Estatística

Para a análise estatística, os valores foram expressos como médias \pm SEM. O teste de *Shapiro-Wilk* e o teste de *Levene* foram aplicados para avaliar a normalidade e homogeneidade dos resultados, respectivamente. Utilizou-se *One way* ANOVA para analisar a expressão de RNAm de Atr-1, MuRF-1, IGF-1, Mst, MyoD, NFkB, TWEAK, Fn-14 e p38 MAPK e expressões proteicas de Atr-1 e MuRF-1; quantidade de núcleos centralizados, densidade de tecido conjuntivo, área e número de fibras musculares e massa muscular. Utilizou-se *Two way* ANOVA para analisar glicemia, massa corporal, o teste de von Frey e análise de pegada. O teste de *Tukey* foi utilizado para análise *post hoc*. Em todos os testes, a significância estatística foi estabelecida em 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização de MSCs alogênicas derivadas de medula óssea

As MSCs foram caracterizadas pelo seu potencial diferencial osteogênico e adipogênico (Fig. 10A, Fig. 10B e Fig. 10C). As BM-MSCs alogênicas expressaram marcadores de células mesenquimais típicos (Fig. 10D) como descrito anteriormente pelo nosso grupo³⁰. As MSCs coraram positivamente para CD44 (87,92%) e CD29 (89,47%) e negativamente para CD31 (1,5%), CD45 (1,07%) e CD11b (3,14%).

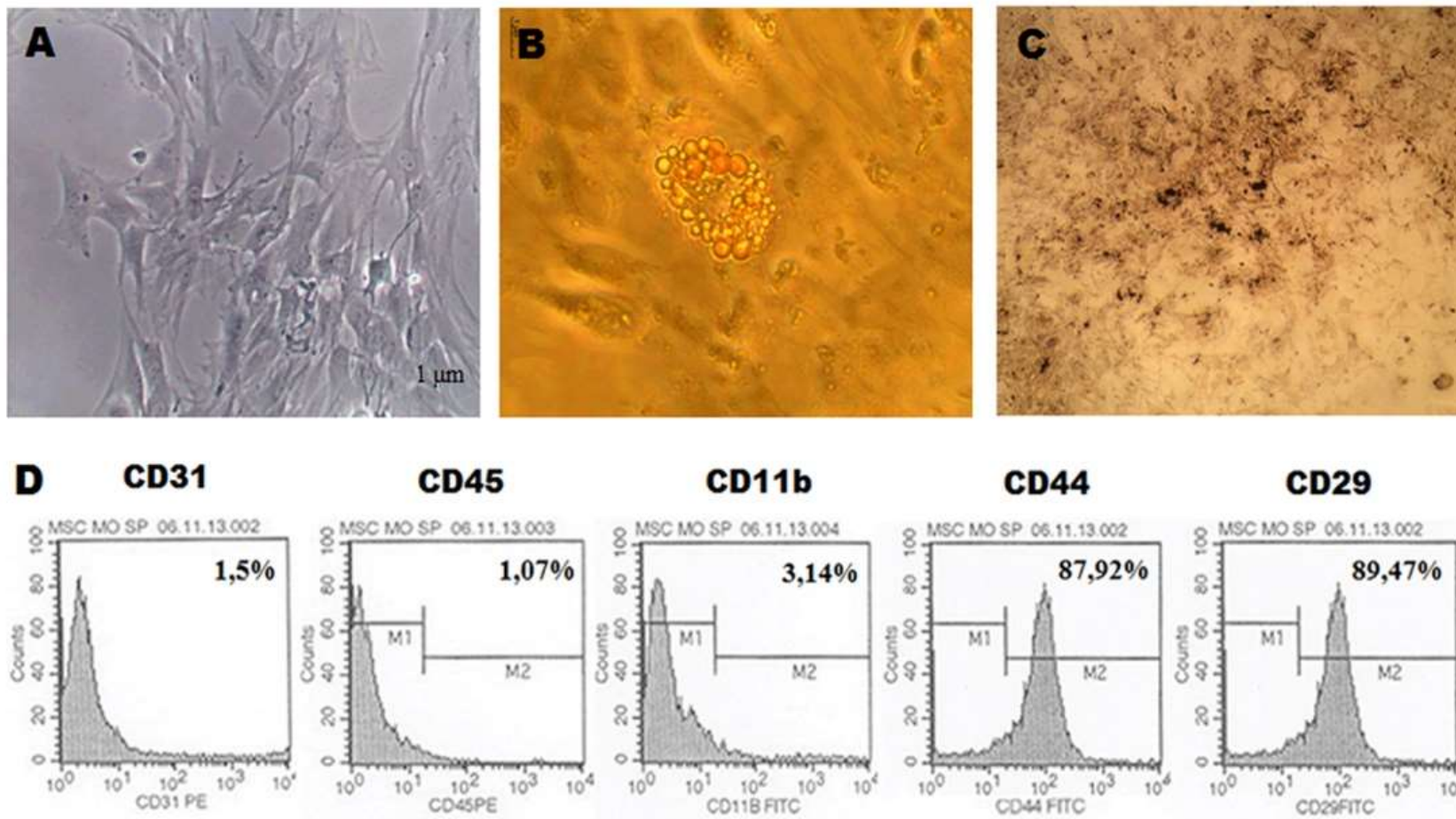


Fig. 10: MSCs derivadas de medula óssea isoladas de ratos Wistar.

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

4.2 Massa corpórea e Glicemia

A massa corporal dos animais do grupo DM foi significativamente mais baixa do que os animais do grupo Controle, começando na 2ª semana até ao final do período experimental. A massa corporal dos grupos BM-MSK e DM não se diferenciaram ao longo do período experimental (Fig. 11A). Os animais diabéticos tiveram um nível significativamente mais elevado de glicemia de jejum em comparação com os animais do grupo Controle desde a 1ª semana após a indução da diabetes. A glicemia de jejum dos grupos BM-MSK e DM não foram diferentes ao longo do período experimental (Fig. 11B).

4.3 Testes Comportamentais

4.3.1 Teste de Von Frey

Os efeitos do transplante de MSCs no comportamento nociceptivo são mostrados na Fig. 12A. Antes da indução de diabetes não houve diferença dos valores de força aplicados para causar a retirada da pata entre os grupos. Os valores de força aumentaram significativamente em animais do grupo DM antes do transplante de MSCs. Na 10ª semana pós-transplante, houve uma diminuição significativa na resposta de retirada em animais BM-MSK.

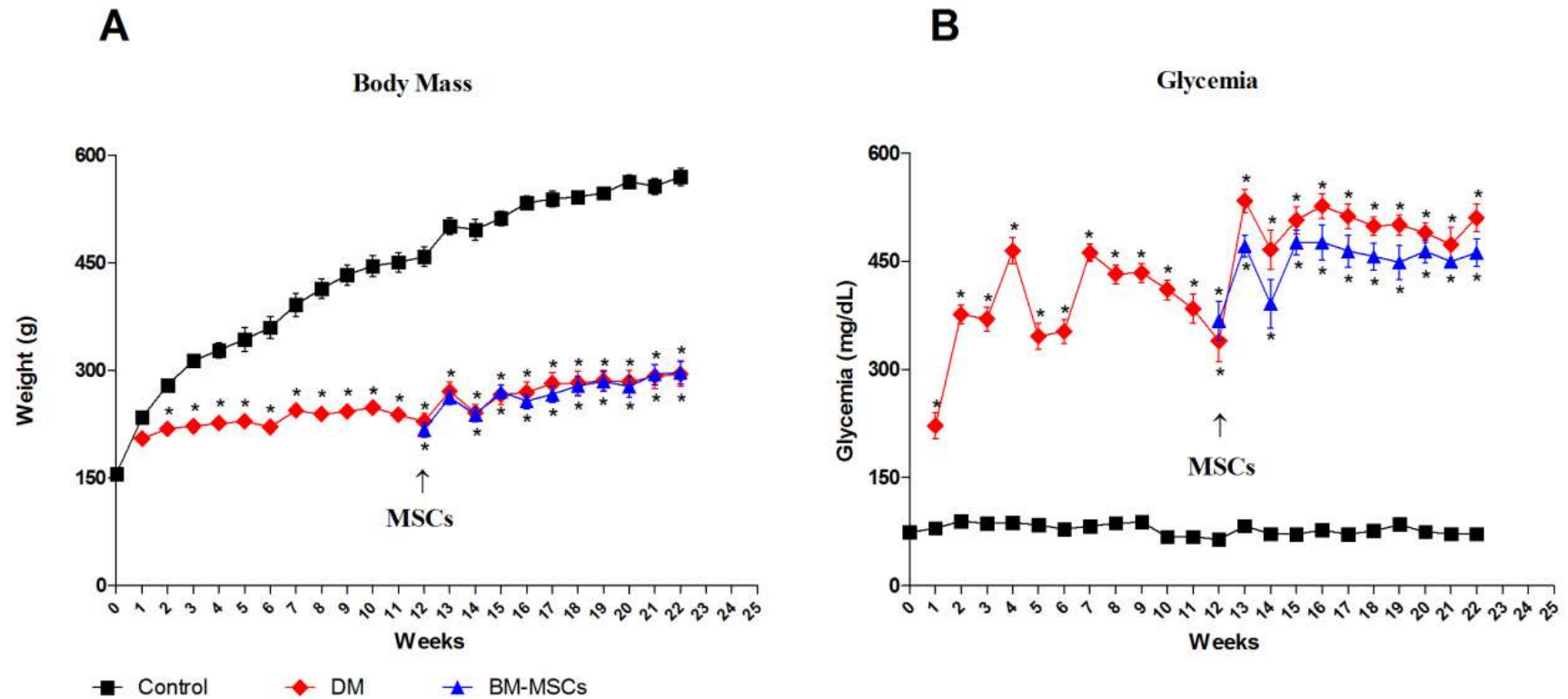


Fig. 11: Massa corporal (g) (A) e Glicemia (mg/dL) (B).

A massa corporal foi significativamente menor e a glicemia de jejum foi significativamente maior em animais DM em comparação com os animais do grupo Controle. A massa corporal e a glicemia não foram diferentes nos animais dos grupos DM e BM-MSC. Os valores foram expressos em média \pm SEM. C - Controle, DM – animais diabéticos e BM-MSC - animais transplantados. (* vs. C, $p < 0,05$)

4.3.2 Análise por Pegada

Os animais do grupo DM se moveram desajeitadamente e mostraram uma abertura angular significativamente maior das patas traseiras em comparação ao grupo Controle. Na 10^a semana após o transplante de MSCs, houve uma redução significativa do ângulo da pata traseira e 40% dos animais BM-MSC mostraram um posicionamento completamente normal das suas patas traseiras. Os efeitos do transplante de MSCs na análise por pegada são mostrados na Fig. 12B.

4.4 Morfologia do Músculo Tibial Anterior

Os animais do grupo Controle mostraram fibras intactas com forma poligonal, núcleos periféricos e feixes musculares bem organizados (Fig. 13A e Fig. 13D). A análise morfológica do músculo mostrou um padrão de atrofia nas fibras musculares em animais DM (Fig. 13B e Fig. 13E) e BM-MSC (Fig. 13C e Fig. 13F). A atrofia das fibras musculares foi confirmada pela AST das fibras e medição da massa muscular (Fig. 13G e Fig. 13H). De acordo com as análises morfométricas do músculo TA, os grupos DM e BM-MSC perderam massa muscular e apresentaram menor área fibrilar do que os animais do grupo Controle. Não houve diferenças significativas entre os grupos DM e BM-MSC. O grupo controle apresentou áreas de fibras musculares três vezes maior do que os outros grupos. As fibras do músculo TA dos animais do grupo DM apresentaram quase o dobro o número de núcleos centralizados ($14,05 \pm 1,6\%$) em comparação com animais BM-MSC ($7,53 \pm 2,6\%$, Fig. 13I).

