



**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA  
ÓSSEA SOBRE A NEUROPATIA CRÔNICA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM  
CAMUNDONGOS**

**ANNA LETHICIA LIMA OLIVEIRA**

**Salvador - Bahia**

**2017**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA  
ÓSSEA SOBRE A NEUROPATIA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM  
CAMUNDONGOS**

**ANNA LETHICIA LIMA OLIVEIRA**

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

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

**Salvador - Brasil**

**2017**

## AGRADECIMENTOS

À minha família, pelos ensinamentos éticos e religiosos que me sustentaram nessa caminhada de coragem e resistência acadêmica. Por toda a dedicação de minha mãezinha Ana Rosa Lima que sempre reavivou em mim o desejo de ser exímia nas ações, sem esquecer o verdadeiro sentido de amor à vida. Pelo companheirismo de meu pai, Elício, o qual me ensinou que o empenho é o caminho mais justo para alcançar as metas. Pelas orações e pela generosidade dos cuidados concedidos desde minha infância por “minhas tias-mães” Josefa Neta, Marli Lima e Marlene Lima. Além de toda disponibilidade e apoio sempre oferecido por meus primos Leo Melgaço, Luciana Lima, Alessandra Teles e tios Luciano Lima e Evelin Oliveira.

À professora Dra. Cristiane Flora Villarreal, pelo acolhimento na orientação, pela paciência na educação científica, pelo apoio amigo nas dificuldades e por tantos direcionamentos concedidos na construção profissional e pessoal.

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

À Dra. Milena Botelho Pereira Soares, Dr. Diogo e Dr. Daniel Pereira pelo apoio, estrutura e suporte necessário para a construção desta dissertação.

À meus amigos do Serviço de Microscopia Eletrônica do CPqGM, meu obrigado especial! Dr. Cláudio, Dra Lúcia, Dra Adriana, Arlene e Márcio, grande parte deste trabalho agradeço a vocês pelos serviços e acolhimento amigável durante minha extensa passagem no laboratório.

À equipe dos biotérios do CBTC e do CPqGM, especialmente a minha amiga Adriana que não poupou esforços para facilitar nossos trabalhos experimentais.

Aos amigos do LAFTE, grupo da dor, Gisele Graça, Afrânio Evangelista, Renan Fernandes, Leticia Almeida, Géssica Sabrina, Dourivaldo Santos, Kelly Gama, Luiza, Olívia, Pedro, Mariana, Daniele, Marlene. Colegas de estudos e, sobretudo, amigos que estiveram comigo nos sábados, domingos e feriados. Minha melhor equipe cirúrgica, analista e psicanalista!

Aos melhores companheiros que indiretamente tornaram possível o início e a conclusão deste trabalho como Matheus Brandão e Jacqueline Silva, além daqueles que facilitaram a

caminhada pelo companheirismo e direcionamento como amigos de faculdade (“Guels”) e da vida.

À CAPES pela bolsa concedida e apoio financeiro concedido.

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

O48e Oliveira, Anna Lethicia Lima  
Efeitos do tratamento com células mesenquimais de medula óssea sobre a neuropatia induzida por oxaliplatina em camundongos. / Anna Lethicia Lima Oliveira. - 2017.  
80 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiane Flora Villarreal, LETI – Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia  
Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

1. Neuropatia. 2. Quimioterapia. 3. Células-Tronco. 4. Mitocôndrias. 5. Estr  
I. Título.

CDU 616.85:57.086.83

" EFEITOS DO TRATAMENTO COM CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA SOBRE A NEUROPATIA CRÔNICA INDUZIDA POR OXALIPLATINA EM CAMUNDONGOS."

**ANNA LETHÍCIA LIMA OLIVEIRA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Dr. Bruno Solano de Freitas Souza  
Pesquisador  
FIOCRUZ

---

Dr. Ricardo David Couto  
Coordenador PPGFAR  
UFBA

---

Dra. Darizy Silva Amorim de Vasconcelos  
Professora Adjunta  
UFBA

*”Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. A excelência,  
portanto, não é um modo de agir, mas um hábito.”*

(Aristóteles)

OLIVEIRA, Anna Lethicia Lima. Efeitos do tratamento com células mesenquimais de medula óssea sobre a neuropatia induzida por oxaliplatina em camundongos. 80 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A neuropatia periférica é um efeito adverso comum de diversas drogas antitumorais, incluindo os complexos platinos. A oxaliplatina (OXL) é um fármaco de terceira geração amplamente usado no combate ao câncer colorretal metastático, ovariano e outras malignidades. Comparado a outros análogos platinos apresenta menor toxicidade sistêmica, mas acentuada neurotoxicidade. A neuropatia periférica associada à OXL é dose limitante do tratamento quimioterápico que se manifesta com alterações de sensibilidade e dor, e pode perdurar mesmo após descontinuidade do tratamento em sua forma crônica. A neuropatia induzida por quimioterápico é considerada uma das mais refratárias à medicação. A gabapentina, apesar de representar opção farmacológica frequente no controle clínico da neuropatia tem mostrado efeito apenas paliativo, transitório e de baixa efetividade. A terapia celular é considerada uma promessa na terapêutica de doenças neurológicas. Estudos iniciais demonstraram que células mesenquimais reduzem a neuropatia comportamental em modelos experimentais. Entretanto, até o presente momento, os efeitos de células-tronco na neuropatia quimioterápica não foram ainda investigados. **OBJETIVO:** O presente trabalho visa avaliar os efeitos do transplante de células mesenquimais de medula óssea (CMsMO) na neuropatia periférica crônica induzida por OXL em camundongos. **MÉTODOS:** CMsMO foram obtidas a partir de camundongos EGFP e foram caracterizadas. Camundongos C57Bl/16 machos foram submetidos à indução do modelo de neuropatia crônica pela administração endovenosa de OXL (1 mg/kg), durante quatro semanas e meia, totalizando nove administrações. Os camundongos do grupo controle receberam dextrose a 5% (veículo). Uma semana após o fim da indução do modelo, os animais foram tratados com uma única administração endovenosa de CMsMO ( $1 \times 10^6$ ) ou veículo. Gabapentina (70 mg/kg, 12/12h por 6 dias consecutivos, via oral), foi utilizada como tratamento farmacológico de referência. Os limiares nociceptivos mecânico e térmico foram avaliados durante todo o período experimental com filamentos de von Frey e cold plate, respectivamente. Secções dos nervos isquiáticos foram coletados nos tempos de platô de analgesia e final (14 semanas) para análises morfológicas e morfométricas das fibras A e C por microscopia óptica e eletrônica, além da quantificação de nitrito e Malondialdeído (MDA) como parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo. **RESULTADOS:** O tratamento com OXL reduziu o limiar nociceptivo mecânico e térmico frio de modo duradouro, indicando sucesso na indução do modelo crônico de neuropatia por OXL em camundongos. As avaliações comportamentais sugerem que CMsMO produzem efeito antinociceptivo, levando os limiares nociceptivos de animais neuropáticos a níveis similares aos de animais saudáveis. O tratamento com gabapentina teve efeito antinociceptivo discreto e de curta duração. A avaliação microscópica revelou poucos vestígios de degeneração axonal em fibras de nervo isquiático de animais neuropáticos e as análises morfométricas mostraram que tais alterações não eram significantes. Por outro lado, a ocorrência de mitocôndrias atípicas em axônios mielinizados e fibras C de animais neuropáticos foi maior que em animais não neuropáticos. O tratamento com CMsMO reduziu a atipia mitocondrial e os níveis de nitrito e MDA nos nervos de animais com neuropatia para níveis estatisticamente similares ao dos não neuropáticos. **CONCLUSÃO:** O presente trabalho demonstra que uma única administração de CMsMO é capaz de reverter as alterações de sensibilidade, e reduzir a atipia mitocondrial e níveis de produtos de estresse oxidativo no nervo periférico, característicos da neuropatia crônica por OXL. Considerando os efeitos de CMsMO sobre as mitocôndrias e produtos oxidativos no nervo isquiático, o efeito antinociceptivo pode decorrer da melhora no ambiente homeostático oxidativo.

**Palavras-Chave:** Neuropatia, Quimioterapia, Células-Tronco, Oxaliplatina, Mitocôndrias, Estresse Oxidativo.



OLIVEIRA, Anna Lethicia Lima. Effects of treatment with mesenchymal bone marrow cells on an oxaliplatin-induced neuropathy in mice. 80 f. il. Dissertation (Masters) – Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Research Center, Salvador, 2017.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Peripheral neuropathy is a common adverse effect of several antitumor drugs, including platinum complexes. Oxaliplatin (OXL) is a third generation drug widely used in the fight against metastatic colorectal cancer, ovarian cancer and other malignancies. When compared to others platinum analogues it presents lower systemic toxicity however marked neurotoxicity. Peripheral neuropathy associated with OXL is a dose limiting factor of chemotherapy treatment which manifests as changes in sensitivity and pain, and may persist even after discontinuation of treatment in its chronic form. Neuropathy induced by chemotherapy has been considered one of the most refractory to medication. Although gabapentin represents a frequent pharmacological option in the clinical control of neuropathy, it has shown only palliative, transient and low effectiveness effects. Cell therapy is considered a promise in the treatment of neurological diseases. Initial studies have shown that mesenchymal cells reduce behavioral neuropathy in experimental models. However, to date, the effects of stem cells on chemotherapeutic neuropathy have not been investigated yet.

**OBJECTIVE:** The present study aims to evaluate the effects of bone marrow mesenchymal cell transplantation (CMsMO) on chronic peripheral neuropathy induced by OXL in mice.

**METHODS:** CMsMO were obtained from GFP mice and were characterized by flow cytometry and cell differentiation. Male C57Bl/16 mice were submitted to induction of the chronic neuropathy model by intravenous administration of OXL (1 mg/kg) through four and a half weeks, totaling nine administrations. Control group mice received 5% dextrose (vehicle). One week after the end of model induction, the animals were treated with a single intravenous administration of CMsMO ( $1 \times 10^6$ ) or vehicle. Gabapentin (70 mg/kg, 12 / 12h for 6 consecutive days, orally) was used as a reference pharmacological treatment. The mechanical and thermal nociceptive thresholds were evaluated throughout the experimental period with von Frey filaments and cold plate, respectively. Sections of the ischiatic nerves were collected in the analgesia and final plateau times (14 weeks) for morphological and morphometric analysis of the A and C fibers by optical and electron microscopy, as well as quantification of nitrite and malondialdehyde (MDA) as biochemical parameters of oxidative stress.

**RESULTS:** The treatment with OXL reduced the cold mechanical and thermal nociceptive threshold durably, indicating success in the induction of the chronic model of neuropathy by OXL in mice. Behavioral assessments suggest that CMsMO produce an antinociceptive effect, in which nociceptive thresholds of neuropathic animals to levels similar to those of healthy animals. Gabapentin treatment had a mild and short-acting antinociceptive effect. Microscopic evaluation revealed few traces of axonal degeneration in sciatic nerve fibers of neuropathic animals and morphometric analyzes showed that such changes were not significant. On the other hand, atypical mitochondria occurred in greater degree in myelinated axons and C fibers of neuropathic animals, than in non-neuropathic animals. Treatment with CMsMO reduced mitochondrial atypia and nitrite and MDA levels in the nerves of animals with neuropathy to levels that are statistically similar to those of neuropathic ones.

**CONCLUSION:** The present work demonstrates that a single administration of CMsMO is able to reverse alterations of sensitivity, and reduce mitochondrial atypia and levels of oxidative stress products in the peripheral nerve, which is an characteristic of chronic neuropathy by OXL. Considering the effects of CMsMO on mitochondria and oxidative products on the sciatic nerve, the antinociceptive effect may result from improvement in the oxidative homeostatic environment.