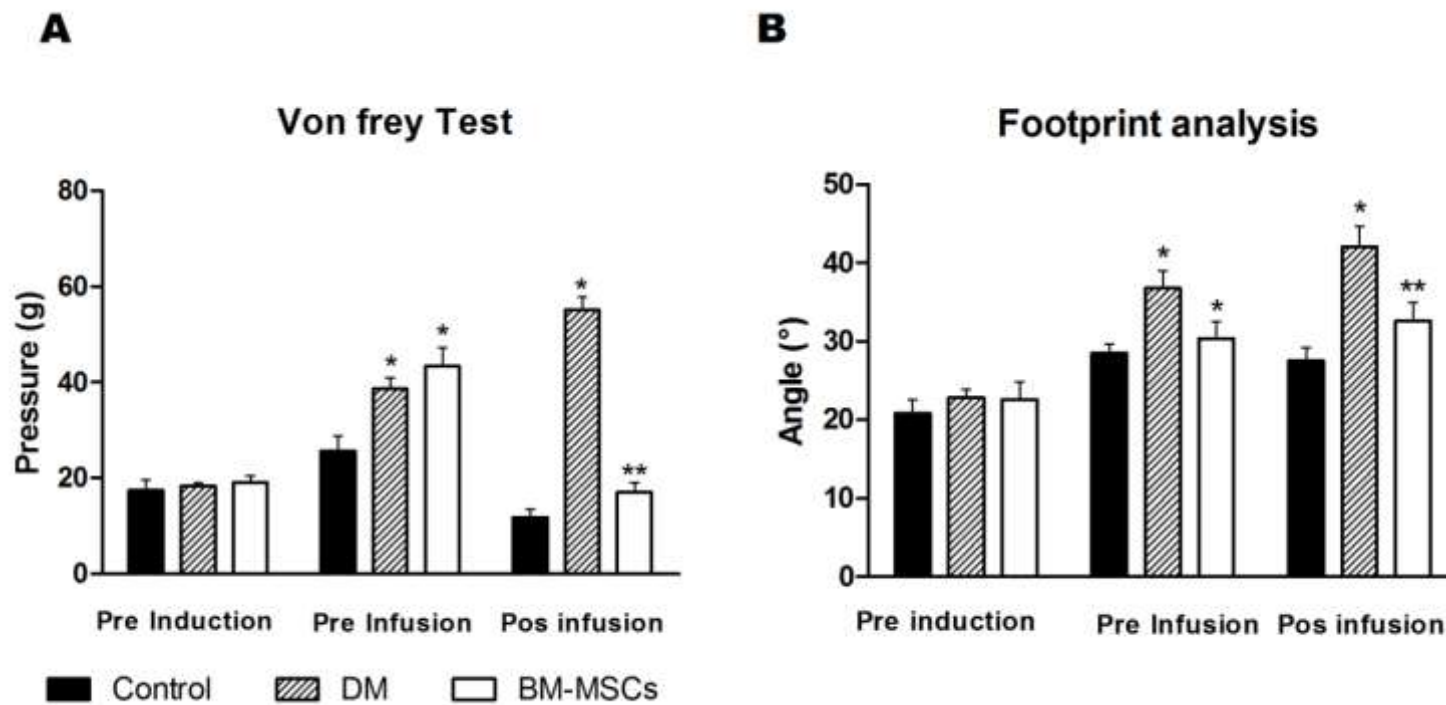


Fig. 12: Teste Von Frey (A) e análise por Pegada (B).

(A) Antes da indução de diabetes não houve diferença dos valores de pressão aplicados para causar a retirada da pata entre os grupos. Antes do transplante os valores de pressão foram significativamente maiores nos animais do grupo DM em relação aos animais do grupo Controle. Após o transplante, os valores de pressão diminuíram significativamente em animais do grupo BM-MSC em comparação com animais diabéticos. (B) Antes da indução, todos os animais tinham marcha normal. Os animais do grupo DM exibiram angulação obtusa das patas traseiras com uma abertura significativamente mais elevada do que os animais do grupo Controle. Após o transplante, o grupo BM-MCS apresentou uma redução significativa do ângulo da pata traseira em comparação com os animais do grupo DM. Os valores foram expressos em média \pm SEM. C - Controle, DM – animais diabéticos e BM-MSC - animais transplantados. (* vs C; ** vs DM, $p < 0, 05$)

Além disso, o tecido conjuntivo aumentou ($34,07 \pm 1,1\%$) nos músculos atrofiados dos animais de DM em comparação com os animais Controles, especialmente em torno das fibras musculares (endomísio) e feixes de fibras (perimísio) (Fig. 13B e Fig. 13J) e diminuiu significativamente em animais BM-MSC em comparação com animais de DM ($18,23 \pm 0,8\%$) (Fig. 13C e Fig. 13J).

4.5 Expressão de RNA em Músculo Tibial Anterior

As expressões de RNAm de TWEAK, IGF-1 e Mst não se diferiram entre os grupos (Fig. 14A, Fig. 14B e Fig. 14C). A expressão gênica de NFkB aumentou em animais do grupo DM e não se alterou após transplante de MSCs (Fig. 14D). Por outro lado, a expressão gênica de MyoD diminuiu em animais de diabéticos; não se alterando após transplante de MSCs (Fig. 14E). As expressões de Atr-1 e MuRF-1 foram significativamente mais elevadas em animais DM em comparação com animais do grupo Controle e diminuiu em animais do grupo BM-MSC (Fig. 14F e Fig. 14G). A expressão de Fn-14 aumentou no grupo DM e superexpressou nos animais transplantados (Fig. 14H). A expressão do RNAm para p38 MAPK não mudou nos animais DM, no entanto aumentou significativamente após o transplante MSCs (Fig. 14I).

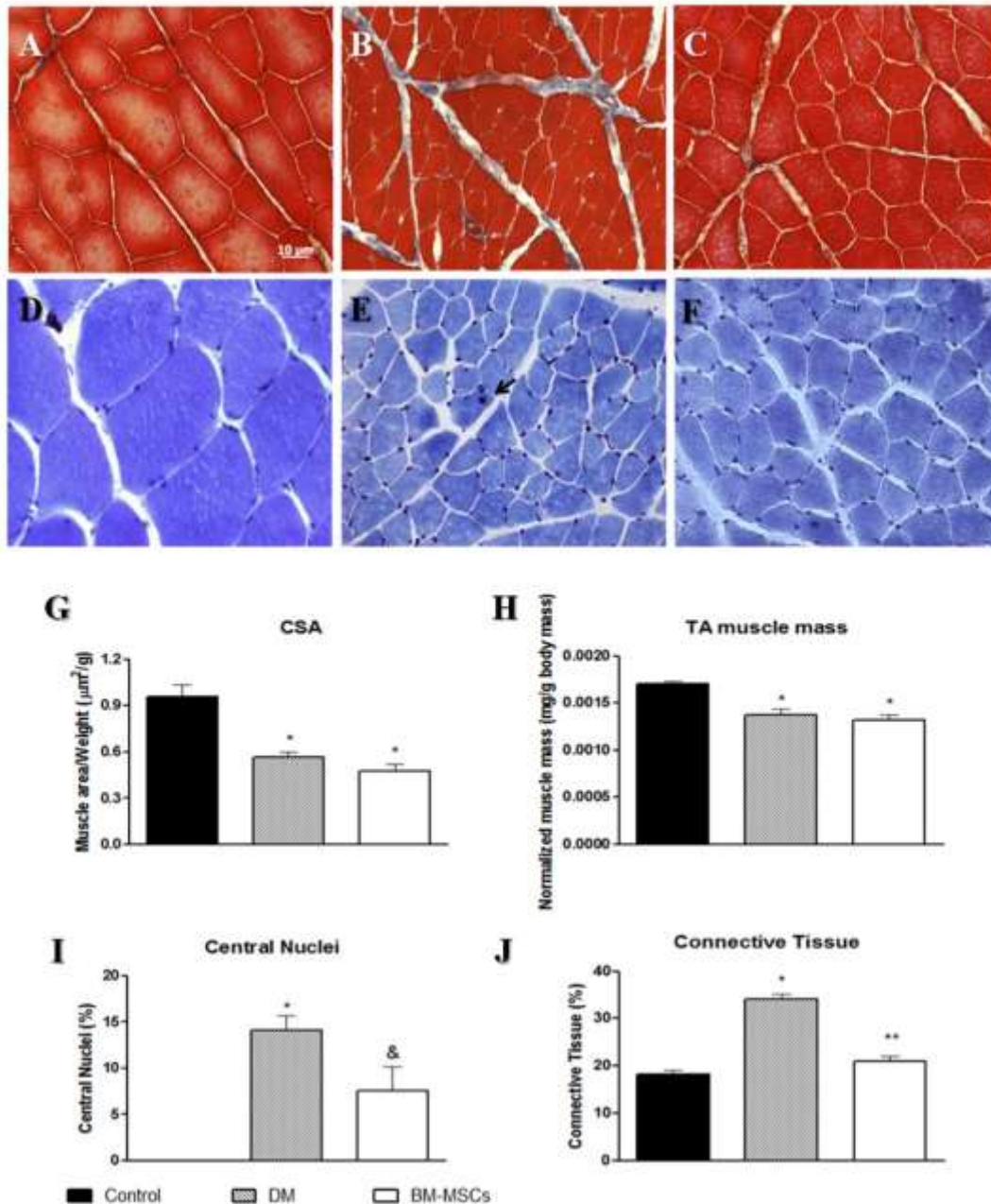


Fig. 13: Morfologia da fibra do músculo tibial anterior.

(A e D) Na análise morfológica, os animais do grupo Controle apresentaram fibras musculares intactas com forma poligonal, núcleos periféricos e feixes musculares bem organizados. A AST foi significativamente menor em animais dos grupos DM e BM-MSC em comparação com animais do grupo Controle. (B e E) Os animais diabéticos, por sua vez, apresentaram uma atrofia generalizada com fibras musculares com formas arredondadas (E) núcleos centrados (seta) e (B) aumento de tecido conjuntivo entre as fibras. (C e F) A mesma morfologia foi observada no grupo BM-MSC. (G) Área das secções transversais das fibras musculares do músculo tibial anterior. (H) Massa muscular. (I) Quantificação de núcleos centrais. (J) Quantificação do Tecido Conjuntivo. Os valores foram expressos como média \pm SEM. Control - animais Controle; DM - animais diabéticos e BM-MSCs – animais transplantados. Ampliação de 400x. (* vs C, ** vs DM, & e diferem para DM; $p < 0,05$; A, B e C: coloração com Tricromo de Masson; D, E e F: coloração com azul de toluidina).

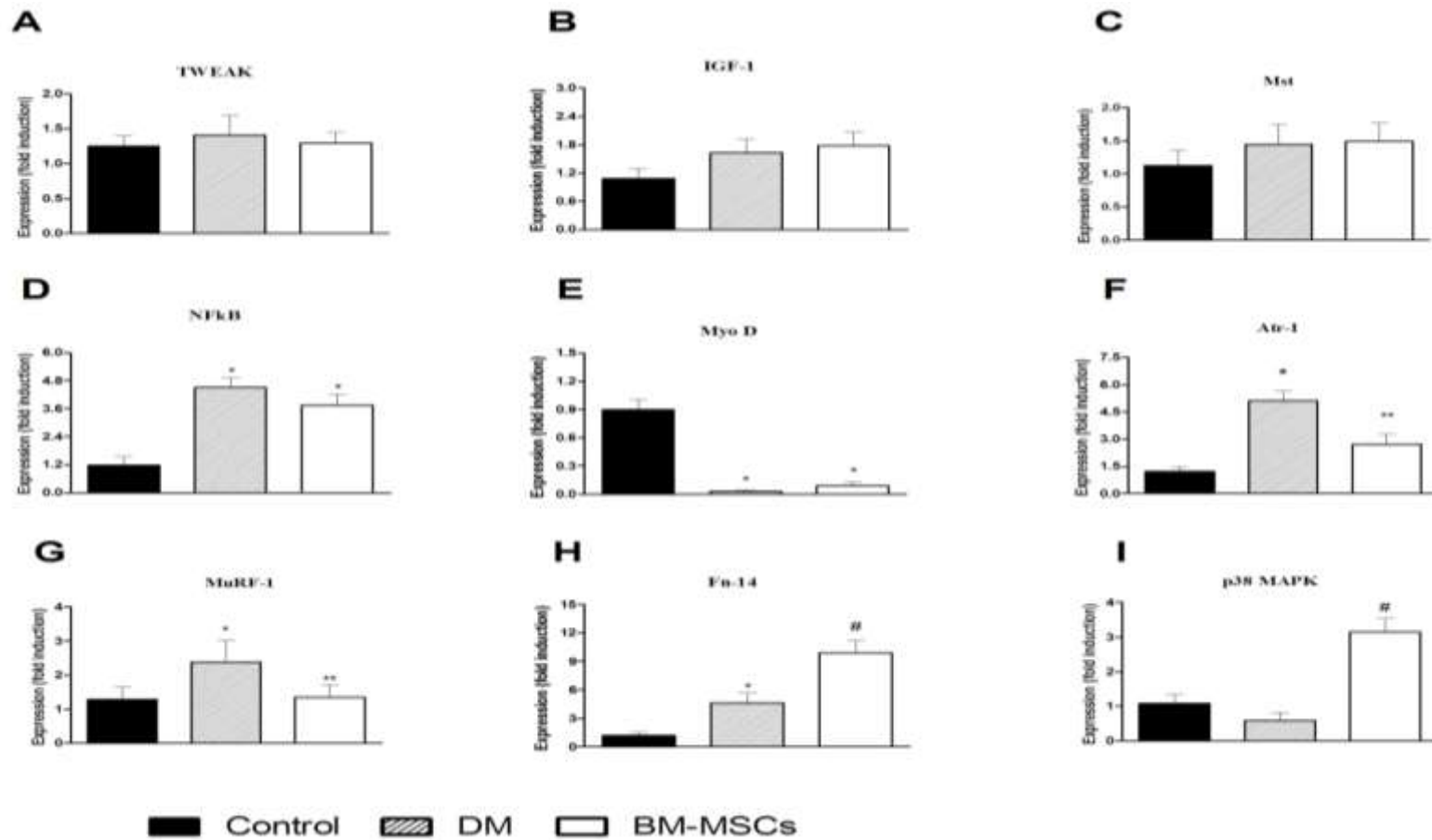


Fig. 14: Expressão de RNAm no Músculo Tibial Anterior.

TWEAK (A); IGF-1 (B); Mst (C); NFkB (D); MyoD (E); Atr-1 (F); MuRF-1 (G); Fn-14 (H); p38 MAPK (I) para cada grupo de ratos. Os dados foram expressos em média \pm SEM, 5 animais/grupo. Control – Controle; DM – animais diabéticos e BM-MSC - animais transplantados. (* vs C; ** vs DM, # superexpressão, $p < 0,05$).

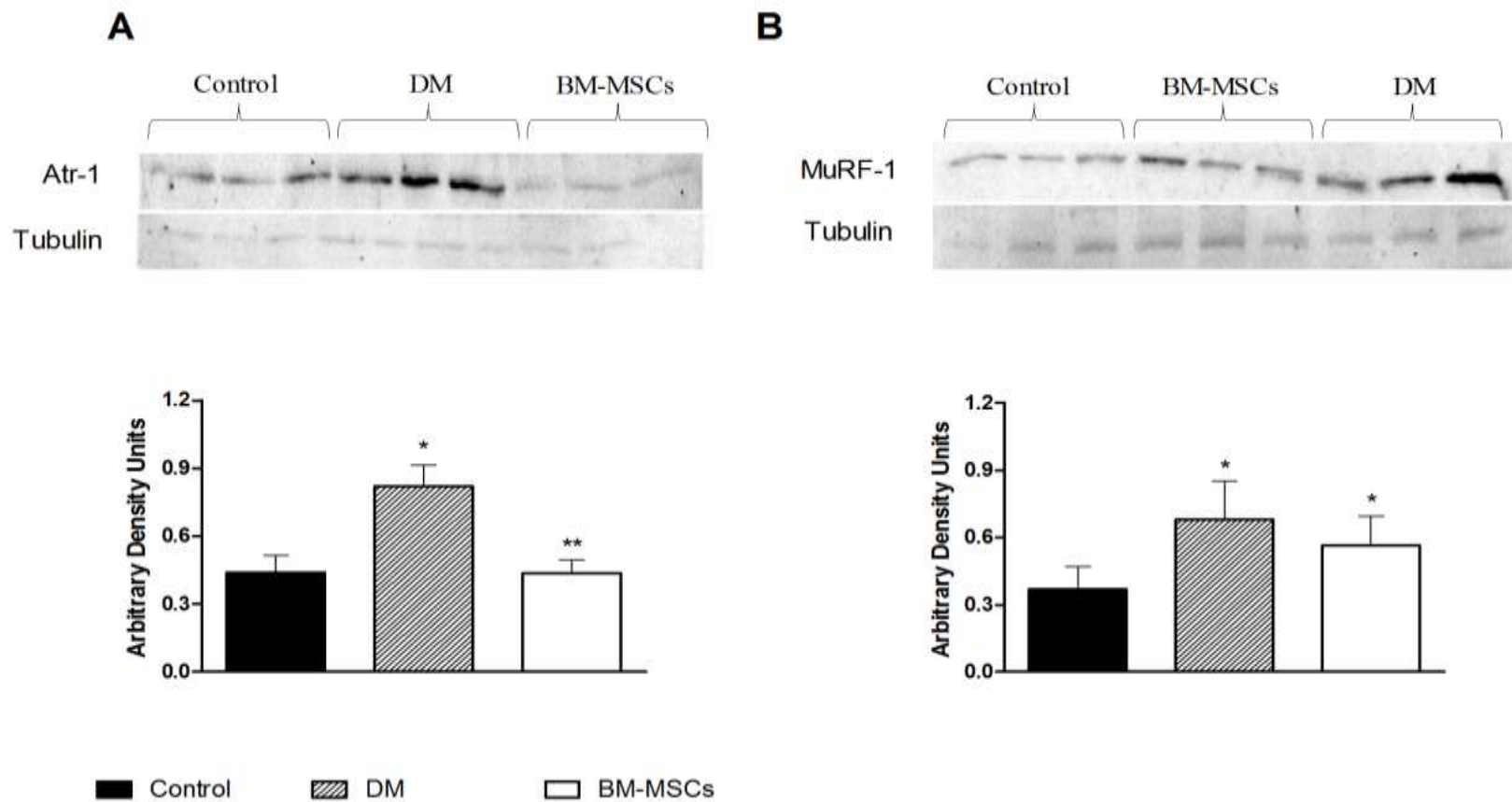


Fig. 15: Expressão proteica de Atr-1 (A) MuRF-1 (B) no Músculo Anterior Tibial.

Os valores foram expressos em média \pm SEM. Control- Controle; DM – animais diabéticos e BM-MSC – animais transplantados. (* vs C; ** vs DM, $p < 0,05$).

4.6 Expressão Proteica no Músculo Tibial Anterior

A expressão proteica de MuRF-1 e Atr-1 aumentou significativamente em animais diabéticos. Após o transplante de MSCs, a expressão da proteína Atr-1 diminuiu significativamente, contudo a expressão da proteína MuRF-1 não se alterou (Fig. 15A e Fig. 15B, respectivamente).

5 DISCUSSÃO

Os resultados mostram que as múltiplas injeções de BM-MSCs alogênicas são capazes de melhorar o comportamento nociceptivo e a função neuromuscular bem como modular a expressão de marcadores de atrofia muscular em modelo de roedor diabético. Até onde se sabe, este é o primeiro relato dos efeitos de BM-MSCs em expressões de marcadores associados à perda da massa muscular em *DM*.

O *DM* induzido por STZ é o modelo animal diabético mais comum utilizado para estudar a disfunção neuromuscular no Diabetes. Para tanto, estudos anteriores indicaram que a inibição da recuperação muscular relacionada à hiperglicemia pode, pelo menos em parte, explicar a atrofia observada nesses animais¹⁹⁵. Como por exemplo, estudos realizados por Medina-Sanchez e colaboradores em 1991¹⁹⁶ e Aughstee e colaboradores em 2006¹⁹⁷ que mostraram que o diabetes induzido por STZ causou importantes alterações metabólicas e histomorfométricas no músculo esquelético gerando atrofia de fibras do tipo II em quadríceps, reto femoral e músculo extensor longo dos dedos (EDL); com redução do diâmetro das fibras musculares e hiperplasia de fibras musculares. Esses

relatos também foram comprovados por Hegarty e Rosholt ¹⁹⁸, Fahim e colaboradores ¹⁹⁹, Klueber e Feczko ²⁰⁰, e Ozaki e colaboradores ²⁰¹. De mais a mais, outros estudos realizados por Rodriguez e colaboradores em 1997 ²⁰² e Ashford e Pain em 1986 ²⁰³ mostraram uma diminuição na síntese protéica e um aumento na degradação ribossômica associada a alterações nos aminoácidos circulantes e musculares no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos induzidos por STZ ^{202,203}. Chaudhary e colaboradores ²⁰⁴, a partir do estudo nos músculos das patas anteriores e posteriores dos ratos diabéticos estreptonizados, demonstraram uma diminuição no peso e teor de proteína dos músculos de contração rápida (fibras tipo II). Eles concluíram que as alterações atroficas nos músculos esqueléticos em decorrência do diabetes variam de acordo com a composição e função das fibras; sendo condizentes com Cotter e colaboradores em 1988 ⁷ que mostraram que músculos de fibras do tipo rápida (tipo II) como EDL e TA são mais susceptíveis a atrofia do que músculos de fibras tipo lenta (tipo I) como sóleo.

No presente estudo, ratos diabéticos induzidos por STZ desenvolveram hiperglicemia, disfunção sensório-motora e atrofia muscular (Fig. 11, Fig. 12 e Fig.13). O estudo morfológico revelou uma redução da área transversal das fibras em TA além de um número crescente de núcleos centralizados e aumento da quantidade de tecido conjuntivo em animais diabéticos; o que caracteriza existência de atrofia muscular e sinais de fibras em processo de degeneração, regeneração incompleta e fibrose. O aumento progressivo da fibrose intersticial muscular, como demonstrado por estudos anteriores, impede a migração de células miogênicas necessárias para a formação muscular ²⁰⁵ e consequentemente pode impor restrições mecânicas como dificuldades ao caminhar e redução da amplitude de movimentos articulares.

Além disso, o processo de atrofia do músculo esquelético causado pela depleção de insulina é bastante complicado e envolve vários mecanismos que se sobrepõem,

incluindo distúrbios metabólicos, alterações dos vasos sanguíneos, degeneração da placa motora e comprometimento da síntese das proteínas do miócito ¹⁹⁷.

Na presença de hiperglicemia persistente, portanto, a inflamação crônica leva à liberação de citocinas que desencadeiam e modulam fatores associados à neuropatia e à atrofia muscular diabética, principalmente pela ativação das vias NFkB e p38 MAPK ^{14,95,206}. Isso acarreta em um ambiente tóxico que leva a morte celular e necrose tecidual²⁰⁷ dificultando ou interrompendo a troca de nutrientes e atrasando ou inibindo o processo de recuperação tecidual.

Assim, o aumento do número de núcleos centralizados e tecido conjuntivo em animais diabéticos (Fig. 13) podem estar associados as moléculas inflamatórias e aos processos de degradação proteica através da ativação da via NFkB e TWEAK/Fn-14, como demonstrado anteriormente por estudos com TWEAK/KO e superexpressão transgênica ^{134,152} onde a ativação da via TWEAK/Fn-14 induziu a expressão de inúmeras citocinas inflamatórias, aumentando a fibrose muscular e alterando os ciclos de regeneração/miogênese ¹⁵².

As mudanças na cognição de estímulos mecânicos e comportamentais são usadas como critérios em diagnósticos para avaliação de estágios e gravidade da doença e são componentes importantes no processo de estabelecimento de complicações diabéticas ⁷³. A ND, nesse tocante, sendo uma complicação importante em pacientes diabéticos ^{64,208,209}, na maioria das vezes, leva a anomalias na função sensório-motora e atrofia muscular.

A análise da pegada é uma avaliação comportamental que reflete principalmente o estado da função motora distal dos membros traseiros^{127,210,211}. O posicionamento da pata traseira ajuda a controlar o movimento gerado durante a caminhada e o ângulo da pata traseira foi usado como um índice específico para avaliar o estado do músculo dos

membros posteriores ¹²⁷. O aumento angular patas nos animais diabéticos sugeriu comprometimento do nervo motor nos membros traseiros e mostrou comprometimento notável na coordenação motora. A perda de força e comprometimento funcional muscular, independentemente da gravidade do diabetes, está intimamente relacionada à diminuição da amplitude de movimento e fraqueza muscular ³⁴.

Em adição, a perda de sensibilidade, verificada nos animais diabéticos, também é um dos principais fatores que contribuem para a diminuição do controle do motor e, portanto, para a perda de equilíbrio, afetando a marcha e a postura, causando passos mais curtos, menor aceleração e lentidão ^{34,212}. De acordo com esta observação, a perda de sensibilidade plantar e função motora muscular pode ser explicada pela deficiência de insulina e pelo aumento da taxa de glicemia ²¹³.

Estudos prévios indicaram que a hiperglicemia (além de afetar diretamente a função motora) causa desmielinização, atrofia axonal e morte neural no gânglio da raiz dorsal e que essas alterações irreversíveis estão associadas ao distúrbio sensorial (déficit na transmissão da informação nervosa pelas fibras sensoriais e perda da sensibilidade ao estímulo doloroso) ^{34,139,214-219}. Além disso, a disfunção sensório-motora subsequente pode levar à atrofia muscular e fraqueza dos músculos distais da perna e dos pés ^{214,220}, resultante da falta de comunicação bioquímica entre os componentes nervoso e muscular ²²¹ (como visto no presente estudo). Em 2006, Chonkar e colaboradores mostraram um atraso sináptico na placa motora com uma diminuição da contratilidade das fibras ao analisar a fisiologia de fibras musculares esqueléticas em diabetes induzido por STZ ^{72,222} que corroboram com outros achados em literatura ^{28,218,222,223}. Anos antes, em 2002, Xu e colaboradores ²²⁴ relataram que o aumento de glicose gera distúrbios hiperosmóticos que comprometem a homeostase celular e promove a ativação da via NFκB e transcrição de

citocinas pró-inflamatórias; contribuindo para as alterações de sensibilidade observada na ND^{14,225-229}.

No presente estudo, a expressão de IGF-1 não diferiu nos diabéticos como esperado. No entanto, a expressão de Atr-1, MuRF-1 e NFkB aumentaram nos animais do grupo DM (Fig. 14), indicando que esses fatores proteolíticos são modulados pela via NFkB na atrofia muscular diabética. Em adição, a expressão de MyoD diminui apesar das expressões de Mst e p38 MAPK não se diferirem nos animais diabéticos (Fig. 14). Curiosamente, a expressão de TWEAK não mudou no grupo DM enquanto que a expressão gênica de Fn-14 foi significativamente maior nestes animais; indicando que a atrofia esteja ocorrendo através da via Fn-14 independente.

Estudos anteriores relataram que a via IGF-1/Akt desempenha um papel crítico na ativação da síntese e degradação das proteínas musculares^{11,13} e pode inibir a proteólise muscular causada pelo sistema UB-proteassoma e, conseqüentemente, inibir a atrofia muscular⁴⁴. A atrofia no músculo diabético é acompanhada pela redução da ativação da via de sinalização IGF-1/Akt e pelo aumento da expressão de fatores ATP-dependente do sistema UB-proteassoma^{11,135}. Nessa via, como previamente mencionado, Atr-1 e MuRF-1 aumentam de maneira mais significativa do que outros componentes da via de degradação e contribuem maciçamente para a perda da massa muscular^{138,140,230}.