**Key Words:** Neuropathy, Chemotherapy, Stem Cells, Oxaliplatin, Mitochondria, Oxidative Stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Geração de EROs a partir da redução do oxigênio à água. A molécula de oxigênio recebeu 4 elétrons.	23
<b>Figura 2</b>	Reação de Fenton: formação de (OH <sup>•</sup> ) pela reação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e Fe <sup>2+</sup> . Reação de Haber-weiss: formação de (OH <sup>•</sup> ) pela reação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e O <sub>2</sub> .	24
<b>Figura 3</b>	Delineamento experimental.	35
<b>Figura 4</b>	Procedimento para perfusão transcárdíaca.	41
<b>Figura 5</b>	Cultura de CMsMO em diferenciação em células das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica.	46
<b>Figura 6</b>	Variação do peso corporal dos camundongos no modelo de neuropatia periférica crônica induzida por OXL durante o período experimental.	47
<b>Figura 7</b>	Avaliação da função motora de camundongos no teste de rota-rod no modelo de neuropatia periférica crônica induzida por OXL durante o período experimental.	48
<b>Figura 8</b>	Efeito dos tratamentos sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos neuropáticos ao longo do período experimental.	49
<b>Figura 9</b>	Efeito dos tratamentos sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos neuropáticos ao longo do período experimental.	50
<b>Figura 10</b>	Fotomicrografias de nervos isquiáticos dos grupos experimentais (OXL, controle, gabapentina e CMsMO) para avaliação histológica das fibras mielínicas	51
<b>Figura 11</b>	Número e densidade de axônios mielinizados no nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia crônica por OXL.	52
<b>Figura 12</b>	Parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia por OXL, avaliação dos diâmetros dos axônios e das fibras mielínicas no tempo de máxima analgesia e tempo final.	53
<b>Figura 13</b>	Parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia por OXL, avaliação da razão g (diâmetro do axônio/diâmetro da fibra) no tempo de máxima analgesia e tempo final	54
<b>Figura 14</b>	Eletromicrografias de nervos isquiáticos dos grupos experimentais (OXL, controle, gabapentina e CMsMO) para avaliação ultraestrutural.	55
<b>Figura 15</b>	Parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia por OXL, avaliação da densidade e da área das fibras C no tempo de máxima analgesia e tempo final.	56
<b>Figura 16</b>	Mitocôndrias normais e atípicas em fibras mielínicas e amielínicas de nervos isquiáticos.	57
<b>Figura 17</b>	Quantificação de mitocôndrias atípicas em nervos isquiáticos de camundongos em modelo de neuropatia crônica por OXL.	60
<b>Figura 18</b>	Efeito do os neuropáticos. tratamento com CMsMO sobre os níveis de nitrito em nervos isquiáticos de camundongos neuropáticos.	61
<b>Figura 19</b>	Efeito do tratamento com CMsMO sobre os níveis de MDA em nervos isquiáticos de camundongo.	62

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b>	Expressão de marcadores de superfície celular em CMsMO por citometria de fluxo	45
-----------------	--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

<b>DACH</b>	1,2-diaminociclohexano
<b>OXL</b>	Oxaliplatina
<b>5 FU</b>	5-fluorouracil
<b>LV</b>	Leucovorin
<b>MMR</b>	Mismatch repair
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ERNs</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	nio superóxido
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical hidroxil
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Perxido de hidrogênio
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio singleto
<b>SOD</b>	Superxido dismutase
<b>GPx</b>	Glutathiona peroxidase
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>GRd</b>	Glutathiona redutase
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>NO</b>	xido ntrico
<b>CT</b>	Clula- tronco
<b>CMsMO</b>	Clula-tronco de mdula óssea
<b>ISCT</b>	International Society for Cellular Therapy
<b>CTA</b>	Clula tronco adulta
<b>CTE</b>	Clula tronco embrionria
<b>iPS</b>	<i>Induced pluripotency stem cell</i>
<b>EGFP</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<b>CEUA</b>	Comit de tica no Uso de Animais

<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>GA</b>	Glutaraldeído
<b>TBARS</b>	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>NP</b>	Neuropatia periférica
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>MDA</b>	Malondialdeído

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	DOR E DOR NEUROPÁTICA: ASPECTOS GERAIS.....	18
2.2	QUIMIOTERÁPICOS E COMPOSTOS DE PLATINA .....	19
2.3	NEUROPATIA POR OXALIPLATINA (OXL): ASPECTOS GERAIS.....	20
2.4	MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA NEUROPATIA INDUZIDA POR OXL .....	21
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO NA NEUROPATIA POR OXL .....	22
2.6	TERAPÊUTICA PARA NEUROPATIA PERIFÉRICA .....	25
2.7	TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1	ANIMAIS.....	33
4.2	MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA CRÔNICA INDUZIDA POR OXL.....	33
4.3	DESENHO EXPERIMENTAL .....	33
4.4	TESTE NOCICEPTIVO MECÂNICO - FILAMENTOS DE VON FREY .....	36
4.5	TESTE NOCICEPTIVO TÉRMICO – COLD PLATE.....	36
4.6	AVALIAÇÃO MOTORA – ROTA ROD .....	37
4.7	ISOLAMENTO E CULTURA DE CMSMO.....	37
4.8	DIFERENCIAÇÃO DE CMSMO .....	38
4.9	CITOMETRIA DE FLUXO .....	39
4.10	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	40
4.10.1	<b>Coleta e processamento do tecido</b> .....	40
4.10.2	<b>Microscopia óptica</b> .....	41

4.10.3	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	42
4.11	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	42
4.11.1	Coleta, preparo do homogenato e quantificação protéica.....	43
4.11.2	Determinação de Nitrito.....	43
4.11.3	Determinação de malondialdeído (MDA).....	43
4.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE CMSMO.....	45
5.1.1	Citometria de fluxo .....	45
5.1.2	Diferenciação de CMsMO.....	45
5.2	PESO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA CRÔNICA INDUZIDA POR OXL .....	46
5.3	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA DOS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA CRÔNICA INDUZIDA POR OXL.....	47
5.4	EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO DE CAMUNDONGOS NEUROPÁTICOS.....	48
5.5	EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO FRIO DE CAMUNDONGOS NEUROPÁTICOS.....	49
5.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CMSMO SOBRE PARÂMETROS ESTRUTURAIS DO NERVO ISQUIÁTICO.....	51
5.6.1	Morfologia de fibras A .....	51
5.6.2	Morfometria de fibras A .....	52
5.6.3	Morfologia de fibras C .....	54
5.6.4	Morfometria de fibras C .....	55
5.6.5	Morfologia e morfometria mitocondrial.....	56
5.7	DOSAGENS BIOQUÍMICAS NO NERVO ISQUIÁTICO .....	60
5.7.1	Nitrito.....	60
5.7.2	Malondialdeído (MDA) .....	61
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A neuropatia periférica é um efeito adverso comum de várias classes de drogas anticancerígenas, incluindo os alcalóides da vinca, taxanos e complexos de platina, e representa uma importante limitação clínica ao tratamento (ARGYRIOU et al., 2008a). Tais agentes exercem efeitos diretos e indiretos sobre os nervos sensoriais, reduzindo o limiar de geração do potencial de ação e alterando a velocidade de condução no nervo (ARGYRIOU et al., 2008b). Esses eventos estão relacionados ao desenvolvimento de neuropatia, o que justifica porque esses quimioterápicos, sobretudo mediante uso crônico, têm como consequência comum a dor neuropática (LING et al., 2007). A neuropatia se manifesta como alterações sensoriais, sendo frequentemente associada à dor severa, podendo ao fim do tratamento quimioterápico ser reversível ou persistir de forma crônica durante anos (WOLF et al., 2008). A oxaliplatina (OXL) é um agente quimioterápico de terceira geração muito utilizado como terapia primária do câncer colorretal metastático e outras malignidades como câncer de mama, pulmão e ovário (SCRENCI et al 2000). A OXL é estruturalmente semelhante à cisplatina, mas contém ligandos do tipo 1,2-diaminociclohexano (DACH). Esta modificação estrutural aumenta a sua atividade antitumoral e altera seu perfil de efeitos colaterais: OXL induz menor nefrotoxicidade em relação à cisplatina, nenhuma hematotoxicidade como o faz a carboplatina, mas por outro lado induz maior neurotoxicidade (Muggia, 2004). A neuropatia periférica induzida pela oxaliplatina caracteriza-se por alterações de sensibilidade, sobretudo alodinia e hiperalgesia ao frio, e dor neuropática (CERSOSIMO, 2005). Não há opções farmacológicas eficazes para tratar a dor neuropática induzida pela quimioterapia (GROTHEY, 2005). A gabapentina, um anticonvulsivante, provou ser eficaz no controle da neuropatia diabética dolorosa, da neuralgia pós-herpética, e de outras síndromes dolorosas, entretanto, ensaios clínicos não conseguiram demonstrar a eficácia prolongada da gabapentina no controle da dor neuropática induzida pela quimioterapia (RAO et al., 2007). Neste cenário, surge a necessidade de se desenvolver terapias mais efetivas no controle da dor neuropática quimioterápica, permitindo aos pacientes oncológicos o restabelecimento de suas funções sensoriais e melhora na qualidade de vida.

A terapia celular tem sido considerada promissora na terapêutica de doenças neurológicas, por visar o reparo tecidual e/ou a restituição funcional. Como a dor neuropática induzida por quimioterápicos decorre de neurotoxicidade, com perda da integridade e função neural, é possível que o potencial regenerador de células-tronco seja capaz de restabelecer a função do nervo e pôr fim aos sintomas debilitantes da neuropatia. Estudos iniciais



demonstraram que a administração de células-tronco reduz a neuropatia comportamental induzida por lesão mecânica do nervo isquiático (KLASS et al., 2007; MUSOLINO et al., 2007). Do mesmo modo, dados do nosso laboratório apontaram o potencial analgésico de células mesenquimais na neuropatia diabética (GUIMARAES et al., 2013). Entretanto, até o presente momento, nenhum estudo avaliou o efeito do tratamento com células-tronco na neuropatia induzida por quimioterapia. Nesse contexto, o presente projeto propõe estudos comportamentais e de microscopia para investigar o potencial de células mesenquimais de medula óssea no controle da neuropatia experimental crônica induzida pelo quimioterápico oxaliplatina.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOR E DOR NEUROPÁTICA: ASPECTOS GERAIS

A detecção de um estímulo nocivo é um evento essencial para a sobrevivência do indivíduo, já que as respostas geradas pelo sistema somatossensorial ativado por esse estímulo possibilitam a manutenção da integridade tecidual (BASBAUM et al., 2009). A recepção de um estímulo nocivo por fibras sensoriais presentes na pele e na grande maioria dos órgãos e tecidos do corpo, ativa vias que conduzem essas informações ao sistema nervoso central onde são interpretadas como dor (STUBBLEFIELD et al., 2009). A dor denominada fisiológica tem caráter adaptativo, pois tem a função de proteção e alerta contra estímulos nocivos, sendo sua causa facilmente identificada. A medida que este estado doloroso perpetua-se, modificações no padrão de expressão gênica e excitabilidade estabelecem-se nas vias de dor, gerando um quadro crônico de dor que não tem função fisiológica nítida. A dor crônica diferencia-se da dor aguda não apenas quanto a duração, mas quanto a incapacidade do sistema nervoso em restabelecer o padrão de atividade neuronal dentro dos níveis homeostáticos normais (LOESER E MELZACK, 1999). Os impulsos nociceptivos aferentes ativam as redes neuronais gerando os padrões dolorosos. Quando a dor aguda é muito intensa ou repetida, os impulsos nociceptivos e a resposta de stress a ela associada, podem induzir estados de hiperexcitabilidade persistentes nas vias de dor, que facilitam a manutenção da dor mesmo que o estímulo ou lesão aguda já tenham desaparecido (LOESER E MELZACK, 1999). Os neurônios são estruturas dinâmicas, com uma plasticidade bioquímica/funcional que é o substrato da dor crônica. Essas alterações plásticas, bioquímicas e eletrofisiológicas se refletem em quadros de hiperalgesia, dor espontânea, parestesia e alodinia mecânica e térmica que caracterizam a dor crônica (SCHAIBLE et al 2006). A manutenção desse estado de facilitação caracteriza a dor crônica, que é definida como a dor que persiste além do período normal de cura (Backonja et al., 2013).