Em adição, pesquisas feitas nas últimas décadas mostraram também várias funções importantes para o NFkB na regulação da massa muscular esquelética^{11,127,140}, desempenhando um papel fundamental na modulação de respostas imunes e inflamatórias, proliferação e sobrevivência celular. Em culturas de tecido muscular, o NFkB influencia o crescimento miogênico e a diferenciação, regulando negativamente a expressão de MyoD¹¹ e induzindo a atrofia muscular em ratos¹⁰¹. No entanto, *in vivo*, a contribuição do NFkB para o desenvolvimento do músculo esquelético e regeneração é

pouco conhecida. Estudos mais recentes têm demonstrado que a ativação de NFkB é requerida para a ativação de MuRF-1^{14,101} e geração de atrofia muscular pela degradação de proteínas musculares. Evidências também mostraram que a via de sinalização de NFkB, IGF-1/PI3K/Akt e o sistema UB-proteassoma estão interrelacionados e que o fator de transcrição NFkB é ativado por citocinas inflamatórias, especialmente o fator de necrose tumoral α (TNF- α)^{9,101}. A via IGF-1/Akt, por sua vez, proporciona uma proteção ainda maior contra a atrofia muscular e pode inibir a via NFkB responsável pela atrofia²¹⁴.

Outrossim, estudos realizados por Dogra e colaboradores em 2007¹⁶ forneceram provas iniciais de que o sistema de sinalização TWEAK/Fn-14 poderia regular o programa miogênico pela modulação tanto da proliferação como diferenciação de mioblastos^{231,232}. No mesmo ano, Girgenrath e colaboradores²³³ mostraram que todas as células progenitoras da linhagem mesenquimal expressam o receptor Fn-14 e que a via TWEAK/Fn-14 promove a proliferação de mioblastos musculares primários, como células satélites e sua progênie mioblástica²³⁴ e inibe a miogênese terminal através da ativação de NFkB.

Estudos mais recentes demonstraram que a expressão de TWEAK no músculo esquelético não se altera⁹⁵, mas sim que a expressão de Fn-14 se regula positivamente em condições de lesão, regeneração ou inflamação crônica; apoiando seu papel na remodelação tecidual^{146,147}. Em adição, estudos prévios também demonstraram que na ausência de TWEAK, o receptor Fn-14 ativa a via de sinalização pró-miogênica¹⁴⁴ e, portanto, a ativação de Fn-14 não ocorre somente em resposta a presença de TWEAK²³⁸. Portanto, a alta expressão de Fn-14 resulta em auto-associações espontâneas, regulando propriedades celulares e vias de transdução como sobrevivência celular, migração e invasão²³⁵⁻²³⁷.

Uma vez ativada, a via TWEAK/Fn-14 permite a ativação de outra importante via: MAPK, onde o p38 MAPK é fortemente ativado *in vivo* pela exposição das células a estresses ambientais ou citocinas pró-inflamatórias e modula inúmeros fatores de transcrição e expressão de amplo espectro de genes ^{238,239}. Independentemente do estímulo, a ativação da via MAPK é suficiente para produzir metaloproteinasas ^{238,240} que são responsáveis pela formação de fibrose no músculo esquelético e pela perda da massa muscular esquelética *in vivo* ^{238,241}.

Li e colaboradores, em 2009 ²⁴⁰, através da utilização de abordagem *microarray* investigou o efeito do TWEAK sobre a expressão de MMP-2 e MMP-9 em ratos *knock out* para MMP-9 e em cultura celular de linhagens C2C12 e L6 mioblástica. Além da verificação do aumento drástico de MMP-9, também foi encontrado um aumento na expressão de NFκB e ativação da via MAPK. Em ratos nocauteados a perda da massa muscular e corporal, necrose de fibras, processo inflamatório e degradação da membrana basal foram atenuados. O bloqueio de p38 MAPK foi suficiente para reprimir a expressão de MMP-9 induzida por TWEAK. Em 2012, Chen e colaboradores ²⁴² sugeriram que o sistema de TWEAK / Fn-14 aumenta a proliferação celular e a síntese de colágeno através da ativação da via NFκB e aumento da atividade de MMP-9 na fibrose do miocárdio.

Assim, a persistente ativação e superexpressão de p38 MAPK devido ao processo inflamatório persistente no diabetes também induz estágios iniciais de diferenciação miogênica, levando a regulação positiva de marcadores miogênicos e acelerando a formação de miotubos ^{20, 144}. Isso porque, quando ativado o sistema TWEAK/Fn-14 acarreta em processos contínuos de remodelamento gerando falência do processo de reparo e afeta diretamente a regeneração, recuperação, crescimento e desenvolvimento do tecido muscular ^{144,242-244}. Para compensar a perda da massa muscular pela degradação proteica ocorre uma deposição apropriada de matrix extracelular (ECM) na tentativa de

reparar o tecido lesionado. Esse excesso de ECM leva a um acúmulo de tecido conjuntivo, gerando a fibrose^{144,245}.

No presente estudo, o tratamento com MSCs aumentou a sensibilidade e melhorou a marcha, sugerindo modificações na evolução da lesão. Alguns estudos anteriores realizados com ratos diabéticos tipo 2 mostraram que as MSCs promoviam a redução dos níveis de glicose no sangue^{30,178,246-250} e, conseqüentemente, isso poderia contribuir para uma melhora progressiva e duradoura da sensibilidade térmica e mecânica da neuropatia diabética, além de normalizar o desempenho motor de ratos diabéticos²⁵⁰.

Curiosamente, no presente estudo a melhora sensório-motora muscular ocorreu apesar da ausência da melhora da glicemia de jejum (Fig. 12 e Fig. 11B). Esses dados são consistentes com estudos anteriores que demonstraram melhora da função neural sem normalização da glicemia após o transplante subcutâneo de células mononucleares e mesenquimais derivadas da medula óssea em ratos estreptonizados^{28,29}.

O papel das MSCs sobre a melhora da função sensório-motora no músculo esquelético diabético ainda não está completamente claro^{137,251,252}. Já a melhora no perfil glicêmico, aparentemente, deve estar diretamente relacionada ao tipo de diabetes estudado uma vez que a indução por STZ lesiona as células β pancreáticas e promove um diabetes mais severo quando comparado com o diabetes tipo 2 gerado a partir de dieta hipercalórica^{247,250,253} em modelos experimentais. Além disso a melhora dos níveis glicêmicos sanguíneos também parece estar associada ao tempo experimental: experimentos de curta duração apresentaram uma melhora no quadro glicêmico dos animais analisados quando comparados com ratos diabéticos em experimentos de longa duração (Tabela 3).

Essa hipótese também foi levantada por Si e colaboradores em 2012²⁴⁷ que observaram um aumento do recrutamento de MSCs nos tecidos danificados com STZ

(fígado e pâncreas) e reparo tecidual correspondente, incluindo a reconstrução significativa de ilhotas pancreáticas quando as MSCs foram infundidas durante a fase de lesão precoce (dia 7), mas não durante a fase tardia (dia 21). Assim, o reparo tecidual notável e as possíveis propriedades citoprotetoras da infusão de MSCs devem contribuir para a melhora da hiperglicemia na fase inicial do *DM* (fase aguda), mas não na fase tardia (fase tardia).

No presente estudo, apesar de ser notado uma redução na hiperglicemia após a segunda infusão de MSCs, esta não foi significativa quando comparada com o grupo diabético. Essa ausência de melhora no quadro glicêmico pode ser devido a infusão de MSCs na fase tardia do *DM*.

A ausência de alteração também foi verificada na morfologia muscular: a área das fibras musculares não se alterou, mas o número de núcleos centralizados e densidade de tecido conjuntivo diminuíram após o transplante (Fig.13). Curiosamente o número de fibras aumentou proporcionalmente a diminuição da quantidade de tecido conjuntivo após o transplante, amenizando a perda de fibras musculares decorrentes do processo cíclico de regeneração/degeneração (Anexo 3). Em adição, após o transplante, a expressão de Fn-14 e p38 MAPK aumentaram e a expressão de NFkB foi semelhante ao valor encontrado nos animais diabéticos. Intrigantemente, a expressão gênica de Atr-1 e MuRF-1 reduziram apesar de não ser verificado restabelecimento da massa muscular (Fig. 14 e Fig. 15; Fig.13).

Estudos anteriores demonstraram que a ativação da díade TWEAK/Fn-14, NFkB e MAPKs levam à perda da massa muscular esquelética pelo aumento da atividade de Atr-1 e MuRF-1¹⁴⁵. No entanto, diferentes e complexos cenários interagem uns com os outros no presente estudo: perda muscular associada ao diabetes e mecanismos de ação das MSCs ainda não desvendados. A maioria dos dados relativos à redução de massa

muscular vem de diferentes modelos, como a desnervação ou sobrecarga ¹⁴⁵. No modelo de diabetes induzidos por STZ utilizado no presente estudo, todavia, há também a insuficiência de insulina que pode contribuir para a atrofia muscular. Assim sendo, a interação entre as diferentes vias envolvidas na remodelação muscular está longe de ser desvendada ⁸.

De mais a mais, é sabido que a adaptação nas miofibras está diretamente relacionada com componentes musculares como: a matriz extracelular, as células satélites e o tecido conjuntivo. Uma vez lesionado, o tecido muscular passa por um processo de regeneração através da destruição do tecido necrosado, reparo e remodelação de sua estrutura. Na ocorrência de alterações no processo de reparo desses danos pode haver perda de massa muscular e deficiência locomotora como ocorrente no diabetes. Nesse tocante, a extensão e o sucesso da regeneração variam de acordo com a natureza do dano e envolve processos de revascularização, infiltração celular, fagocitose de tecido muscular necrosado, proliferação de células satélites musculares intrínsecas e posterior fusão para o interior das miofibras multinucleadas e re-inervação ^{254,255}, independentemente da situação. Essa plasticidade muscular permite que o músculo se regenere e, conseqüentemente, a função primordial do tecido muscular, de produzir movimento, pode ser completa ou parcialmente restabelecida; evitando ou amenizando o estabelecimento de deficiências ou incapacidades aos indivíduos ²⁵⁶⁻²⁵⁸.

Assim, uma teoria proposta é de que a influência das MSCs no local da lesão esteja associada a vários fatores que são produzidos pelo tecido danificado (sobretudo fatores produzidos pela ECM presente no músculo danificado)²⁵⁹⁻²⁶¹. Nesse sentido, as MSCs secretariam componentes (Secretoma) que possuem funções reguladoras e agem de forma autócrina e/ou parácrina ²⁶¹ e interagem diretamente causando sinalização intracelular ou indiretamente ativando a produção e liberação de moléculas por outros tipos de células-

alvo ²⁶². Esses fatores, incluindo fatores neurotróficos e angiogênicos ^{134,135}, bem como fatores de crescimento e citocinas podem inibir a apoptose e a degeneração e reduzir a fibrose, enquanto estimula a angiogênese e a mitose de células-tronco específicas do tecido intrínseco, promovendo processos de reparação e regeneração do músculo esquelético ^{136,137}.

No presente estudo, as MSCs poderiam influenciar positivamente o músculo lesionado através do seu efeito trófico ²⁶¹, reduzindo a fibrose (restruturação muscular) e aumentando o número de fibras em detrimento da hipertrofia muscular (ganho proteico para fibras pré-existentes); explicando a melhora motora e sensorial visível nos ratos diabéticos tratados (BM-MS). Um estudo que corrobora com a presente hipótese foi realizado por Natsu e colaboradores em 2004 ²⁶² descreveu que MSCs transplantadas em músculo TA dilacerados de ratos Sprague-Dawley promoveram a maturação das fibras no TA e recuperação motora muscular (força muscular) através de mecanismos indiretos (efeito parácrino); sugerindo um efeito das MSCs sobre as células satélites intrínsecas musculares.

A diminuição do tecido conjuntivo e o aumento do número de fibras celulares em animais do grupo BM-MS podem estar associados aos efeitos anti-inflamatórios das MSCs que afetam outras vias além do NFkB e TWEAK/Fn-14. Já a redução dos níveis gênicos de Atr-1 e MuRF-1 permite inferir que as MSCs poderiam também estar atuando em outras vias ou mobilizar outros fatores que interferem na via UB-proteassoma ou em vias correlacionadas com regeneração muscular, como Wnt e Akt ou a via de sinalização da insulina.

Nesse tocante, estudos realizados por Si e colaboradores em 2012 ²⁴⁷ demonstraram uma melhora a sensibilidade à insulina em diabéticos tipo 2 bem como um aumento da expressão de GLUT-4, IRS-1 e Akt em músculo esquelético, fígado, pâncreas

e tecido adiposo quando ratos diabéticos tipo 2 foram infundidos com MSCs via intravenosa. Bueno e colaboradores em 2015³⁰ também comprovaram melhora a sensibilidade à insulina em ratos diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica e tratados com MSCs intraperitonealmente. A ação das MSCs na sensibilidade à insulina, nesses estudos, provavelmente está associada ao seu papel imunomodulador^{30,247,250,263}. Nenhum achado do tipo foi analisado em modelos com *DM* tipo 1.

Infelizmente, uma das limitações deste estudo é a falta de informações sobre a expressão proteica de IGF-1, NFκB, Mst, TWEAK, Fn-14, MyoD e p38 MAPK no músculo TA e da verificação desses e demais fatores tanto a nível gênico como proteico em outros músculos, como sóleo, gastrocnêmio, EDL e femoral. Conforme observado por Bodine e Baehr em 2014¹⁰⁰, embora se conheça muito sobre o período de tempo de expressão de MuRF-1 e Atr-1 em diferentes condições da atrofia muscular, pouco se sabe sobre a cinética de tradução proteica. Além disso, o autor aponta a ausência de especificidade dos anticorpos disponíveis utilizados para ensaios de quantificação proteica.

O *DM*, por se tratar de um grupo de doenças metabólicas crônicas, altera não somente os níveis de glicose sanguínea como também é gerador de inúmeras complicações intimamente relacionadas com processos inflamatórios; sobretudo quando não tratado. Assim, uma vez que todo o organismo possui focos inflamatórios ativos em maior ou menor grau, os efeitos da MSCs podem variar em cada tecido de modo que migrariam para locais com maior prioridade. Diante desse panorama, talvez, o tecido muscular não seja um dos principais tecidos de resposta no estudo em questão; mas sim que as MSCs poderiam agir primeiramente no tecido neuronal e isso geraria, por exemplo, a melhora sensório-motora em animais transplantados em detrimento da melhora da atrofia propriamente dita.

Em adição, a infusão intraperitoneal corrobora com a difusão das MSCs por todo organismo. Isso porque o meio de administração das MSCs também pode influenciar o caminho que essas células percorrem até atingir o órgão-alvo; podendo ser estas: intravenosa, intraperitoneal ou *in loco*. As vias intraperitoneal e intravenosa, certamente, são as menos invasivas, porém a administração *in loco* proporciona melhores índices de fixação em certos modelos, como modelos de lesão cutânea e infarto do miocárdio. Todavia, em literatura existem relatos do insucesso do efeito das MSCs quando administradas localmente por produzir efeitos indesejáveis, como aumento de riscos e efeitos colaterais, hemorragia, lesões teciduais e tumores²⁶⁴⁻²⁶⁶. Já a via intravenosa tem sido utilizada como primeira opção na administração de células-tronco em grande parte de estudos pré-clínicos e clínicos. No entanto, não se sabe ao certo qual o percentual de células que alcança a área da lesão neste tipo de abordagem sistêmica^{264,267}. Fischer e colaboradores em 2009²⁶⁷ demonstraram que terapia sistêmica de células-tronco injetada de modo intravenoso não produz o número suficiente de células para atingir o órgão de interesse, pois a maioria das células injetadas migram em direção a órgãos que atuam como filtros, como pulmões, fígado e baço^{264,267} devido ao seu tamanho (cerca de 20 µm) em um período de 48h²⁶⁷.

A administração intraperitoneal possui problemas parecidos. Mesmo assim, tanto a administração intravenosa quando a intraperitoneal de MSCs são eficazes devido à sua capacidade de migrar para os tecidos lesionados em resposta aos gradientes quimiotáticos²⁶⁸. No presente estudo optou-se pela infusão de MSCs via intraperitoneal pela facilidade de administração no modelo experimental analisado²⁶⁶.

Não somente o momento da injeção de células e o sítio da injeção devem ser ressaltados em resultados experimentais e clínicos, como também o número de células injetadas. Chen e colaboradores em 2004²⁶⁹ demonstraram que um grande número de

MSCs injetadas imediatamente após o infarto agudo do miocárdio resulta em melhores índices de fixação quando comparadas com a injeção no 14º dia, sugerindo que essas células agem especificamente em resposta à isquemia^{270,271}.

Mesmo assim, embora se espere que o maior número de células infundidas resulte em melhores taxas de fixação e, por conseguinte, melhores implicações, existe um limite após o qual a quantidade de MSCs administradas não acarreta em qualquer benefício. Nesse tocante, Omori e colaboradores em 2008²⁷² tentaram aperfeiçoar a administração das MSCs em termos de número e tempo de infusão utilizando um modelo de isquemia cerebral em ratos. Nesse estudo os pesquisadores verificaram que doses de 1×10^6 células mostraram significativa melhora dos resultados em relação ao aumento desse número para 3×10^6 células que não demonstrou qualquer melhoria. Portanto, concluíram que o maior número de células e infusão precoce, se administrado logo após o insulto isquêmico, resultam em maiores índices de fixação, porém não detectaram qualquer benefício em termos de resultados finais²⁷¹.

Assim, apesar de todas as possíveis vantagens das MSCs, algumas dúvidas e desafios permanecem no caminho para seu futuro uso na terapia celular. Uma vez que as alterações fisiopatológicas durante a fase tardia do modelo de rato induzido por STZ são mais parecidas com o *DM* em seres humanos em comparação com aquelas durante a fase inicial, esperava-se que os efeitos observados da infusão de MSCs na fase tardia proporcionassem uma visão mais útil sobre a situação clínica. Nesse tocante, mais estudos devem ser realizados para compreendermos o real papel das MSCs frente a ND e a atrofia muscular; sobretudo de cunho molecular e, posteriormente, clínico.

Esse trabalho reforça a necessidade e a importância de novas investigações sobre o tema ao passo que aponta uma alternativa de grande potencial para o tratamento das complicações que afetam os músculos e nervos periféricos dos diabéticos.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram a melhora da sensibilidade e da função motora e a modulação de Atr-1, MuRF-1, Fn-14 e p38 MAPK no músculo esquelético através do transplante de MSCs em ratos diabéticos. O transplante de MSCs influenciou positivamente a recuperação dos danos musculares induzidos pelo diabetes, indicando ser uma fonte promissora para o desenvolvimento de terapias celulares para a atrofia do músculo esquelético no diabetes. Os fatores liberados pelas MSCs ou modulados por elas podem promover a resposta aos danos, coordenando as ações que são essenciais para a remodelação do músculo esquelético.

REFERÊNCIAS

1. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 1997. 20(7):1183-1197.
2. Cruz NG, et al. The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. *Diab. Reserc. Clin. Prac.* 2013; (99):85-92.
3. Zozulinska D, Wierusz-Wysocka B. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. *Diab. Reserc. Clin. Prac*, 2006. (74):S12-S16.
4. IDF. [Online].2016. Available from: <http://www.idf.org/>.
5. Group The Diabetes Control and Complications Trial Research. The effects of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl. J. Med*, 1993. 329: p. 977-986.
6. Pirart J. Glycemic control and prevention of complications. *Miner. Endocrinol*, 1984. (9):55-58.
7. Cotter M, Cameron NE, Lean DR, Robertson S. Effects of long-term streptozotocin diabetes on the contractile and histochemical properties of rat muscles. *Q. J. Exp. Physio*, 1989. (74): 65-74. PMID:2524084.
8. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle Atrophy. *Disease Models and Mechan*, 2013. (6):25-39. doi:10.1242/dmm.010389.
9. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med. Hypoth*, 2007. (69):310-321.
10. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the Ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, 1999. (129):227S-237S.
11. Frost RA, Nystrom GJ, Jefferson LS, Lang CH. Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endoc. Metab*, 2007. (292):501-512. doi: 10.1152/ajpendo.00359.2006.
12. Sachech JM, Ohtsuka A, McLary SC, Goldberg AL. IGF-1 stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF-1. *Am J Physiol. Endocrinol. Metab*, 2004. (287):E591-E601.
13. Stitt TN, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced Ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell*, 2004. (14):395-403.PMID:15125842.
14. Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J. Mol. Med*, 2008. (86):1113-1126.
15. Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cyt.Gr.F. Rev*, 2003. 14(3-4):241-249. PubMed: 12787562.
16. Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin X, Wergedal JE, Kumar A. TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J*, 2007. (21):1857-1869. doi:10.1096/fj.06-7537com.
17. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Bioch. et BiophysS. Acta*, 2007. (1773):1358-1375.
18. Jones NC, et al. The p38 α/β MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J. Cell Biol*, 2005. (169):105-116.

19. Tobin JF, Celeste AJ. Myostatin, a negative regulator of muscle mass: implications for muscle degenerative diseases. *Curr. Opin. Pharmacol*, 2005. (5):328-332.
20. Whittemore LA, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biol. Biophys. Res. Comm*, 2003. (300):965-971. PMID:12559968.
21. Walsh FS e Celeste AJ. Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem. Soc. Transac*, 2005. (33): p.1513-1517.
22. Kirsten VR, Sesterheim P, Saitovith D. Animal models for type 1 diabetes studies. *Med*, 2010. 43(1): 3-10.
23. Islam S, Koya S, Portha B. Animal Models of Diabetes and Its Associated Complications. *J. Diab. Res.* 2013; 29p.
24. Del-Carlo RJ, Monteiro BS, Argollo Neto NM. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. *Ceres*, 2009. 59(4): 446-450.
25. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev. Bras. Hematol. Hemater*, 2009. 31(1): 25-35.
26. Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann. Ny. Acad. Sci*, 2005. (1044):132-138.
27. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens*, 2006. p 1-9.
28. Shibata T, et al. Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Diabetic Polyneuropathy in Rats. *Diabetes*, 2008. (57):3099-3107. doi 10.2337/db08-0031.
29. Naruse K, et al. Transplantation of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Improves Mechanical Hyperalgesia, Cold Allodynia and Nerve Function in Diabetic Neuropathy. *PLOS ONE*, 2011. 6(11):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0027458
30. Bueno PG, et al. Metabolic and Pancreatic Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Mice Fed High-Fat Diet. *PLoS ONE* 10, 2015. (4): e0124369. doi:10.1371/journal.pone.0124369.
31. Voltarelli JC, et al. Terapia celular no diabetes mellitus. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter. Brasil: Ribeirão preto*, 2009. vol. 31, supl. 1, p. 149-156.
32. Silva MHM, et al. Avaliação morfológica dos hepatócitos de ratos diabéticos tratados com Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) e estreptozotocina 6 CH. s.l.: *Acta. Veter. Brasil*, 2011. v.5, n. 3, p. 270-277.
33. Who report. Burden: mortality, morbidity, and risk factors – WHO report. s.l.: *Global Status Report on NCDs*, 2010.
34. Sacco ICN, Sartor CD, Gomes AA, João SMA, Cronfli R. Avaliação das perdas sensorio-motoras do pé e tornozelo decorrentes da Neuropatia Diabética. *Rev. bras. Fisioter*, 2007. 11(1): 27-33.
35. Lojudice FH e Sogayar MC. Células-tronco no tratamento e cura do diabetes mellitus. *Brazil: Cien. e Saúde Col*, 2008. vol. 13, n. 1, p. 15-22.
36. Li N e Ikehara S. Bone Marrow Stem Cell as a Potential Treatment for Diabetes. *Japan: Hindawi*, 2013. 5p.
37. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
38. Koro CE, et al. Glycemic control from 1988 to 2000 among U.S. adults diagnosed with type 2 diabetes: a preliminary report. s.l.: *Diabetes Care*, 2004. vol. 27, n. 1, p. 17-20.
39. Yaochite JNU. Caracterização das populações de células T reguladoras e células T produtoras de IL-17 durante o desenvolvimento do diabetes induzido por

estreptozotocina e avaliação do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais nesse modelo experimental. Ribeirão Preto, USP, 2010. [tese de mestrado].

40. Dotta F, et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. USA.: Proc Natl Acad Sci USA, 2007. n.104, p. 5115-5120.

41. Klinke DJ. Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus. s.l.: PLoS ONE, 2008. n.3, e. 1374.

42. Balda CA e Pacheco-Silva A. Aspectos imunológicos do Diabetes melito tipo 1. São Paulo: Rev Ass Med Brasil, 1999. vol. 45, n. 2, p. 175-180.

43. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. S.l.: Diabetes Care, 2008. Vol.31, s.1, p. S55-60.

44. Bhansali A, et al. Efficacy of Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cell Transplantation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. India: Stem Cells and Devel, 2009. vol. 18, n.10, p. 1407-1415.

45. Mmatthaei S, et al. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. s.l.: Endocr. Rev, 2000. vol. 21, n. 6, p. 585-618.

46. Pprethi M e Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. s.l.: J. Clin. Invest, 2006. vol. 116, n. 7, p. 1802-1812.

47. Muoio DM e Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanism of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. s.l.: Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 2008. vol. 9, n.3, p. 193-205.

48. Donath MY, et al. Islet inflammation in type 2 diabetes. s.l.: Diabetes Care, 2008. vol. 31, s. 2, p. S162-164.

49. Almind K, Doria A e Khan CR. Putting the genes for type II diabetes on the map. s.l.: Nat. Med, 2001. vol. 7, n. 3, p. 277-279.

50. Cnop M, et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes. s.l.: Diabetes, 2008. vol, 54, s.2, p. S97-107.

51. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effects of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. s.l.: N Engl. J. Med, 1993. vol. 329, p. 977-986.

52. Luca C e Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. EUA: FEBS, 2008. n. 582, p. 97-105.

53. Ford ES, et al. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Study. s.l.: JAMA, 2002. n. 287, p. 356-359.

54. Weiss R, et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. s.l.: N. Engl. J. Med, 2004. n.350, p. 2362-2374.

55. Mather KJ, et al. Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. Ssl.; Diab, 2008. n.57, p. 980-986.

56. Vlassara H. Recent progress in advanced glycation and products and diabetic complications. s.l.: Diab, 1997. P. S19-S25.

57. Khovidhunkit W, et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. s.l.: J. Lipid Res, 2004. n.34, p. 1169-1196.

58. Petersen KF e Shulman GL. Etiology of insulin resistance. s.l.: Amer J Med, 2006. n.119, p. S10-S16.

59. Goldfine A, et al. Protein biomarkers in fasting serum samples correlate with diabetes risk factors. s.l.; Diab, 2008. n.57, p. A410.