Entre as síndromes de dor crônica, a dor neuropática, decorrente de lesão ou disfunção do sistema nervoso, está entre as mais prevalentes e debilitantes. A prevalência de neuropatias crônicas para a população mundial está estimada na faixa de 3 a 17%, dependendo do país sob análise (VAN HECKE et al., 2014). No Brasil, um estudo realizado na cidade de São Luiz evidenciou uma prevalência de 10% de dor neuropática crônica. A dor neuropática pode ser consequência de diversos fatores ou doenças, entre eles destacam-se: diabetes (OBROSOVA, 2009); neuralgia pós-herpética (SCHAIBLE et al., 2006); lesão de nervo periférico, incluindo

neuralgia pós-cirúrgica (KEHLET et al., 2006); radiculopatias (FREYNHAGEN et al., 2006), infecção por HIV (SIMPSON et al., 2010), câncer e quimioterapia (BENNETT et al., 2012), entre outras. Dentre essas, a neuropatia induzida por quimioterápicos é uma das mais refratárias aos analgésicos.

## 2.2 QUIMIOTERÁPICOS E COMPOSTOS DE PLATINA

O câncer representa hoje um dos grandes problemas de saúde pública mundial. O tratamento do câncer tem evoluído muito nas últimas décadas, mas a alta toxicidade dos agentes quimioterápicos disponíveis ainda é uma realidade a ser superada. Nos últimos anos, diversos agentes antineoplásicos tem propiciado uma sobrevida significativa aos pacientes oncológicos, contudo os efeitos adversos como náuseas, vômitos, neutropenia, infecções, mucosites e neuropatias tem sido limitantes ao tratamento (AUTHIER et al., 2009). As principais classes de quimioterápicos disponíveis, como análogos platinos (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina), taxanos (paclitaxel e docetaxel), alcaloides de vinca (vincristina), talidomida e bortezomida, estão associadas a relatos frequentes de neuropatia periférica como efeito adverso (AUTHIER et al., 2009).

Os compostos platinos representam uma classe de drogas antitumorais de uso amplo em diversos tipos de neoplasias, como câncer de ovário, testículos, mama, pulmão, colorretal metastático, estômago e pâncreas. Dados recentes apontaram que os compostos de platina, sozinhos ou em combinação com outros fármacos, são usados para tratar de 40 a 80% dos pacientes com câncer (KELLAND et al., 2007; PETIT et al., 2006).

O primeiro composto metálico produzido foi a cisplatina, que provocou grande euforia na clínica oncológica quando em 1978 foi lançada no mercado como Platinole®, tendo 80% de eficácia quimioterápica. Apesar da grande atividade antitumoral, a cisplatina teve uso limitado por seus efeitos nefrotóxicos e ototóxicos, além dos efeitos gastrointestinais clássicos dos quimioterápicos. Então um composto platino de segunda geração foi produzido, a carboplatina, com ação similar a cisplatina, impedindo a duplicação do DNA. A carboplatina foi muito usada na década de 80 por ter os efeitos adversos renais e gastrointestinais reduzidos, porém apresentou hematotoxicidade limitante, com indução de leucopenia, anemia, mielossupressão grave e trombocitopenia, sendo também associada a mecanismos de resistência tumoral (PETIT et al., 2007). A seguir, foi desenvolvido no Japão um composto platino de terceira geração com potente atividade antitumoral e menor toxicidade plasmática,

a oxaliplatina. A molécula de OXL é um trans-1-diaminociclohexano-2-OH que tem maior atividade antineoplásica quando usada associada aos outros quimioterápicos, como ocorre com o esquema denominado FOLFOX ou FOX, no qual a oxaliplatina é associada com o 5-fluorouracil (5FU) e o leucovorin (LV) (DE GRAMONT et al., 2000). A incorporação da OXL ao esquema FOLFOX tem aumentado a expectativa de vida de pacientes com câncer colorretal metastático, para os quais constitui tratamento de primeira linha, além do uso em câncer de ovário avançado, mama, pulmão, entre outros (De GRAMONT et al., 2000).

A OXL tem como mecanismo de ação o potente bloqueio da síntese de DNA, interferindo na proliferação celular por meio do escape dos mecanismos de reconhecimento e reparo. A OXL tem um grupo oxalato e o ligante carreador DACH. O fármaco quando em circulação sanguínea é dissociado desacoplando o oxalato e formando complexos platinos. Esses complexos formam adutos com a molécula de DNA, na região guanina-guanina ou adenina-guanina intracadeia, interferindo no metabolismo e organização celular com subsequente apoptose (CHU et al., 2004). Os adutos do diaminociclohexano ao DNA não são reconhecidos pelo sistema de reparo do DNA (complexo MMR – do inglês mismatch repair) e impedem novas replicações, fazendo com que este fármaco seja ativo em linhagens de células resistentes à cisplatina. Seus metabólitos ativos se acumulam pouco no plasma, implicando em pouca nefrotoxicidade. Por outro lado os complexos de platina formados no interior celular pelo metabolismo da oxaliplatina são mais neurotóxicos que outros fármacos platinos (CVITKOVIC E BEKRADDA, 1999; PARK et al., 2009).

### 2.3 NEUROPATIA POR OXALIPLATINA (OXL): ASPECTOS GERAIS

A neuropatia sensorial periférica (NSP) acomete em torno de 70% dos pacientes que fazem uso da OXL (PARK et al., 2010). Seus efeitos neurotóxicos podem ocorrer de forma aguda e transitória logo nas primeiras horas pós infusão, ou após doses cumulativas, a depender da dose e do tempo de tratamento. A forma aguda é mais incidente (85 a 95% dos pacientes) e tem como sintomas parestesias distais e periorais exacerbadas pelo frio, câimbras, espasmos e disestesias, que são associados à hiperexcitabilidade nervosa. A neuropatia crônica ocorre em torno de 10 a 20% dos pacientes quando em doses maiores que 750-850 mg/m<sup>2</sup>. Ela pode ser parcialmente (80% dos casos) ou completamente reversível em 6-8 meses após a interrupção da quimioterapia (ARGYRIOU; POLYCHRONOPOULOS et al., 2008), apesar de alguns oncologistas contestarem essa reversão na prática clínica. De fato,

PIETRANGELI et al. (2006) e PARK et al. (2010) demonstraram que os déficits neurofisiológicos e clínicos da neuropatia persistem em pacientes acompanhados até 2,5 anos pós interrupção da terapia quimioterápica. Na NSP induzida por OXL predominam sintomas sensitivos, parestesias e disestesias principalmente em mãos e pés, que progridem com ataxia sensitiva, alteração proprioceptiva e déficit funcional, tornando atividades simples, como escrever, segurar objetos e abotoar camisas, problemas para a rotina do paciente (ARGYRIOU et al., 2013).

#### 2.4 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA NEUROPATIA INDUZIDA POR OXL

Os mecanismos determinantes do desenvolvimento da neuropatia crônica e aguda induzida pela oxaliplatina não são claramente definidos. Diversos estudos apontam que distúrbios de canais iônicos podem estar envolvidas nessa síndrome neuropática. Essa hipótese encontra paralelo em outras síndromes clínicas de dor nas quais o comprometimento de canais iônicos produz hiperexcitabilidade e hiperalgesia (CAROZZI et al., 2015). Estudos pré-clínicos sugerem que a NP aguda induzida pela OXL decorre de alterações dos canais de sódio voltagem-dependentes, ocasionadas pela redução na concentração de íons divalentes - como cálcio, sódio e magnésio - quelados pelo oxalato, um dos metabólitos da oxaliplatina. A modificação da função de canais de sódio está associada com a hiperalgesia ao frio que caracteriza a fase inicial da neuropatia. Em adição, JOSEPH et al. (2008) demonstraram que nos primeiros estágios do desenvolvimento da neuropatia aguda induzida por OXL, fibras nociceptivas periféricas são lesadas por estresse oxidativo e que o fenômeno pode ser um dos eventos iniciais no desencadeamento dos sintomas sensitivos relacionados à neurotoxicidade induzida por esse quimioterápico. Já a toxicidade tardia está relacionada à dose cumulativa e está envolvida com alterações morfológicas e apoptose em neurônios aferentes primários, além de disfunção mitocondrial (NIKCEVICH et al., 2008). A NP crônica induzida pela OXL pode ocorrer pela redução do metabolismo celular e do transporte axoplasmático como resultado do acúmulo de metabólitos platinos em neurônios dos gânglios das raízes dorsais (GRD)(ARETI et al., 2014)

Adicionalmente, alguns estudos relacionam eventos da neuropatia aguda e crônica da OXL. Tem sido proposto que a hiperexcitabilidade axonal, ocasionada por alterações dos canais de  $\text{Na}^+$ , promove a degeneração axonal sensitiva e modula uma cascata de eventos que culminará no excesso de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e continuada degeneração axonal, originando assim a

neuropatia crônica (PARK et al., 2009). Em adição, estudos histológicos têm mostrado alterações morfológicas e estruturais dos neurônios dos gânglios das raízes dorsais, como lesões nos corpos celulares (CAVALETTI et al., 2008), alterações do núcleo e nucléolo (CAVALETTI et al., 2001; MC KEAGE et al., 2001), atrofia dos neurônios (JAMIESON et al., 2005) e morte celular (TA et al., 2006) durante a neuropatia quimioterápica.

SAKURAI et al. (2009) demonstraram que os dois compostos resultantes da metabolização da OXL, o oxalato e o  $\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2$  apresentam papéis diferentes na neurotoxicidade induzida pela OXL. Enquanto o oxalato está associado à quelação do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, aumentando a entrada de  $\text{Na}^+$  nos neurônios na fase inicial da neuropatia, o metabólito  $\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}_2$  está associado com a alodinia mecânica induzida pela OXL, que pode ocorrer devido ao acúmulo da ligação de Pt-DNA.

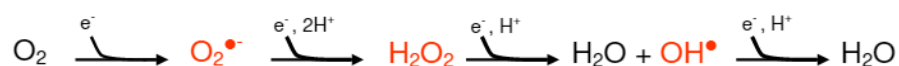
A despeito dos inúmeros mecanismos investigados na fisiopatologia da neuropatia quimioterápica, o estresse oxidativo é seguramente determinante nessa síndrome. O dano neuronal decorrente de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial tem sido considerado mecanismo fisiopatológico central da neuropatia periférica induzida por OXL (WINDEBANK e GRISOLD, 2008). O estresse oxidativo pode representar um evento chave de apoptose, distúrbios metabólicos e falha bioenergética nos neurônios sensoriais, desencadeando e perpetuando a neuropatia (ARETI et al., 2014). Os mecanismos envolvidos nesses eventos são descritos em detalhes a seguir.

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO NA NEUROPATIA POR OXL

Tem sido amplamente demonstrado que a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) por quimioterápicos antineoplásicos contribui para indução de apoptose em células cancerosas. Contudo, a suscetibilidade do sistema nervoso periférico às lesões oxidativas acarreta a neurotoxicidade dos agentes quimioterápicos. Essa suscetibilidade está relacionada a diferentes fatores, como (i) a ausência da barreira hematoencefálica em torno dos GRD, onde se localizam os corpos celulares dos neurônios sensoriais, facilitando o acesso de moléculas aos corpos neuronais; a deficiência de um sistema linfático; (iii) a ausência de fluido cerebrospinal em torno dos nervos periféricos, que propicia o acúmulo dos metabólitos e substâncias nocivas no tecido nervoso. De fato, SCRENCI et al. (2000) e ANTHONY et al. (2008) mostraram que a concentração de platinos no tecido nervoso periférico é similar a concentração observada no tecido tumoral e mais elevada que no encéfalo.

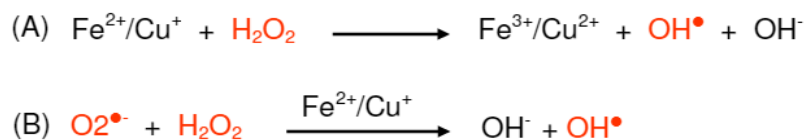
O estresse oxidativo ocorre em uma variedade de doenças do sistema nervoso, como Parkinson e Alzheimer (HALLIWELL 1992), além de neuropatias dolorosas por diferentes desencadeantes. Estresse oxidativo refere-se aos danos provocados por elétrons desemparelhados em radicais livres de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e decorre de um desbalanço entre a formação destas espécies e a capacidade das defesas antioxidantes do organismo. Pequenas flutuações na concentração destes oxidantes exercem um papel na sinalização intracelular, enquanto aumentos descontrolados dessas espécies reativas conduzem a reações em cadeia com proteínas, lipídeos, polissacarídeos e DNA (DROGE, 2002).

O balanço redox intracelular é mantido pelo equilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes ou redutoras. Ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $O_2$ ) constituem os principais componentes oxidantes endógenos (KAMATA e HIRATA, 1999; THANNICKAL e FANBURG, 2000). Em condições normais, o  $O_2^-$  é transformado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela ação da superóxido dismutase (SOD). O  $H_2O_2$  por sua vez é reduzido a  $H_2O$  pela glutathiona peroxidase (GPx), consumindo glutathiona reduzida (GSH), a qual é mantida neste estado pela glutathiona redutase (GRd), com a utilização de NADPH. Desta forma, a mitocôndria possui um sistema antioxidante eficiente composto por GSH, SOD, NADPH, GPx e GRd, além de vitaminas C e E (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000). A figura abaixo mostra as reações que ocorrem durante a redução do oxigênio até a formação da água com geração de EROs.



**Figura 1:** Geração de EROs a partir da redução do oxigênio à água. A molécula de oxigênio recebeu 4 elétrons.

As EROs podem gerar novos radicais livres ao sequestrar elétrons de qualquer molécula biológica. O hidroxil é um dos radicais que possui maior reatividade e citotoxicidade por reagir com moléculas orgânicas e formar lipoperóxidos e radicais orgânicos. Este radical pode ser formado a partir da reação do peróxido de hidrogênio (agente oxidante) com metais de transição (ferro e cobre) (FRIDOVICH et al., 1998). Abaixo podemos ver as reações de Fenton e Haber-weiss descrevendo a formação do hidroxil.



**Figura 2:** (A) Reação de Fenton: formação de ( $\text{OH}^\bullet$ ) pela reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{Fe}^{2+}$ . (B) Reação de Haber-weiss: formação de ( $\text{OH}^\bullet$ ) pela reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ .

Além das EROs, as ERNs também tem grande participação na fisiologia celular, como por exemplo o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). O peroxinitrito é formado a partir da reação do óxido nítrico (NO) com ânions superóxidos e representa ERN de alta reatividade com constituintes orgânicos celulares (RADI et al., 2002).

O sistema nervoso possui características que o tornam mais propício ao estresse oxidativo, como as altas concentrações de ferro, o grande consumo de oxigênio e a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados alvos para lipoperoxidação (WARNER et al., 2004). A grande demanda por  $\text{O}_2$  deve-se ao alto consumo de ATP pelos neurônios, necessário para manter o potencial de membrana e o fluxo de neurotransmissores. Além disso, o potencial de ação repetitivo, em excitabilidade, causa um acúmulo de íons  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no citosol neuronal e efluxo de  $\text{K}^+$  para o meio extracelular. Para tal, o metabolismo mitocondrial oxidativo utiliza a glicose como substrato energético. Isto significa que a função neuronal depende muito da eficiência das mitocôndrias, já que o ATP neuronal decorre do metabolismo oxidativo mitocondrial. As mitocôndrias possuem duplas membranas, sendo a membrana externa permeável a íons e outras pequenas moléculas, enquanto que a membrana mais interna é mais impermeável e apresenta canais iônicos e transportadores de membrana. O NADH e  $\text{FADH}_2$  transferem energia para a cadeia transportadora de elétrons nas cristas mitocondriais via complexos I, II, III e IV. A energia em forma de elétrons é transferida, via complexos, do NADH/ $\text{FADH}_2$  até o receptor final  $\text{O}_2$ . Todavia, os elétrons ao vazarem da cadeia de transporte de elétrons e gerarem EROs podem, por sua vez, danificar a própria mitocôndria. Em contrapartida, a mitocôndria lesada apresenta maior vazamento de elétrons e, consequentemente produz mais EROs, gerando um ciclo vicioso (KANN e KOVACS, 2007).

Os agentes antineoplásicos geram EROs envolvidas na indução de apoptose das células cancerosas. Uma das vias de apoptose induzida por quimioterápicos envolve a liberação do citocromo c dos complexos mitocondriais. Quando isto ocorre os elétrons em transferência na cadeia fosforilativa são desviados para o  $\text{O}_2$  e são formados os radicais superóxido. Esses radicais livres gerados tem diversos alvos celulares, sendo os lipídeos celulares seus alvos primários. Após reações de lipoperoxidação são gerados os produtos



primários, radicais peroxil e alcoxil, e os produtos secundários são os aldeídos como o malondialdeído (MDA). Os aldeídos têm caráter eletrofílico e são mais estáveis, e assim se difundem dentro da célula alterando componentes celulares e funções bioquímicas. Estes aldeídos se ligam a grupos de aminoácidos, os quais são críticos para a estabilidade da estrutura terciária das proteínas, inativando dessa forma enzimas e sítios ativos de receptores. Além disso, a geração de aldeídos por peroxidação lipídica durante estresse oxidativo induzido por quimioterápicos ativa os receptores de morte CD95 na via apoptótica. O CD95 tem um domínio extracelular rico em cisteína ao qual os agentes eletrofílicos se ligam fortemente (CONKLIN et al., 2004), ativando a apoptose.

Os quimioterápicos podem provocar o estresse oxidativo de modo direto, ao formar os adutos de DNA nuclear em células neuronais do GRD, ou de modo indireto, por comprometimento da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e eventos subsequentes. Já tem sido demonstrado que o dano mitocondrial induzido pela OXL é um mecanismo importante de desenvolvimento da neuropatia periférica crônica. Em estudos experimentais de neuropatia periférica induzida por quimioterápico (OXL, paclitaxel e bortezomib) foram observadas alterações mitocondriais associadas à déficits na cadeia respiratória e na produção de ATP em células neuronais. O uso crônico da OXL induz aumento no número de mitocôndrias vacuoladas e com tamanhos aumentados nos axônios de fibras nervosas sensoriais A e C (XIAO et al., 2011, 2012; ZHENG et al., 2012)

As disfunções mitocondriais tem envolvimento central na manutenção da doença neuropática por ser fonte primária de EROs celular. EROS, por sua vez, afetam os lipídeos de membrana axonal por lipoperoxidação, levando a mudança da integridade e fluidez (BAINS E HALL, 2011), e através da interação com proteínas, provocam mudanças estruturais e funcionais de modo irreversível (ALVARES E RADI, 2003).

## 2.6 TERAPÊUTICA PARA NEUROPATIA PERIFÉRICA

A neuropatia é frequentemente associada à dor severa, estando associada à má qualidade de vida, incapacitação temporária ou permanente, e comorbidades tais como depressão, ansiedade, distúrbios no sono e dificuldades no trabalho (O'CONNOR, 2009; BENRUD-LARSON, 2000). Até o presente momento, nenhum alvo farmacológico preciso foi identificado e não há uma estratégia bem definida para reduzir a dor neuropática decorrente do uso de quimioterápicos.

Anti-inflamatórios e analgésicos, que geralmente produzem uma melhora significativa e rápida na dor resultante de lesão tecidual, não são bons analgésicos para a dor neuropática. Esta é tratada com medicamentos que influenciam a excitabilidade neuronal, mas ainda esses não induzem boa analgesia nessas síndromes em função da complexa fisiopatologia que envolve as neuropatias (DRAY et al., 1994). A terapêutica convencional da dor neuropática tem feito uso predominante dos antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes e opióides (FINNERUPA, 2010).

Os antidepressivos tricíclicos são representados, sobretudo por amitriptilina, imipramina, desipramina e nortriptilina, e esta foi a primeira classe de drogas com efeito analgésico na neuropatia em ensaios clínicos (MAIZELS e MCCARBERG, 2005). Os antidepressivos possuem propriedades analgésicas dissociadas de sua ação antidepressiva, e vários são os mecanismos propostos para tal ação. Entre eles tem destaque o bloqueio da recaptação de noradrenalina e serotonina, o bloqueio dos canais de sódio e cálcio, além de agirem bloqueando receptores alfa-adrenérgicos, colinérgicos e muscarínicos (DWORKIN et al., 2003; JENSEN et al., 2006).

Os anticonvulsivantes, como a gabapentina e a pregabalina, são fármacos desenvolvidos para o tratamento da epilepsia, mas são úteis também no controle de dor neuropática (BACKONJA et al., 1998). Apresentam atividade analgésica reduzindo a excitabilidade neuronal à medida que se ligam a canais iônicos no sistema nervoso sensorial, reduzindo o influxo de íons e assim a liberação de neurotransmissores excitatórios (JENSEN et al., 2006; KROENKE et al., 2009). O uso desses medicamentos está associado a efeitos colaterais frequentes como gastrintestinais e edema periférico, além de disfunção locomotora e déficits cognitivos em pacientes idosos, e desenvolvimento de tolerância (TOTH, 2010; SABATOWSKI et al., 2004). A associação da gabapentina a outros fármacos com distintos mecanismos de ação tem sido usada na tentativa de se obter resultados complementares e efeito sinérgico (VINIK, 2005; SILVER et al., 2007; HAYASHIDA e EISENACH, 2008). Em um ensaio controlado em pacientes com neuropatia diabética, 60% do grupo tratado com gabapentina apresentou melhora contra 33% dos pacientes que receberam placebo (BACKONJA et al., 1998), indicando que a eficácia da gabapentina na dor neuropática é ainda questionável.

Os agonistas opióides, como a morfina, tramadol e derivados da oxicodona, modulam a dor inibindo a transmissão dolorosa, por ação nos nociceptores periféricos, nos interneurônios e receptores pós-sinápticos medulares, bem como nos sistemas descendentes

inibitórios. O tratamento crônico com analgésicos opióides está associado a uma série de efeitos colaterais, como o desenvolvimento de tolerância, sedação, depressão respiratória, constipação, disfunções hormonais, e até mesmo hiperalgesia paradoxal. A eficácia dos opióides no controle da dor neuropática é apenas parcial, requerendo aumento constante das doses (VADALOUCA et al., 2006; HAYASHIDA et al., 2007). Em uma meta análise comparando o efeito dos opióides a outros fármacos e placebo, observou-se que no grupo que recebeu opióides houve 33% de abandono da terapia, sendo 15% devido à ineficácia no controle da dor e 21% em função dos efeitos colaterais, tendo alguns pacientes reportado ambas as razões (FURLAN et al., 2006).

A natureza multifatorial da dor neuropática e o restrito arsenal farmacológico para seu controle, tornam a terapêutica da neuropatia um desafio clínico (RO e CHANG 2005), visto que apenas cerca de um terço dos pacientes atingem mais de 50% do alívio da dor (JENSEN et al., 2006). Além disso, os fármacos atualmente disponíveis exercem um efeito paliativo sobre a síndrome, não atuando como tratamento capaz de curar ou modificar o padrão da neuropatia (VADIVELU et.al., 2013). Diante disso, o desenvolvimento de tratamentos alternativos mais efetivos e com ação duradoura, que promovam a restituição das funções sensitivas do paciente, se torna de vital importância.