60. Pasnorr M, et al. Diabetic Neuropathy part 1: overview and Symmetric Phenotypes. *EUA: Neurol Clin*, 2013. n. 31, p. 425-445.
61. Vinik AI, et al. Diabetic Neuropathy. *EUA: Endocrinol. Metab. Clin N. Am*, 2013. n.42, p. 747-787.
62. Vinik AI, et al. Epidemiology of the complications of diabetes. In: LESLIE, R.D. et al. *Diabetes: clinical science in practice*. Reino Unido: Cambridge Univer. Press, 1995. P. 221-287.
63. Jack MM, Ryals JM e Wright DE. Protection from diabetes-induced peripheral sensory neuropathy: A role for elevated glyoxalase I? *s.l.: Exp. Neur*, 2012. n.234, p. 62-69.
64. Zochodne DW, Ramji N, Toth C. Neuronal Targeting in Diabetes Mellitus: A story of sensory neurons and motor neurons. *The Neuroscien*, 2008. 14:(4): 311-318.
65. Boulton AJM, et al. The natural history of painful diabetic neuropathy: a 4 years study. *s.l.: Posgrad. Med. J*, 1983. n.59, p. 556-559.
66. Shaw JE e Zimmet PZ. The epidemiology of diabetic neuropathy. *s.l.: Diab. Rev*, 1999. n. 7, p. 245-252.
67. Hussain G, et al. Cross sectional study to evaluated the effect of duration of type 2 diabetes mellitus on the nerve conduction velocity in diabetic peripheral neuropathy. *s.l.: Clin. Res. Rev*, 2014. n.8, p. 48-52.
68. Gagliardi ART. Neuropatia diabética periférica. *Brasil: J. Vasc. Br*, 2003. vol. 2, n.1, p. 67-74.
69. Vinik A, et al. Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options. *s.l.: Nat. Clin. Prac. Endocrinol Metab*, 2006. n.2, p. 269-381.
70. Sanchez OA, et al. Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. *s.l.: J Appl Physiol*, 2005.n. 99, p. 472-478.
71. Serrano AL e Munoz-Canoves P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *s.l.: Exp. CellRes*, 2010. n. 316, p. 3050-3058.
72. Chonkar A, et al. Contraction and Cation Contents of Skeletal Soleus and EDL Muscles in Age-Matched Control and Diabetic Rats. *Nova Iorque: N Y Acad Sci*, 2006. n. 1084, p. 442-451.
73. Andersen H, Gadeberg PC e Jakobsen J. Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. *s.l.: Diabetol*. 1997. n. 40, p. 1062-1069.
74. Pette D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. *s.l.:Can J Appl Physiol*, 2002. n. 27, p. 423-448.
75. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *s.l.: Physiol*, 2008. n. 23, p. 160-170.
76. Armstrong RB, Goldnick PD e Ianuzzo CD. Histochemical properties of skeletal muscle fibres in streptozotocin-diabetic rats. *s.l.: Cell Tis Res* 1975. n. 162, p. 387-394.
77. Baldwin KM e Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *s.l.: J Appl Physiol*, 2001. n. 1, p. 345-357.
78. Cassano M, et al. Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. *s.l.: J. Muscle Res. CellMotil*, 2009. n. 30, p. 243-253.
79. Pepato MT, et al. Role of different proteolytic pathways in degradation of muscle protein from streptozotocin diabetic rats. *s.l.: Am. Physol Soc*, 1996. E340-47.
80. Manchester KL. The control by insulin of amino acid accumulation in muscle. *s.l.: Biochem J*, 1970. n. 117, p. 457-465.

81. Higaki Y, et al. Nitric Oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *s.l.: Diab*, 2001. n. 50, p. 241-257.
82. Hickey M.S, et al. The insulin action-fiber type relationship in humans is muscle group specific. *s.l.: Am Physiol Soc*, 1995. E150- 154.
83. Glass DJ. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med*, 2003. 9: p. 344-350.
84. Bodine SC, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001. (294): 1704-1708.
85. Musarò A, et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet*, 2001. (27):195-200.
86. Schulze PC, et al. Transgenic overexpression of locally acting insulinlike growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic leftventricular dysfunction. *Circ. Res*, 2005. 97, 418-426.
87. Song YH, et al. Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J. Clin Invest*, 2005. 115, 451-458.
88. Lai KM, et al. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol*, 2004. 24, 9295-9304.
89. Mammucari C, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*, 2007. (6): 458-471.
90. Izumiya Y, et al. Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab*, 2008. (7): 159-172.
91. McPherron AC, Lawler AM e Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 1997. (387): 83-90.
92. Grobet L, et al. Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis*, 2003. (35): 227-238.
93. Reisz-Porszasz S, et al. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. (285): E876-E888.
94. Lee S J. and McPherron, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 2001. (98): 9306-9311.
95. Mittal A, et al. The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J Cell Biol*, 2010. 1888(6):833-849. doi:10.1083/jcb.200909117.
96. Hunter R B e Kandarian SC. Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *J Clin Invest.*, 2004. (114): 1504-1511.
97. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Inter J Biochem Cell Biol*, 2005. (37):1974-1984
98. Sackey JM, et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB*, 2007. (21):140-155.
99. Cao PR, Kim HJ, Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int. J. Biochem Cell Biol*, 2005. (37): 2088-2097.
100. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014. (307): E469-E484. doi:10.1152/ajpendo.00204.2014.
101. Schakman O, et al. Role of IGF-I and the TNF/NF- κ B pathway in the induction of muscle atrogenes by acute inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. (303): E729-E739. doi:10.1152/ajpendo.00060.2012.

102. Tamir Y, Bengal E. Phosphoinositide 3-Kinase Induces the Transcriptional Activity of MEF2 Proteins during Muscle Differentiation. *J Biol Chem*, 2000. 275(44): 34424–34432.
103. Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. The IGF-I Signaling Pathway. *Current Pharmaceutical Design*, 2007. (13): 663-669.
104. Jung HJ, Suh Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs . *Frontiers in Genetics* , 2015. 5(472): 1-14.
105. Musaro A, Rosenthal N. Duration of the Myogenic Program Is Induced by Postmitotic Expression of Insulin-Like Growth Factor I. *Mol Cell Biol*, 1999. (19): 3115–3124.
106. Coolican SA, et al. The Mitogenic and Myogenic Actions of Insulin-like Growth Factors Utilize Distinct Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.*1997. 272, 6653–6662
107. Kaliman P, Vinals F, Testar X, Palacin M, Zorzano A. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors block differentiation of skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 1996. (271): 19146–19151.
108. Jones JJ e Clemmons DR. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. *Endocr Societ*, 1995. 16(1): 3-34.
109. Bodine SC. Signaling and the Molecular Adaptation to Resistance Exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 2006. 38(11):1950-1957.
110. Skolnik EY, et al. The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J*, 1993. 12 (192): 1929-1936.
111. Avruch J, et al. Ras ativação da quinase Raf: recrutamento tirosina quinase da cascata MAP quinase . *Progressos recentes na pesquisa hormonal*, 2001. 56 (1): 127-155. PMID 11237210 .
112. Williamson D, et al. Mitogen- activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J Physiol Soc*, 2003. 547(3): 977-987.
113. Sandri M, et al. Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell*, 2004. 117(3): 399–412.
114. Sharma M, et al. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*, 1999. 180:1–9.
115. Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musced Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*, 1997. 7(9), 910-916.
116. Egerman MA. e Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014. 49(1): 59–68.
117. Hill, J.J., et al. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem*, 2002. (277): 40735–40741.
118. Morissette MR, et al. Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. *Circ Res*, 2006. (99): 15-24.
119. McFarlane C, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1- dependent mechanism. *J Cell Physiol*, 2006. (209): 501-514.
120. Allen DL. and Unterman, T. G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. (292): C188-C199.
121. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003. (113): 685–700.

122. Langley B, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by downregulating MyoD expression. *J Biol Chem*, 2002. (277): 49831–49840.
123. Huang Z. Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells. *Cell Signal*, 2007. 19:2286–2295.
124. Philip B, Lu Z, Gao Y. Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cell Signal*, 2005. (17): 365–375.
125. Joulia D, et al. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res*, 2006. (286): 263–275.
126. Thomas M, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 2000. (275):40235–40243.
127. Zhang MDR, et al. A novel transgenic mouse model of Chinese Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Neural Regen Res*, 2015. 9(4):413–419. doi: 10.4103/1673-5374.128248. PMID: PMC4146190.
128. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*, 2006. 33(2):155-165.
129. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, 2004.(18):2195–2224. [PubMed:15371334]
130. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 2008. (132):344–362. PubMed: 18267068].
131. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med*, 2004. (82):434–448. [PubMed: 15175863]
132. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2003. (3):745–756. [PubMed: 12949498]
133. Bakkar N, Wang J, Ladner KJ, Wang H, Dahlman JM, Carathers M, Acharyya S, Rudnicki MA, Hollenbach AD, Guttridge DC. IKK/NF-kappaB regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis. *J Cell Biol*, 2008. (180):787–802. [PubMed: 18299349].
134. Pan HC, Cheng F, Chen CJ. Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci*, 2007. 14(11):1089–1098.
135. Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira RS. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Research Bulletin*, 2015. (112): 14–24.
136. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009. 217(2):318–24.
137. Caseiro AR, Pereira T, Bartolo B, Domingos J, Luis AL, Mauricio AC. Chapter-trends in mesenchymal stem cells applications for skeletal muscle repair and regeneration. *Progr. Stem Cell Transplan*. 2015.
138. Jirkovská A, Boucek P, Wosková V, Bartos V, Skibová J. Identification of patients at risk for diabetic foot: a comparison of standardized noninvasive testing with routine practice at community diabetes clinics. *J Diabetes Compl*, 2000. (15):63-8.
139. Brussee V, Cunningham A, Zochodne DW. Direct Insulin Signaling of Neurons Reverses Diabetic Neuropathy. *Diab*, 2004. (53): 1824-1830.
140. King RHM. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2001. (54):400–408.
141. Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 2005. 16:585–595. [PubMed: 16099183]

142. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*, 2000. (289):2363–2366. [PubMed: 11009425]
143. Sitcheran R, Cogswell PC, Baldwin AS Jr. NF-kappaB mediates inhibition of mesenchymal cell differentiation through a posttranscriptional gene silencing mechanism. *Genes Dev*, 2003. (17):2368–2373. [PubMed: 14522944].
144. Tajrishi MM, Zheng TS, Burkly LC, Kumar A. The TWEAK-Fn14 pathway: A potent regulator of skeletal muscle biology in health and disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2010. (25): 215–222.
145. Bhatnagar S e Kumar A. The TWEAK-Fn14 System: Breaking the Silence of Cytokine-Induced Skeletal Muscle Wasting. *Curr Molec Medic*, 2012. (12): 3-13.
146. Tanabe K, Bonilla I, Winkles JA, Strittmatter S.M. Fibroblast growth factor-inducible-14 is induced in axotomized neurons and promotes neurite outgrowth. *J Neurosci*, 2003. (23): 9675-9686. PubMed: 14573547.
147. Winkles JA. The TWEAK–Fn14 cytokine–receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. 7(5): 411-425.
148. Zheng TS, Burkly LC. No end in site: TWEAK/Fn14 activation and autoimmunity associated- end-organ pathologies. *J Leukoc Biol*, 2008. (84): 338-347.
149. Choi MC, et al. A direct HDAC4-MAP kinase crosstalk activates muscle atrophy program. *Mol Cell*, 2012. (47):122–132.
150. Enwere EK, et al. Role of the TWEAK-Fn14-cIAP1-NF-kB signaling axis in the regulation of myogenesis and muscle homeostasis . *Frontiers Immun*, 2014. 5(14): 1-13.
151. Yadava RS, et al. TWEAK/Fn14, a pathway and novel therapeutic target in myotonic dystrophy. *H Mol Gen*, 2015. 24(7):2035–2048.
152. Mittal A, et al. Genetic ablation of TWEAK augments regeneration and post-injury growth of skeletal muscle in mice. *Am J Pathol*, 2010. (177): 1732–1742.
153. Slam S, Koya S, Portha B. Animal Models of Diabetes and Its Associated Complications 2013. *J Diab Res*, 2013. 29p.
154. Lanza RP, Chick WL. Transplantation of pancreatic islets. s.l.: *Ann. NY Acad Sci*, 1997. (831): 323-331.
155. Redondo M.J, Eisenbarth GS. Genetic Control of autoimmunity in Type 1 diabetes and associated disorders. s.l.: *Diabetol*, 2002.45 (5):605-622.
156. Bode BW, et al. Glycemic characteristics in continuously monitored patients with type 1 and type 2 diabetes: normative values. s.l.: *Diabetes Care*, 2005. (28):2361-2366.
157. Demeterco C, Levine F. *Terapia Gênica para o Diabetes*. Brasil: *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2001. 45(1):96-107.
158. Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. s.l.: *Surgery*, 1972. (2):175-186.
159. Warnock GL, et al. Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. s.l.: *Diabetol*, 1992. 35(1):89-95.
160. Hussain MA, Theise ND. Stem-cell therapy for diabetes mellitus. s.l.: *Lancet*, 2004. 364 (9429): 203-205.
161. El-Badri N, Ghonein MA. *Mesenchymal Stem Cell Therapy in Diabetes Mellitus: Progress and Challenges*. Egito: *Hindawi*, 2013. 7 p.
162. Voltarelli JC, et al. Autologous nonmyeloblastic hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. s.l.: *JAMA*, 2007. 297(14):1568-1576.