## 2.7 TERAPIA CELULAR E CÉLULAS-TRONCO

Terapia celular é, por definição mínima, a utilização de células com fins terapêuticos. Tem sido considerada uma alternativa terapêutica promissora, apoiada na ação regenerativa ou protetora das células. A proposta é o estabelecimento de melhora da qualidade de vida de indivíduos que sofrem de doenças que não possuem cura descrita e são extremamente debilitantes (LIMA et al., 2009). Os elementos celulares são o ingrediente fundamental das terapias celulares, e entre eles as células-tronco (CT) tem recebido destaque.

O conceito de células-tronco ou células progenitoras foi claramente definido no contexto da regeneração tecidual. Organismos primitivos que possuem uma alta capacidade de regeneração serviram de modelos para a compreensão dos processos morfogenéticos regenerativos (BEKKUM, 2004). A presença de células pluripotentes, com ampla capacidade de reconstituição de novos tecidos, foi visivelmente definida nesses modelos. No fim do século XX, o conceito amplo de CT em animais superiores foi confirmado, e a sua aplicação

em medicina regenerativa abriu novos caminhos para as terapias celulares (BIANCO; ROBEY, 2001; PRENTICE, 2006).

CT, por definição, são células indiferenciadas capazes de autorrenovação por meio de divisões mitóticas assimétricas, em que uma célula segue com eventos de diferenciação e outra com características idênticas à original (MORRISON et al., 1997). A capacidade de autorrenovação e diferenciação aponta o potencial terapêutico das CT, à medida que essas células possibilitam a produção de progenitores diferenciados e coordenam a regeneração tecidual. CT podem ser divididas, em referência ao local de origem, em células-tronco embrionárias (CTE), quando são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário; em células-tronco adultas (CTA) que são aquelas obtidas do indivíduo adulto; e em células-tronco induzidas (iPS), obtidas a partir de reprogramação celular (VOGEL et al., 2000). Em relação ao grau de plasticidade, as células-tronco podem ser classificadas em: CT totipotentes, que originam todos os tipos celulares embrionários e extra embrionários, e que desaparecem poucos dias pós-fertilização; CT pluripotentes, que originam os tipos celulares próprios do embrião apenas; CT multipotentes, aquelas presentes em adultos e que se diferenciam em alguns subtipos de linhagens celulares de forma mais ampla que as unipotentes, que multiplicam apenas um tipo celular maduro (CHOPRA et al., 2013).

Em termos de utilização terapêutica, as CTA são vantajosas por evitar questões éticas e religiosas levantadas com o uso de células-tronco embrionárias, por serem facilmente isoladas de diversos tecidos do indivíduo adulto, por permitirem o transplante autólogo evitando problemas de rejeição imunológica, e por terem baixo potencial tumorigênico em relação às CT embrionárias ou iPS (MARTIN, 1981; SMITH, 2001; RAFF, 2003). Em função dessa série de vantagens, o potencial terapêutico dessas células tem sido amplamente investigado (BLAU et al., 2001), tanto em estudos pré-clínicos quanto em ensaios clínicos.

Uma das fontes mais utilizadas na obtenção de CTA para uso clínico é a medula óssea, que possui CT hematopoiéticas e mesenquimais. As primeiras CTA descobertas e, conseqüentemente, as mais bem caracterizadas, são as hematopoiéticas provenientes da medula óssea. Estas células são capazes de se diferenciar nos constituintes mielóides e linfóides do sangue, representando cerca de 0,01% de todas as células da medula óssea (JONES et al., 2002). CT hematopoiéticas há muito vêm sendo utilizadas com sucesso em transplantes para pacientes com falência medular ou câncer (HIRAO et al., 2004). Uma outra população de CT derivadas da medula óssea, estimadas em 0,001 a 0,01%, são as células mesenquimais (CMsMO) (CASTRO-MALASPINA et al., 1980; PITTENGER et al., 1999;

JONES et al., 2002), ou também chamadas células estromais, da medula óssea. Elas derivam do folheto embrionário intermediário, o mesoderma, responsável pela formação dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (SINGER et al., 2011). Segundo a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT – *International Society for Cellular Therapy*) são requeridas três propriedades-chave para caracterização de células mesenquimais: a capacidade de adesão seletiva das células a superfície plástica de cultivo; a expressão de determinados antígenos de membrana como CD90, CD44 e SCA-1, com baixa frequência de CD45, CD34, CD11b e, por fim, a capacidade de diferenciação em células das linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica após estímulo (HORWITZ et al., 2005).

Desde a identificação e caracterização de CT, suas ações têm sido amplamente investigadas. Apesar da aparente ampla gama de propriedades terapêuticas, os mecanismos envolvidos nessas ações são ainda alvos de controvérsias e muitos estudos. Algumas hipóteses têm sido propostas, entre elas a transdiferenciação, a fusão celular e o efeito parácrino das células. A transdiferenciação refere-se à capacidade da CT de se diferenciar numa célula do tecido. Relaciona células de linhagens diferentes, mas embriologicamente ligadas, seja pela ativação gênica que alteraria a especificidade celular, seja pela desdiferenciação, em que há conversão de um estágio celular maduro para uma célula mais primitiva multipotente, com posterior rediferenciação em um tipo específico (KUHN, 2010). A fusão celular se dá entre células de diferentes linhagens e ocorre quando os marcadores das células do hospedeiro são transferidos para a célula fundida (ACQUISTAPACE et al., 2011). No entanto, parece improvável que o mecanismo de fusão seja responsável pelos efeitos terapêuticos de CT, visto a baixíssima frequência com que esse evento ocorre (SVENDSEN e LANGSTON, 2004).

Inicialmente a ideia de diferenciação celular era bastante aceita para a ação das CTM, contudo, diversos estudos demonstraram em modelos experimentais que a melhoria funcional era dissociada da incorporação da célula transplantada no hospedeiro. Em modelo de infarto do miocárdio, demonstrou-se que os efeitos das CT na melhora da função cardíaca eram muito rápidos, cerca de 72h após o transplante. Em adição, o número de cardiomiócitos provenientes de células-tronco exógenas era demasiadamente baixo para explicar a melhora cardíaca, descartando, dessa forma, o efeito por transdiferenciação (GNECCHI et al., 2005; 2006; NOISEUX et al., 2006; LAFLAMME et al., 2007; LIÃO et al., 2007). Essas observações apontaram para outra vertente, atualmente mais bem aceita, que associa os efeitos terapêuticos de CT à liberação de fatores tróficos no local da lesão. CT atraídas ao sítio de lesão por quimiotaxia são capazes de liberar substâncias que previnem a apoptose, induzem recrutamento e diferenciação de células-tronco do próprio tecido, e modulam a

inflamação provocada pelo dano tecidual (KELLY et al., 2004; MUÑOZ-ELIAS et al., 2004). Essa hipótese, denominada efeito parácrino de CT, tem sido demonstrada em diversos modelos experimentais, como de infarto do miocárdio (DURAN et al., 2013), apoplexia (HORIE et al., 2011), cirrose hepática (MINTZ et al., 2014), lesão de medula espinal (CANTINIEAUX et al., 2013), entre outros.

A partir das evidências do seu potencial neurogênico (DE PAULA et al., 2005), diversos estudos levantaram a possibilidade do uso de CT para tratar doenças degenerativas ou lesões do sistema nervoso (STEMBERGER et al., 2011; HAYASHI et al., 2013; PLUCHINO et al., 2013). O sistema nervoso é um dos sistemas mais complexos do corpo humano, tanto pela estrutura quanto pelas funções. A capacidade de regeneração do tecido nervoso é limitada, mas seus mecanismos de plasticidade podem modificar respostas funcionais e, até mesmo suas propriedades morfológicas, reestabelecendo as funções após lesões. Essa propriedade abre a perspectiva para a utilidade da terapia celular em doenças associadas à lesão do tecido nervoso (OLIVEIRA; SALINA; ANNUNCIATO, 2001). Atualmente, vários tipos de células-tronco têm sido estudadas em modelos animais de enfermidades neurológicas, sendo que a maioria dos resultados são positivos, em termos de segurança e, até mesmo, eficácia terapêutica (OTERO et al., 2009). As evidências na literatura apontam que a liberação dos fatores tróficos por células-tronco induzem modificações reparadoras no tecido nervoso, além de proteger o tecido contra maiores danos (LIMA; GOMES, 2010). O benefício de CMsMO já foi demonstrado em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (HESS et al., 2008) e de lesão do sistema nervoso por isquemia e trauma raquimedular (HIRAO et al., 2004). O tratamento com células-tronco mesenquimais estimula a angiogênese e neurogênese após lesão cerebral (CHOPP e LI, 2002), restabelece a sensibilidade plantar (SYKOVÁ et al., 2006) e promove melhora na atividade motora (HOFSTETTER et al., 2002; WU et al., 2003) após lesão medular em ratos.

Como a dor neuropática está diretamente relacionada à perda da integridade ou função do tecido nervoso, é possível que CT sejam capazes de reduzir os sintomas da neuropatia recuperando a função neuronal. Corroborando essa ideia, efeitos terapêuticos de CT na dor neuropática têm sido demonstrados. Os primeiros estudos que abordaram esse tema demonstraram que em modelos murinos de dor neuropática por lesão mecânica do nervo isquiático, o tratamento com CMsMO previne o aparecimento do comportamento nociceptivo (KLASS et al., 2007; MUSSOLINO et al., 2007). O benefício de CMsMO no controle da neuropatia diabética experimental foi demonstrado pela primeira vez por Shibata e seus

colaboradores em 2008. Dados do nosso laboratório demonstraram que células mesenquimais da polpa do dente induzem efeito antinociceptivo na neuropatia diabética dolorosa experimental (GUIMARAES et al., 2013). Nosso grupo demonstrou também, em modelo de neuropatia diabética, que uma única injeção de CMsMO reverte as complicações sensoriais, além de modificar o padrão espinal de expressão de citocinas e reduzir as alterações morfológicas no nervo periférico, associadas a neuropatia diabética (EVANGELISTA et al., 2014).

Os estudos descritos acima sugerem propriedades analgésicas das CMsMO em condições neuropáticas. Essa propriedade, associada ao potencial dessas células para o reparo do tecido, sugere que a terapia celular é uma promissora abordagem no tratamento de neuropatias. Desta forma, no presente estudo os efeitos do transplante de CMsMO sobre a neuropatia periférica crônica induzida por OXL foram investigados, abordando seus efeitos neuroprotetores em detrimento ao perfil paliativo dos analgésicos clinicamente disponíveis. A ausência de terapêutica eficaz no tratamento da dor neuropática induzida por quimioterápico reforça a relevância deste estudo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais de medula óssea na neuropatia crônica induzida pela quimioterapia com oxaliplatina em camundongos.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(1) Investigar possível efeito antinociceptivo do tratamento com células mesenquimais de medula óssea na dor neuropática comportamental crônica induzida por quimioterapia com oxaliplatina;

(2) Avaliar efeitos da terapia celular quanto a parâmetros estruturais e bioquímicos do nervo periférico;

(3) Comparar os efeitos do tratamento com células mesenquimais de medula óssea aos obtidos do tratamento farmacológico com gabapentina.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, provenientes do Biotério do CPqGM, FIOCRUZ – BA pesando de 20 a 25 gramas com idade entre 30 a 40 dias. Os doadores de medula óssea foram da mesma linhagem, porém transgênicos expressando proteína verde fluorescente em suas células somáticas (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*), sendo detectáveis à técnica de imunofluorescência. Todos os animais foram mantidos em sala climatizada sem restrição hídrica ou alimentar durante todo o período experimental. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA: L-IGM 025/2011) e estão de acordo com o protocolo estabelecido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor para animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). Todos os testes comportamentais foram realizados entre 07:00 e 16:00 horas.

### 4.2 MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA CRÔNICA INDUZIDA POR OXL

O modelo de neuropatia periférica crônica em camundongos foi estabelecido pela administração endovenosa de OXL, duas vezes na semana em dias alternados, durante quatro semanas e meia, totalizando 9 injeções. Inicialmente e antes de qualquer procedimento, os animais foram pesados e tiveram determinados os limiares nociceptivos e a função motora (basais). Uma solução mãe de OXL foi preparada em água destilada (1 mg/ml). No momento da administração a solução mãe foi diluída em solução de dextrose 5%. Após a avaliação do basal os animais iniciaram o ciclo de indução pela injeção repetida de OXL (1mg/kg; 200 µL) através da veia lateral da cauda. Camundongos do grupo controle receberam 9 injeções endovenosas de veículo (dextrose a 5%) em substituição à OXL. Os limiares nociceptivos mecânico e térmico foram acompanhados durante todo o período experimental e o desenvolvimento da neuropatia foi evidenciado pela sua redução.

### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

O período experimental desse estudo foi de 14 semanas, sendo quatro semanas e meia para o ciclo quimioterápico com a OXL (indução do modelo de neuropatia crônica), uma

semana e meia de intervalo para início dos tratamentos, e oito semanas de acompanhamento pós tratamentos. Os animais inicialmente foram pesados e tiveram determinados os basais nociceptivos e motor. Em seguida iniciou-se o ciclo de indução com OXL. Durante todo o período experimental foram realizadas leituras do limiar nociceptivo mecânico e térmico uma vez por semana. Na semana de tratamento com gabapentina (6ª semana) foram realizadas leituras de limiar nociceptivo antes e 3h após a administração do fármaco nesse grupo.

Uma semana e meia após o fim das administrações do quimioterápico (correspondente a sexta semana do período experimental), os animais neuropáticos foram divididos em grupos para receber gabapentina, CMsMO ou veículo. Os cinco grupos experimentais, com *n* variando entre 6 a 8 animais em cada, foram:

- ❖ Controle: camundongos não neuropáticos, que receberam 9 injeções endovenosas de veículo (dextrose a 5%) em substituição à OXL.

- ❖ OXL: camundongos neuropáticos, tratados com OXL, que receberam veículo (200 µL de salina) no lugar de CMsMO. Este grupo foi utilizado como controle do tratamento com CMsMO.

- ❖ CMsMO: camundongos neuropáticos, tratados com OXL, que receberam CMsMO. As células ( $1 \times 10^6$ ) ressuspendidas em 200 µL de solução salina foram administradas por via endovenosa em dose única. Este grupo experimental teve como objetivo avaliar o efeito da terapia com CMsMO na neuropatia quimioterápica crônica.

- ❖ Gabapentina: camundongos neuropáticos, tratados com OXL, que foram tratados com gabapentina. A gabapentina (70 mg/kg) foi administrada por via oral a cada 12 horas por seis dias consecutivos, totalizando 12 administrações por animal. Este grupo experimental teve como objetivo estudar comparativamente o efeito do tratamento farmacológico convencional para dor neuropática e o proposto com CMsMO.

- ❖ Controle da gabapentina: camundongos neuropáticos, tratados com OXL, que receberam veículo (salina) no lugar da gabapentina. Os animais foram tratados com solução salina por via oral a cada 12 horas por seis dias consecutivos, totalizando 12 administrações por animal. Este grupo foi utilizado como controle do tratamento com gabapentina.

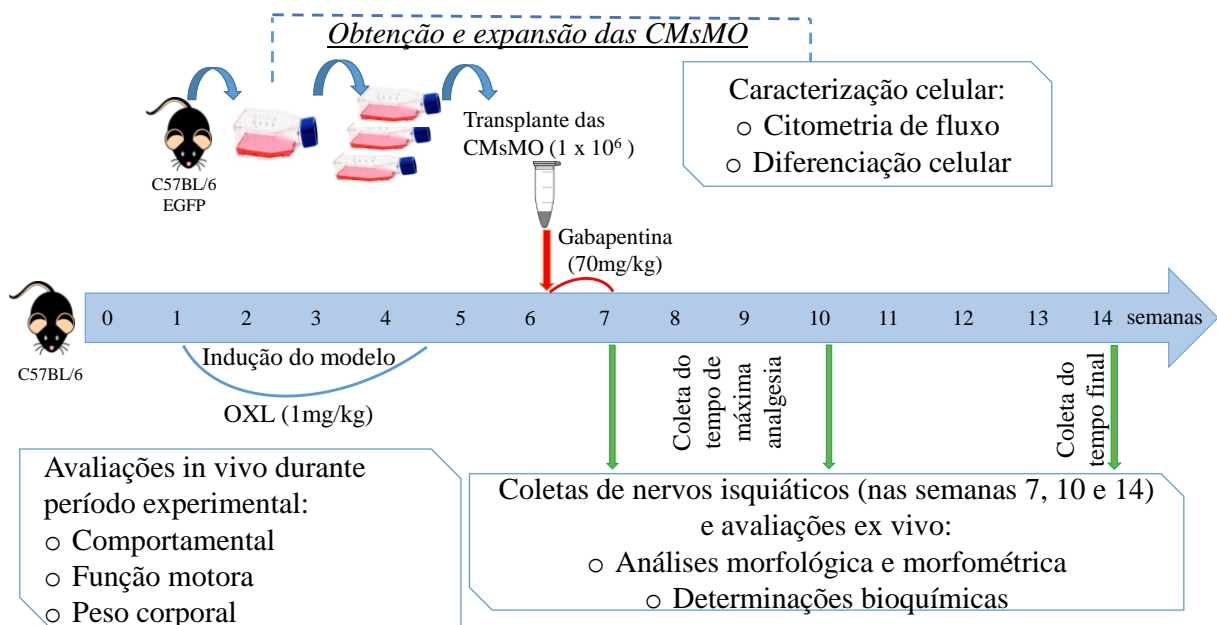
Os efeitos da terapia celular na neuropatia crônica foram investigados sobre a neuropatia comportamental, por meio da avaliação dos limiares nociceptivos térmico e mecânico, sobre alterações estruturais do nervo isquiático, e sobre parâmetros bioquímicos indicativos de estresse oxidativo no nervo isquiático. Essas avaliações tiveram o objetivo de investigar se o tratamento com CMsMO interfere na fisiopatologia da neuropatia, com

possível ação regenerativa ou melhora do ambiente homeostático oxidativo. Para a realização dessas avaliações, os nervos isquiáticos de camundongos dos diferentes grupos experimentais foram coletados em dois tempos:

(i) tempo analgesia: correspondeu ao tempo no qual cada tratamento induziu platô de analgesia, ou seja fim da sexta semana para os grupos tratados com gabapentina e seu controle; décima semana para os grupos tratados com CMsMO e seu controle.

(ii) tempo final (décima quarta semana) com a coleta de todos os grupos descritos e avaliação final do experimento.

Os animais foram profundamente anestesiados via intraperitoneal com 2,2, tribromoetanol (300 mg/kg) e tiveram os nervos isquiáticos coletados por diferentes protocolos para as avaliações microscópicas e bioquímicas, detalhados em itens posteriores. Na figura abaixo segue o detalhamento do desenho experimental para o estabelecimento e acompanhamento da neuropatia crônica por quimioterapia.



**Figura 3. Delineamento experimental.** O desenho mostra o período experimental de 14 semanas, indicando a obtenção e caracterização das CMsMO (linha tracejada em azul), o período de indução do modelo da neuropatia por OXL (linha em azul), Tempos de tratamentos com CMsMO e gabapentina (seta e linha em vermelho), coletas dos nervos isquiáticos (seta em verde) e as análises do estudo (quadrados em azul abaixo). A indução da neuropatia por OXL (1 mg/kg) foi realizada nas 4 e ½ primeiras semanas. Os tratamentos com gabapentina (70 mg/kg) e CMsMO ( $1 \times 10^6$ ) foram realizados na sexta semana, de acordo com os distintos protocolos de administrações. Abaixo, destacado no quadrado a esquerda estão as avaliações feitas *in vivo* durante as 14 semanas (comportamental, função motora e peso corporal) e no quadrado à direita estão as avaliações feitas após o sacrifício dos animais e a coleta dos nervos isquiáticos (morfológica, morfométrica e bioquímica) nos pontos de máxima analgesia e tempo final do experimento. Acima, estão indicados os procedimentos para obtenção, cultivo e caracterização das CMsMO utilizadas para o transplante.

#### 4.4 TESTE NOCICEPTIVO MECÂNICO - FILAMENTOS DE VON FREY

Com o objetivo de avaliar o limiar nociceptivo mecânico, foi realizado o teste com os filamentos de von Frey, que consistem de segmentos de fio de nylon cuja rigidez a tensão é previamente determinada em gramas pelo fabricante (Stoelting). O método de leitura utilizado é denominado *up-and-down*, por considerar um total de seis respostas consecutivas iniciando após o filamento em que o animal muda do comportamento não responsivo, interpretado como não nociceptivo, ao comportamento responsivo, detectado pelo movimento de retirada da pata ou *flinch* (CHAPLAN et al., 1994). Nessa técnica, cada filamento é utilizado por seis segundos e apenas quando o animal está ativo (acordado), com as quatro patas sobre a superfície e o peso do corpo igualmente distribuído.

Inicialmente os camundongos foram postos em caixas de acrílico transparente, elevadas sobre um espelho, com fundo em tela de arame galvanizado que permite acesso a superfície plantar da pata, onde permaneceram por trinta minutos para adaptação. Em seguida, a leitura do limiar nociceptivo foi realizada. O resultado obtido considera o valor logaritmo da força proporcionada pelo último filamento ( $X_f$ ), o valor obtido de acordo com cada padrão de respostas positivas e negativas ( $k$ ) e a média da diferença entre os estímulos em unidades logarítmicas ( $\delta$ ), sendo expresso como 50% do limiar nociceptivo em gramas, ou seja, a força do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações, conforme fórmula a seguir (Chaplan et al., 1994):  $50\% \text{ gramas Limiar} = (10[ X_f + k\delta ] ) / 10.000$

#### 4.5 TESTE NOCICEPTIVO TÉRMICO – COLD PLATE

Com o objetivo de avaliar o limiar nociceptivo a estímulo térmico frio, foi utilizado o teste da placa fria (cold plate, TECA). Nesse teste o limiar nociceptivo é representado pelo número total de comportamentos nociceptivos, conforme descrito por Lauren et al. (2013). Os camundongos foram colocados sobre uma superfície lisa a temperatura controlada em  $-2,5^\circ\text{C}$ , permanecendo por 5 minutos em observação. Foram contabilizados os comportamentos nociceptivos totais como salto, lambida, sacudida e elevação de pata traseira. O aumento do comportamento nociceptivo em relação ao perfil basal dos animais caracteriza o desenvolvimento de hiperalgesia térmica ao frio.

#### 4.6. AVALIAÇÃO MOTORA – ROTA ROD

Com o objetivo de avaliar se a função motora está preservada nos animais neuropáticos e nos diferentes grupos experimentais, foi realizado o teste de rota-rod (Insight), como descrito previamente por KURIBARA et al. (1977). O aparelho consiste em uma barra horizontal rugosa de três cm de diâmetro, localizada a vinte e cinco cm da superfície, subdividida em cinco compartimentos e programada para girar a velocidade constante regulável. Cada animal é colocado sobre a barra girando à 8 RPM, e sua capacidade de permanecer equilibrado sobre a barra é um indicativo da coordenação motora. O teste teve duração total de cento e vinte segundos, durante este período, foi cronometrado o tempo em que o animal permaneceu na barra. Cada animal teve até três tentativas para ultrapassar cento e vinte segundos. Para os animais que caíram, foi calculada a média de permanência nas três leituras e aqueles que alcançaram cento e vinte segundos não foram recolocados no aparelho e este foi considerado o seu tempo de corrida.