163. Soria B, et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *s.l.: Diabetes*, 2000. 49(2):157-162.
164. Ende N, Chen R, Reddi AS. Transplantation of human umbilical cord blood cells provides glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetes mice. *s.l.: Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2004. 321(1):168-171.
165. Abraham NG, et al. Bone marrow cell transplant into intra-bone cavity prevents type 2 diabetes: a role of heme oxygenase-adiponectin. *s.l.; J Autoimm.*, 2008. 30(3):128-135.
166. Guo T, Hebrok M. Stem cells to pancreatic beta-cells: new sources for diabetes cell therapy. *s.l.: Endo Rev*, 2009. 30(3): 214-227.
167. Maehr R, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *s.l.: Proc Nat Acad Sci*, 2009.
168. Zhang YH, et al. Insulin-producing cells derived from rat bone marrow and their autologous transplantation in the duodenal wall for treating diabetes. *s.l.: Anat Rec*, 2009.292(5):727-735.
169. Yu S, et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *China: Chin Med J*, 2007. 120(9): 771-776.
170. Sapir T, et al. Cell-replacement therapy for diabetes: generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *s.l.: Proc Nat Acad Sci USA*, 2005. 102(22): 7964-7969.
171. Covas DT. Células tronco mesenquimais. In. ZAGO, M.A. e COVAS, D.T. Células-tronco: A nova fronteira da medicina. Brasil: Ed. Atheneu, 2006.
172. Pittenger MF, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999. (284):143-147. PMID:10102814.
173. Amorin B, et al. Mesenchymal Stem Cells – Characterization, Cultivation, immunological properties and Clinical application. *HCPA*, 2012.32(1):71-81.
174. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Rev Immunol*, 2008. (8): 726–736. doi:10.1038/nri2395.
175. Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytherapy*, 2009.11(4):377-91.
176. Lee R H, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *EUA: Proc Natl Acad Sci*, 2006. 103(46):17438-17443.
177. Karnieli O, et al. Generation of Insulin-Producing Cells from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Genetic Manipulation. *s.l.: Stem Cells*, 2007. (25): 2837-2844.
178. Ezquer FE, et al. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *s.l.: Biol BI Mar Transplan*, 2008. (14):631-640.
179. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *s.l.: Ann N Y Acad Sci*, 2009. (1176):101-117.
180. Urban VS, et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *s.l.: Stem Cells*, 2008. 26(1):244-253.
181. Jeong, JO, Han JW, Kim JM, et al. Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and Diabetic Neuropathy, 2011. (108):1340-1347.

182. Secco M, et al. Systemic Delivery of Human Mesenchymal Stromal Cells Combined with IGF-1 Enhances Muscle Functional Recovery in LAMA2(dy/2j) Dystrophic Mice. *Stem Cell*, 2012. doi: 10.1007/s12015-012-9380-9.
183. Morrow TJ. Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. *Neuroscience*, 2004. unit. 9.18.
184. Cheng CC, et al. Isolation and characterization of novel murine. 2012; e36085. doi: 10.1371/journal.pone.0036085.
185. Vivancos GG, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Medic. Biol Reach*, 2004. (37): 391-399.
186. Sarikcioglu L, Demirel BM, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol*. 2009. 68(1): 1-7.
187. Silva-Couto MA, et al. Effects of low-level laser therapy after nerve reconstruction in rat denervated soleus muscle adaptation. *Rev Bras Fisioter* 2012, 16(4): 320-327.
188. Zhang R, et al. A novel transgenic mouse model of Chinese Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Neural Regener Res*, 2014. 9(4):413-419. doi:10.4103/1673-5374.128248.
189. Russo TL, et al. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogen-1 in denervated rat skeletal Muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 2010. (31):45-57. doi 10.1007/s10974-010-9203-z.
190. Gigo-Benato D, Russo TL, Tanaka EH, Assis L, Salvini TF, Parizotto NA. Effects of 660 and 780 nm Low-Level Laser Therapy on Neuromuscular RECOVERY After Crush Injury in Rat Sciatic Nerve. *Lasers Surg Medic*, 2010. (42):833-842.
191. Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, Salvini TF. Electrical Stimulation increases matrix metalloproteinase-2 gene expression bur does not change its activity in denervated rat muscle. *Muscle Nerve*, 2008. (37):593-600.
192. Mathieu O, Cruz-orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc*, 1981. (121):75– 88.
193. Landish RM, Kosir AM, Nelson SA, Baltigalvis KA, Lowe DA. Adaptive and Nonadaptive responses to voluntary Wheel Running by mdx Mice. *Muscle Nerve*, 2008. 38(4): 1290-1303
194. Ramirez C, et al. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *Am J Phys Med Rehabil*, 2011. (90):930–939.
195. Kataoka H, et al. Hyperglycemia Inhibits Recovery From Disuse-Induced Skeletal Muscle Atrophy in Rats. *Physiol Res*, 2014. (63): 465-474.
196. Medina-Sanchez M, et al. Proximal Skeletal Muscle Alterations in Streptozotocin-Diabetic Rats: A Histochemical and Morphometric Analysis. *Am J Anat*, 1991. (191):48-56.
197. Aughsteeen AA, et al. Quantitative Morphometric Study of the Skeletal Muscles of Normal and Streptozotocin-Diabetic Rats. *JOP. J Pancreas (Online)*, 2006. 7(4):382-389.
198. Hegarty PV, Rosholt MN. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the number and diameter of fibres in different skeletal muscles of the rat. *J Anat*, 1981. (133):205-211. [PMID 7333950]
199. Fahim MA, el-Sabban F, Davidson N. Muscle contractility decrement and correlated morphology during the pathogenesis of streptozotocin-diabetic mice. *Anat Rec*, 1998. (251):240-244. [PMID 9624455]

200. Klueber KM, Feczko JD. Ultrastructural, histochemical, and morphometric analysis of skeletal muscles in a murine model of type I diabetes. *Anat Rec*, 1994. (239):18-34. [PMID 8037375]
201. Ozaki K, Matsuura T, Narama I. Histochemical and morphometrical analysis of skeletal muscle in spontaneous diabetic WBN/Kob rat. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2001. (102):364-370. [PMID 11585251]
202. Rodriguez T, Alvarez B, Busquets S, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. The increased skeletal muscle protein turnover of the streptozotocin-diabetic rat is associated with high concentrations of branched-chain amino acids. *Biochem Mol Med*, 1997. (61):87-94. [PMID 9232202]
203. Ashford AJ, Pain VM. Effect of diabetes on the rates of synthesis and degradation of ribosomes in rat muscles and liver in vivo. *J Biol Chem*, 1986. (261):4059-4065. [PMID 2419338]
204. Chaudhury SK, Mandal MB, Deshpande SB, Saxena ID. Effect of streptozotocin-induced diabetes on growth and proteolytic activity of different muscles in rats. *Indian J Exp Biol*, 1994. (32):877-880. [PMID 7896320].
205. Luz MAM, et al. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Brazil J Med Biol Res*, 2002. (35): 691-695.
206. Hyatt PK, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR. Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am J of Physiol Cell Physiol*, 2003. 285(5): C1161–C1173.
207. Michlovitz SL. *Thermal Agents in Rehabilitation*. 3 ed. Philadelphia, 1996. 30-54.
208. Benitez SU, Carneiro EM, de Oliveira ALR. Synaptic input to spinal cord motoneurons correlate with motor control impairments in a type 1 diabetes mellitus model. *Brain and Behavior*, 2015. S(10): e00372. doi: 10.1002/brb3.372.
209. Muramatsu K, Niwa M, Tamaki T, Ikutomo M, Masu Y, Hasegawa T, Shimo S, Sasaki SI. Effect of Streptozotocin-induced diabetes on motoneurons and muscle spindles in rats. *Neurosci Res*, 2016. doi:10.1016/j.ne.ures.2016.10.004.
210. Andersen H, Nielsen S, Mogensen CE, Jakobsen J. Muscle Strength in Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 2004. 53(6):1543-1548.
211. Savelberg H, et al. Redistribution of joint moments is associated with changed plantar pressure in diabetic polyneuropathy. *BMC Mus skelet Disord*, 2009. (3):10-16. doi: 10.1186/1471-2474-10-16.
212. Menz HB, Lord SR, St George R, Fitzpatrick RC. Walking stability and sensorimotor function in older people with diabetic peripheral neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil*. 2004; 85(2): 245-52.
213. Silva JV, et al. Risk Factors for Loss of Plantar Sensitivity in Diabetics: A Case-control Study in Endocrinology Outpatient Clinic. *R bras ci Saúde*, 2013. 17(2):113-120.
214. Argoff CE, Cole BE, Fishbain DA, Irving GA. Diabetic peripheral neuropathic pain: clinical and quality-of-life issues. *Mayo Clinic Proceed*, 2006. (81):3-11.
215. Vicent AM, Feldman EI. New insights into the mechanisms of Diabetic Neuropathy. *Endoc. Metabol. Disord*, 2004. (5):227-236.
216. Chiles NS, et al. Diabetes, peripheral neuropathy, and lower-extremity function. *J Diab Complic*, 2014. (28):91–95. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2013.08.007.
217. Segaudo-Roussel D, Fromy B, Saumet JL. Diabetic neuropathy in animal models. *Drug Discov Today Dis*, 2004. (4) 39-44.

218. Lennertz RC, et al. Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetic neuropathy, *J. Neurophysiol*, 2011. (106) 905-914.
219. Patel SS, Udayabanu M. Effect of *Urtica dióica* on memory dysfunction and hypoalgesia in an experimental model of diabetic neuropathy, *Neurosci Letters*, 2013. (552):114-128, 2013.
220. Sango K, Mukami H, Horie H, Yagihashi S. Impaired Axonal Regeneration in Diabetes. Perspective on the Underlying Mechanism from In Vivo and In Vitro experimental Studies. *Frontiers Endocrinol.* 2017; 8:(12): 1-8. doi: 10.3389/fendo.2017.00012.
221. Huang TJ, Price SA, Chilton L, Calcutt NA, Tomlinson DR, Verkhratsky A, Fernyhough P. Insulin prevents depolarization of the mitochondrial inner membrane in sensory neurons of type 1 diabetic rats in the presence of sustained hyperglycemia. *Diabetes*, 2003. (52):2129-2136.
222. Andersen H, Schmitz O, Nielsen. Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. *Diabet Med*, 2005. 22:14017. [PMID 16176203]
223. Abraham PM, Paul J, Paulose CS. Down regulation of cerebellar serotonergic receptors in streptozotocin induced diabetic rats: Effect of pyridoxine and aegle marmelose. *Brain Res Bull*, 2010. (82):87-94.
224. Xu G, Pierson C R, Murakawa Y, Sima AAF. Altered tubulin and neurofilament expression and impaired axonal growth in diabetic nerve regeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurology*, 2002. (61):164–175.
225. Vincent AM, et al., Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. *Endocrinology*, 2007. (148) 548–558.
226. Del Rey A, Apkarian AV, Martina M, Besedovsky HO. Chronic neuropathic pain-like behavior and brain-borne IL-1 β . *Ann. NY Acad Sci*, 2012. (1262): 101-107.
227. Kim D, et al. A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J. Biol. Chem*, 2007. (282)14975–14983.
228. Kim D, et al., NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *PNAS*, 2010. (107)14851-14856.
229. Evangelista AF. Avaliação do Efeito do Transplante de Células-Tronco Mesenquimais derivadas de Médula óssea em modelo murinho de Neuropatia Periférica Diabética. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz, 2014. [Tese de Doutorado].
230. Toth C C, Jedrzejewski N M, Ellis C L, Frey II WH. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. *Molecular pain*, 2010. (6): 2-22.
231. Hatanaka E, et al. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Clin Experim Immuno*, 2006. (146): 443–447.
232. Kim MJ, et al. Mesenchymal Stem Cells Suppress Muscle Atrophy Induced by Hindlimb Suspension. *J Stem Cell Res Ther*, 2015. 5(2):1-10.
233. Brown SA, Richards CM, Hanscom HN, Feng SL, Winkles JA, Biochem J. The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor-kappaB activation. *Biochem J*, 2003. (371): 395-403. PubMed: 12529173.
234. Jakubowski A, et al. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest*, 2005. (115): 2330-2340.

235. Girgenrath M, et al. TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO J*, 2006. (25): 5826-5839. doi:10.1038/sj.emboj.7601441.
236. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 2001. (91):534-551.
237. Brown SAN, Cheng E, Williams MS, Winkles JA. TWEAK-Independent Fn14 Self-Association and NF- κ B Activation Is Mediated by the C-Terminal Region of the Fn14 Cytoplasmic Domain. *PLoS ONE*, 2013. 8(6): p. e65248. doi:10.1371/journal.pone.0065248.
238. Tran NL, et al. The tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)-fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) signaling system regulates glioma cell survival via NF- κ B pathway activation and BCL-XL/BCL-W expression. *J Biol Chem*, 2005. (280) 3483-3492. doi: 10.1074/jbc.M409906200.
239. Whitsett TG, et al. Elevated expression of Fn14 in non-small cell lung cancer correlates with activated EGFR and promotes tumor cell migration and invasion. *Am J Pathol*, 2012. (181): 111-120. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.026.
240. Li H, et al. Tumor Necrosis Factor-related Weak Inducer of Apoptosis Augments Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9): Production in Skeletal Muscle through the Activation of Nuclear Factor κ B inducing Kinase and p38 Mitogen-activated Protein Kinase. *J Biol Chem*, 2009. 284(7): 4439-4450.
241. Kumar A, et al. TWEAK augments matrix metalloproteinase-9 expression in skeletal muscle cells through the activation of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B signaling pathways. *FASEB J*, 2008. (22): 962-26.
242. Chen HN, et al. TWEAK/Fn14 promotes the proliferation and collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts via the NF- κ B pathway. *Mol Biol Rep*, 2012. (39):8231-8241. doi: 10.1007/s11033-012-1671-3.
243. Dezawa M, et al. Bone Marrow Stromal Cells Generate Muscle Cells and Repair Muscle Degeneration. *Science*, 2005. (309): 314-317.
244. Tajrishi MM, et al. DNA methyltransferase 3a and mitogen-activated protein kinase signaling regulate the expression of fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) during denervation-induced skeletal muscle atrophy. *USA: J Biol Chem*, 2014. 289 (29): 19985-19999.
245. Burkly, LC, et al. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: Role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine* 40, 2007. 1-16.
246. Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A e O'Brien T. Mesenchymal stem cell based treatment for microvascular and secondary complications of Diabetes mellitus. *Front. Endocrinol*, 2014. (5):86. doi: 10.3389/fendo.2014.00086.
247. Si Y, et al. Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity. *Diabetes*, 2012. 61: 1616-1625. DOI: 10.2337/db11-1141 PMID: 22618776.
248. Dinarvand P, Hashemi SM e Soleimani M. Effect of transplantation of mesenchymal stem cells induced into early hepatic cells in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull*, 2010. 33: 1212-1217. PMID: 20606315.
249. Hao H, et al. Multiple intravenous infusions of bone marrow mesenchymal stem cells reverse hyperglycemia in experimental type 2 diabetes rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 436: 418- 423. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.117 PMID: 23770360.
250. Han JW, et al. Bone marrow- derived mesenchymal stem cells improve diabetic neuropathy by direct modulation of both angiogenesis and myelination in peripheral nerves. *Cell Transplantation*, 2015.