#### 4.7 ISOLAMENTO E CULTURA DE CMSMO

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

medula óssea foram cultivadas em frascos de cultura a densidade de  $7 \times 10^6$  células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células não aderentes foram removidas por lavagens em meio DMEM após três dias de cultura. Depois de terem atingido cerca de 80% de confluência, essas células foram “tripsinizadas” e semeadas em novos frascos para expansão. O cultivo celular foi monitorado por microscopia de contraste de fase e o meio trocado três vezes por semana até que a confluência celular tivesse atingido de 80 a 100%. Então, as células foram “tripsinizadas” e centrifugadas a 1500 RPM (806 g) por 10 minutos a temperatura ambiente, contadas em hemocitômetro e preparadas para a administração nos animais. O número de CMsMO administradas em cada animal foi de  $1 \times 10^6$  em solução fisiológica estéril com 10% de heparina. As células foram administradas por via endovenosa na cauda.

#### 4.8 DIFERENCIAÇÃO DE CMsMO

A capacidade de diferenciação das CMsMO nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, foi demonstrada com a utilização de meio suplementado com fatores indutores de diferenciação específicos, obtidos em kits comerciais, na sexta passagem. Para a diferenciação adipogênica, CMsMO foram cultivadas em placas de vinte e quatro poços em meio completo (cento e quatro células/poço). Após atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e substituído por meio de indução adipogênica Stem Pro Adipogenesis Differentiation Kit (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando o microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado com meio completo. Para observar a deposição de gordura, após quinze dias em cultivo, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeído a 4% por quinze minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em álcool 70% por três minutos. Em seguida, foram coradas com solução de *Oil red* por cinco minutos e em seguida lavadas com álcool 70%. As imagens foram capturadas por microscópio AX70 (OLYMPUS) utilizando o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

Para a diferenciação condrogênica, CMsMO foram cultivadas com meio DMEM e 10% SBF em placas de 24 poços em meio completo ( $10^5$  células/poço). Após atingirem 40-50% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas,

durante 21 dias, com meio de diferenciação condrogênica Stem Pro Chondrogenesis Differentiation Kit (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido o grupo controle cultivado em meio completo. Para avaliação da síntese de proteoglicanos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por trinta minutos, lavadas com PBS e coradas com solução de *Alcian Blue* (GIBCO) em HCl 0,1N por trinta minutos. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com solução de HCl 0,1N e, em seguida, adicionado água destilada para a neutralização da acidez. As imagens das células diferenciadas em condrócitos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

Para diferenciação osteogênica,  $5 \times 10^5$  CMsMO foram cultivadas em placa de 24 poços em meio completo. Ao atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas por 14 dias, com meio de diferenciação osteogênica Stem Pro Osteogenesis Differentiation Kit (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada em microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido o grupo controle cultivado em meio completo. A deposição de cálcio foi observada pela coloração com vermelho de Alizarina 2%. Após fixação em paraformaldeído 4% por trinta minutos e lavagem com água destilada, as células foram coradas com solução de vermelho de Alizarina 2% por três minutos e, em seguida, realizadas duas lavagens com água destilada. As imagens das células diferenciadas em osteoblastos e seus controles foram adquiridas utilizando o microscópio AX70 (OLYMPUS) e o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics)

#### 4.9 CITOMETRIA DE FLUXO

Os marcadores característicos de CMsMO foram avaliados por citometria de fluxo. Para isso, CMsMO na sexta passagem, foram “tripsinizadas” e a suspensão celular foi lavada duas vezes com solução salina 0,9%. Uma concentração de  $5 \times 10^5$  de células foi incubada a 4°C por trinta minutos com os seguintes anticorpos na concentração 1/50: Sca1PE-Cy5 (CALTAG), CD90PE (CALTAG, Buntingham, Inglaterra), CD45APC (CALTAG), CD34PE (CALTAG), CD44PE (CALTAG), CD11b (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), CD117PE (BD). Após incubação, foram realizadas mais duas lavagens com solução salina

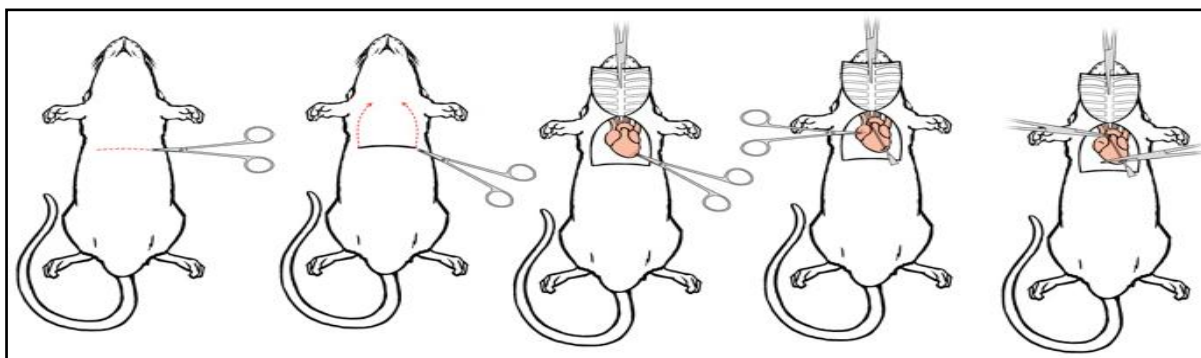
0,9% e, em seguida, realizada a aquisição dos dados e análise no citômetro de fluxo LRSFortessa (BD). Pelo menos 50.000 eventos foram coletados e analisados.

#### 4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

##### 4.10.1 Coleta e processamento do tecido

De acordo com os tempos de coletas já descritos, os camundongos foram profundamente anestesiados, perfundidos e amostras do nervo isquiático (segmento  $\pm 1$  cm) foram coletadas, processadas e submetidas a análise morfológica por microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 2, 2, tribromoetanol (300 mg/kg) e em seguida submetidos à perfusão transcardíaca conforme protocolo descrito por Gage et al (2012). Foi realizada incisão de 5-6 cm lateral, através do tegumento e da parede abdominal, logo abaixo da caixa torácica. Em seguida outra incisão foi feita na altura do diafragma ao longo de todo o comprimento da caixa torácica para expor a cavidade pleural e ter a abertura longitudinal desta, começando pelo processo xifóide, a fim de expor o coração. Uma pequena incisão na extremidade posterior do ventrículo esquerdo foi feita com tesoura, seguida da inserção de agulha de ponta no ventrículo esquerdo, sendo feito simultaneamente um corte na parte superior do átrio direito. Após secção no átrio direito foi injetada uma solução salina 0,9% à temperatura ambiente por cinco minutos com fluxo constante de 4 mL/min, para remover o tecido sanguíneo. Após a circulação da solução salina a perfusão ocorreu com solução fixadora (paraformaldeído - PFA a 4% e glutaraldeído – GA a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4) à temperatura ambiente, por cinco minutos em fluxo de 4 mL/min. O tecido foi considerado com boa perfusão e bem fixado quando ao final do procedimento os órgãos estavam pálidos e rígidos e os vasos livres de sangue.





**Figura 4.** Ilustração de procedimento para perfusão transcardíaca. Da esquerda para direita podemos visualizar o passo a passo da abertura do abdômen, a partir do corte inferior no diafragma e depois longitudinalmente na caixa torácica, começando pelo processo xifóide, a fim de expor o coração. Em seguida são realizados cortes no ventrículo esquerdo para inserção da agulha e no átrio direito. (GAGE et al, 2012)

Após a realização da perfusão foi coletado um segmento de 1 cm do nervo isquiático que foi fixado em solução contendo 2,5% de glutaraldeído (Sigma, USA), tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,4, CaCl 2,5 mM (Sigma, USA) e água destilada por 24 horas a 4°C. No dia seguinte após duas lavagens de 10 minutos cada, com o mesmo tampão os tecidos foram pós-fixados com solução de tetróxido de ósmio 1% (Sigma, USA), ferricianeto de potássio 0,8% (Synth, Brasil), cloreto de cálcio 5 mM e tampão cacodilato por 1 hora em temperatura ambiente e no escuro. As amostras foram novamente lavadas com cacodilato de sódio a 0,1M três vezes, e foi iniciada a desidratação com diferentes concentrações de acetona (30, 50, 70, 90, 100%), 30 minutos em cada gradual. Posteriormente, as amostras foram infiltradas com resina Poly/Bed (Polyscience, Alemanha) por 24 horas em diferentes concentrações da mistura com acetona super seca (2:1, 1:1, 1:2), impregnadas com resina pura, emblocadas e em seguida, polimerizadas em estufa a 60°C durante três dias.

#### 4.10.2 Microscopia óptica

Para análise macroestrutural os blocos contendo amostras do nervo isquiático foram desbastados para retirada do excesso de resina sobre o tecido. Foi feito na extremidade do bloco a forma de um trapézio e a partir daí obtidos cortes semi-finos (1µm) com navalhas de vidro em ultramicrótomo Leica S6E. Os cortes transversais dos nervos foram corados com azul de toluidina (Merk, Inglaterra) diluído em 1% de tetraborato de sódio (Ecibra, Brasil). Para avaliação preliminar da qualidade das amostras foi utilizado o microscópio óptico em aumento 40x.

Na análise morfométrica de fibras mielinizadas foram analisados os seguintes parâmetros no nervo isquiático: número de axônios, densidade de axônios mielinizados, diâmetro médio dos axônios, diâmetro médio das fibras e razão g. Para se obter o número total de axônios foi realizada a soma dos axônios quantificados e a densidade foi calculada dividindo o número total de axônios pela área do nervo transversal ( $n^{\circ}/\mu\text{m}^2$ ). A mensuração do diâmetro médio dos axônios foi resultado da somatória do diâmetro dividido pelo número de axônios, do mesmo modo ocorreu para o cálculo do diâmetro médio das fibras mielínicas. A razão G foi determinada pela razão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra nervosa.

#### **4.10.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Os mesmos segmentos usados para análise na microscopia óptica foram utilizados para a MET, sendo obtidos cortes ultra-finos (70 nm) com navalha de diamante no ultramicrotomo Leica S6E e coletados em grades de cobre. A contrastação foi feita com impregnação de acetato de uranila a 5% e 15% de citrato de chumbo.

A MET foi utilizada para avaliação das fibras C e mitocondrial, e para isto as fotomicrografias foram obtidas em aumento de 4000 $\times$  e 25.000X em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM -1230, como previamente descrito por Flatters e Bennett (2006). As análises foram feitas com o software Image Pro-Premier 9.1 (Media Cybernetics ®). O número total de fibras C foi contado em todo nervo e para isto foi fotografado todo corte transversal em aumento de 4000x e calculada a densidade e a área média dos axônios das fibras C. A densidade foi calculada dividindo o número total de axônios pela área do nervo transversal ( $n^{\circ}/\mu\text{m}^2$ ). O percentual de mitocôndrias foi obtido em fibras A e fibras C, para isto inicialmente foram contabilizadas 60 fibras A e 60 fibras C em cada cada nervo (n=3) e em seguida foi quantificado o número total de mitocôndrias presentes nos dois tipos de fibras. A atipia mitocondrial foi evidenciada pelo aumento do tamanho da organela (comprimento maior que 265 nm), formação de vacúolos maiores que 50% que a área mitocondrial e/ou o acúmulo de material amorfo elétron-denso nos polos da mitocôndria devido a vacuolização. As mitocôndrias atípicas em fibras A e fibras C foram dadas em valor percentual (%).

#### **4.11 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS**

#### **4.11.1 Coleta, preparo do homogenato e quantificação protéica**

Conforme os tempos de coletas (tempo analgesia e tempo final) dos grupos experimentais, os animais foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de 2,2, tribromoetanol (300 mg/kg) e foram coletados os nervos isquiáticos. As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido durante o procedimento de coleta e em seguida armazenadas em freezer -80°C até o momento do ensaio. Os tecidos coletados foram homogeneizados em 100 µL tampão fosfato (pH 7,4) no TissueLyser II (Gentech Bio) por 3 min de modo a obter o homogenato do tecido a 10% (m/v). Para que não houvesse variação da quantidade de proteínas de uma amostra para a outra, foi realizada a dosagem de proteínas totais pelo método de fluorescamina, que foi posteriormente utilizada na normalização dos dados.