251. Caseiro AR, et al. Neuromuscular regeneration: Perspective on the Application of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretion Products. *Stem Cells Interna*, 2016. 16 pages. DOI: 10.1155/2016/9756973.
252. Pereira,T, Armada-da Silva PAS e Amorim I. Effects of human mesenchymal stem cells isolated from Wharton’s jelly of the umbilical cord and conditioned media on skeletal muscle regeneration using a myectomy model. *Stem Cells Intern*, 2014. ID 376918, 16 pages.
253. Delfino VDA, et al. 2002. Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. *J Bras Nefrol*, 2002. 24(1):31-36.
254. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol*, 2005. (288):R345-R353.
255. Chargé SBP e Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 2003. (84) 209-238.
256. Carlson MB e Faulkner JA. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Med Sci Sports Exer*, 1983. 15(30):187-198.
257. Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Prac*, 1991. (187):1-22.
258. Hurme T e Kalimo H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exer*, 1992. 24(20):197-205.
259. Sohni, A, Verfaillie CM. Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. *Stem Cells Int*, 2013. 130763.
260. Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative Medicine*, 2010. 5(1):121–43.
261. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 2006. 98(5):1076–84.
262. Natsu K, et al. Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote the Regeneration of Injured Skeletal Muscle without Differentiation into Myofibers. *Tissue Eng*, 2004. 10(7/8): 1093-1112.
263. Ho JH, et al. Multiple intravenous transplantsations of mesenchymal stem cells effectively restore long-term blood glucose homeostasis hepatic engraftment and beta-cell differentiation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transpl*, 2012. (21): 997-1009.
264. Zonta S, et al. Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplation: endovenous or arterial?. *Transpl Proceed*, 2010. 42 (4): 1336-1340.
265. Herberts CA, et al. Risk factors in the development of stem cells therapy. *J Transl Med*, 2012. 9 (29).
266. Magrisso, AB. Efeitos do tratamento com células tronco mesenquimais administradas pelas vias intraperitoneal e intravenosa em modelo experimental de sepsis aguda. Porto Alegre: UFRGS, 2013. [Tese doutorado].
267. Fischer UM, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Develop*, 2009. 18(5): 683-692.
268. Wannemuehler J., et al. Advances in mesenchymal stem cell research in sepsis. *J Surg Res*, 2012. 173(1):113-126.
269. Chen SL, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2004. 94(1):92-5
270. Schenk S, et al. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial MSC homing factor. *Stem Cells*, 2007. 25(1):245-51.

271. de Souza CF, et al. Celulas-Tronco Mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? Rev Bras Cardio Inv, 2010. 18(3): 344-353.
272. Omori Y, et al. Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cell after cerebral ischemia in adult rats. Brain Res, 2008. (1236):30-8.

ANEXO 1

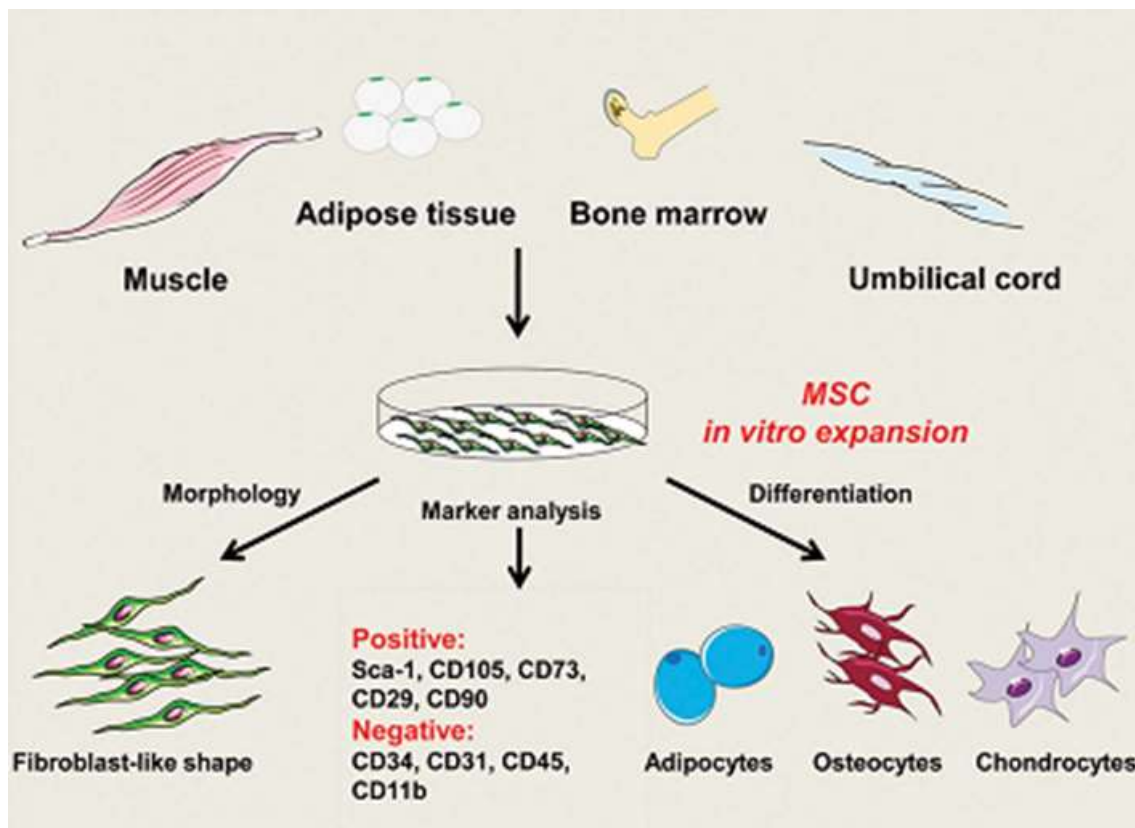


Fig.S1: MSCs: Morfologia e Características Imunoistoquímicas, Imunofenotipagem, Diferenciação e Proliferação. Na microscopia, as MSCs se apresentam como uma célula fibroblastóide alongada, fusiforme e pontiaguda, com núcleo oval, grande e central e citoplasma abundante. As MSCs são oriundas de diversos tecidos como músculo, tecido adiposo, cordão umbilical, polpa dentária e medula óssea. Seu diferencial está relacionado a sua capacidade de se autorrenovar (i.e., conseguem produzir mais de si mesmas) e de se diferenciar em outros tipos celulares, como células ósseas, musculares, de gordura, cartilagem, neuronais, dentre outras. Para tanto, o determinante dessa diferenciação são os estímulos ambientais aos quais são expostas/ou inseridas. i.e., aos fatores que estão sendo liberados por outros tipos celulares no meio que estão inseridas. São células fáceis de serem isoladas uma vez que possuem, em sua membrana, marcadores (antígenos) característicos desse tipo celular que permitem o seu isolamento. Além disso, são células de fácil cultivo por sua capacidade de se aderir facilmente a superfícies onde são cultivadas. Fonte: Amorin et al., 2012.

ANEXO 2

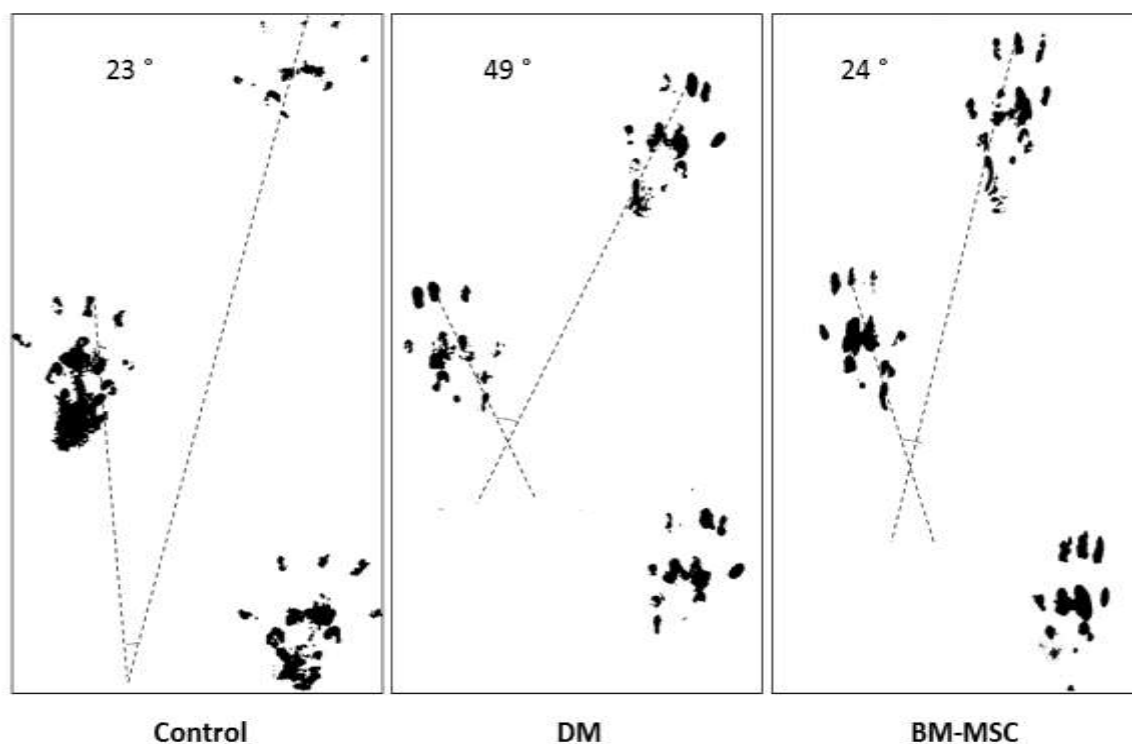


Figura S2: Ilustração da Análise de Pegada. A medida foi realizada com base no ângulo de desvio do eixo mediano do pé em relação ao eixo de movimento (isto é, o ângulo da pata traseira) medido em uma pegada claramente visível de cada animal de cada grupo. . Control - animais Controle; DM - animais diabéticos e BM-MSC – animais transplantados.

ANEXO 3

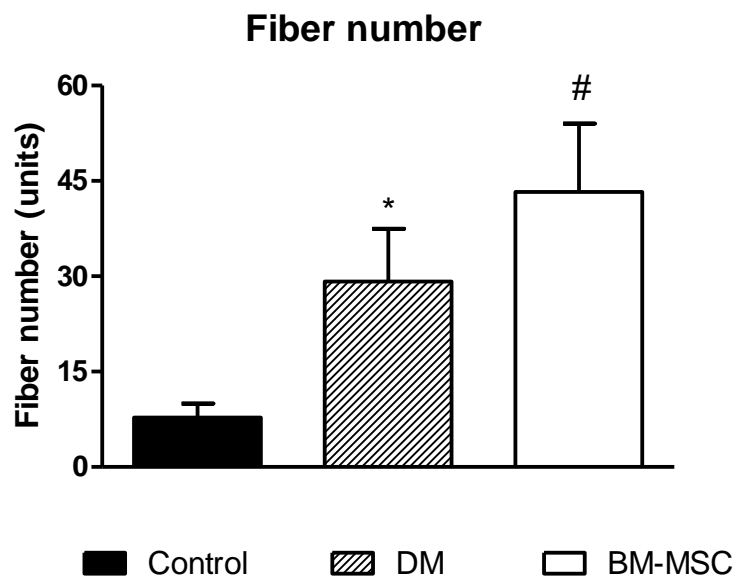


Fig. S3: Número de fibras. O grupo Controle apresentou um número médio de $7,75 \pm 1,1$ fibras; os diabéticos apresentaram $29,18 \pm 2,5$ fibras e o grupo BM-MSC apresentou $43,25 \pm 3,8$ fibras. Os valores foram expressos como média \pm SEM. Amplificação analisada de 400x. Control - animais Controle; DM - animais diabéticos e BM-MSC – animais transplantados. Ampliação de 400x. (* vs C, # vs DM; $p < 0,05$).