#### **4.11.2 Determinação de Nitrito**

Para avaliação dos níveis de nitrito no homogenato de nervo isquiático foi utilizado o método Green et al (1982). Inicialmente, 40 µL de ácido sulfossalicílico a 4% foram utilizados para reagir com 40 µL do homogenato de nervo durante 1h a 4°C. Logo após foi realizada centrifugação desse material por 15 min a 1200g a 4°C, e então foi coletado o sobrenadante formado. O reagente de Greiss (solução 1:1 de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e ácido di-hidroclórico de naftalamina-diamina a 0,1% em água) serviu como indicador dos níveis de nitrito. Para isto foi adicionado 70 µL do reagente de Greiss em 70 µL do sobrenadante e foi realizada leitura da absorbância em 546 nm. O nitrito de sódio foi utilizado para cálculo da curva padrão e os níveis de nitrito na amostra foram expressos em µL/mg de proteína total.

#### **4.11.3 Determinação de Malondialdeído (MDA)**

Foi realizada a avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio, pela dosagem do teor de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBA) no tecido homogeneizado, conforme método de Wills (1965). Esta técnica é bastante utilizada para medir a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos oxidados, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. O ensaio indica o nível de peroxidação lipídica, pela medida indireta da quantidade de malondialdeído (MDA), um subproduto da ação de radicais livres. Para tal, 20 µL de homogenato de nervo isquiático e 20 µL de Tris-HCl 0.02M em pH

6.4 foram incubados a 37°C por 2 horas. Após incubação foi adicionado 40 µL de ácido tricloroacético a 10% seguido de centrifugação a 1000g por 10 min. Para cada 70 µL de sobrenadante 70 µL de ácido tiobarbitúrico a 0,67% foi acrescido, e em seguida os tubos foram mantidos em banho seco a 100°C por 10 min para obtenção da reação colorimétrica. Após resfriamento das amostras, 70 µL de água destilada foi acrescida e a absorbância foi mensurada a 532nm. As substâncias reativas ao TBA foram quantificadas sendo expressas como µmol de MDA / mg de proteína (µmol/mg).

#### 4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DE CMsMO

#### 5.1.1 Citometria de fluxo

A expressão de marcadores de superfície que caracterizam CMsMO foi investigada por citometria de fluxo. A análise dos dados de citometria revelou células com alta expressão de marcadores típicos de CMsMO, como Sca-1, CD44, CD90, CD 29, CD105 e CD 73 além de alta expressão para células GFP e baixa expressão de CD11b, CD45, CD34 e CD117 (tabela 01). As análises foram realizadas na sexta passagem.

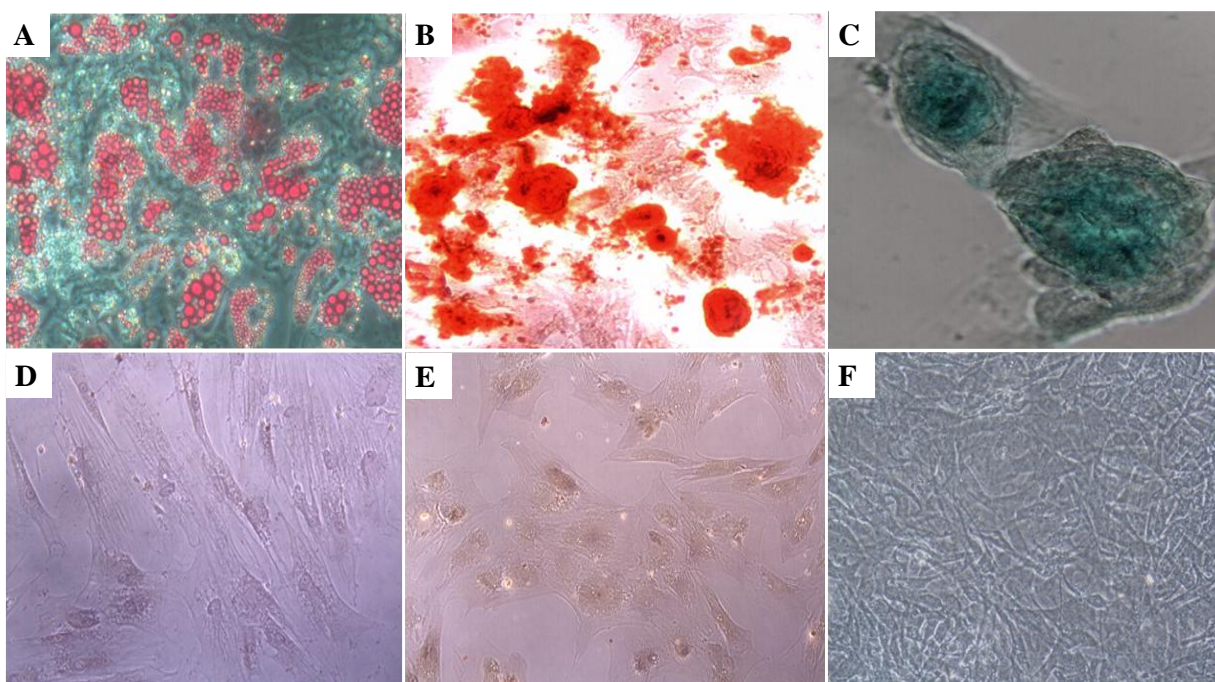
**Tabela 1:** Expressão de marcadores de superfície celular em CMsMO por citometria de fluxo.

<b>Marcador celular (CMsMO)</b>	<b>Células positivas (%)</b>
GFP	97
Sca-1	87,2
CD44	99
CD90	88,5
CD29	99
CD105	96,6
CD73	83
CD117	1,4
CD34	7,9
CD45	0,7
CD11b	1,6

#### 5.1.2 Diferenciação de CMsMO

As culturas de CMsMO foram capazes de se diferenciar *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (figura 5). CMsMO mantidas em contato com meio de diferenciação para linhagem adipogênica, coradas com *oil red*, apresentaram acúmulo intracelular lipídico após quinze dias de cultivo (figura 5A). Em adição, as células estimuladas com meio de diferenciação específico e coradas com vermelho de alizarina apresentaram deposição de cálcio intracelular, característica da linhagem osteogênica (figuras 5B). As

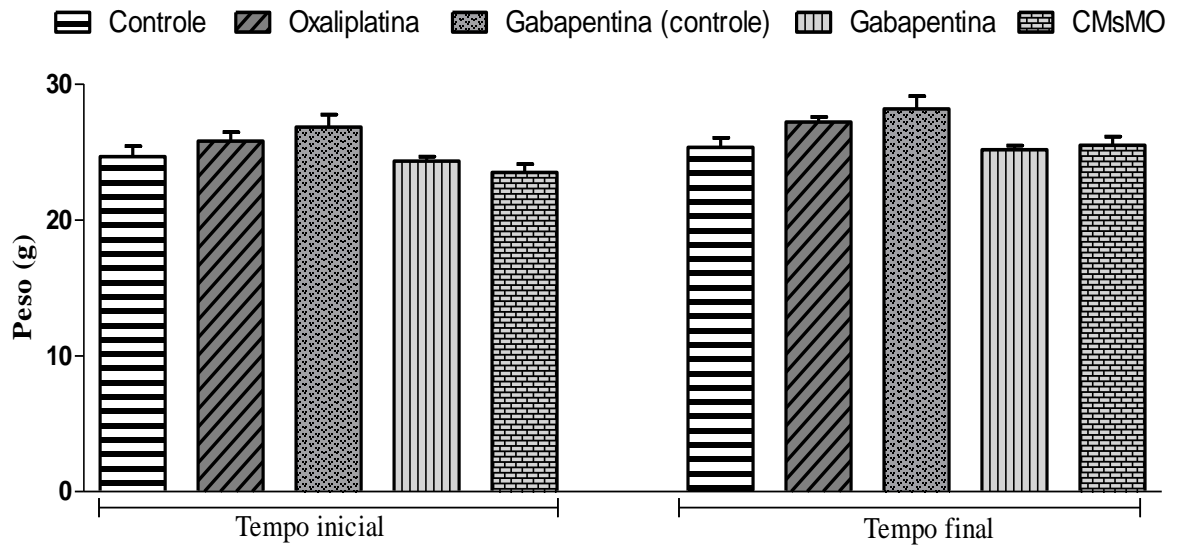
CMsMO submetidas ao contato com meio de diferenciação condrogênica foram coradas com *Alcian blue* 21 dias após o início do estímulo. Nessas células foi evidenciada a presença de proteoglicanos, corados em azul, característicos de condrócitos (figura 5C). CMsMO controle, não estimuladas com os meios de diferenciação para linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica (respectivamente, figuras 5D, 5E e 5F) também foram submetidas à coloração para identificação de linhagem, porém não foi evidenciada diferenciação, permanecendo negativas para os achados típicos das linhagens.



**Figura 5: Cultura de CMsMO em diferenciação em células das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica.** Painel A. Diferenciação adipogênica, presença de acúmulo de lipídios intracelulares corado com *oil red*. Painel D. CMsMO indiferenciadas submetidas a coloração com *oil red*. Painel B. Diferenciação osteogênica, células com acúmulo de cálcio, coradas com alizarina vermelha 2%. Painel E. CMsMO indiferenciadas submetidas a coloração com alizarina vermelha a 2%. Painel C. Diferenciação condrogênica, evidenciada pelo acúmulo de proteoglicanos em células coradas por *Alcian blue*. Painel F. CMsMO indiferenciadas submetidas a coloração por *Alcian blue*. Magnificação 20x, microscopia de contraste de fase.

## 5.2 PESO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA CRÔNICA INDUZIDA POR OXL

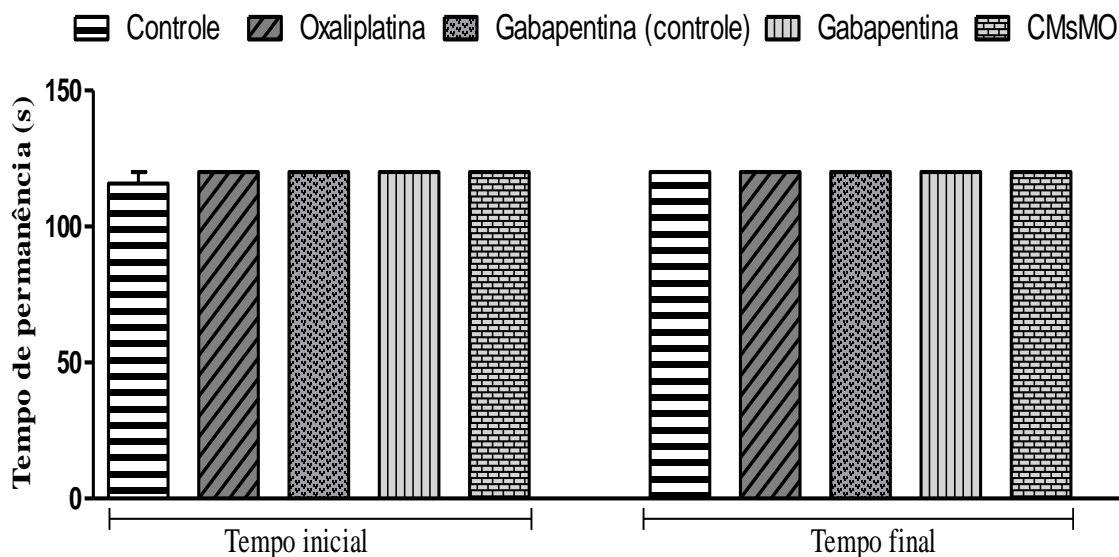
Durante todo o período experimental, o peso corporal dos camundongos foi monitorado e os dados estão representados na figura 6. Não foram verificadas variações estatisticamente significantes do peso corporal, nem entre os grupos experimentais, nem ao longo do experimento.



**Figura 6: Variação do peso corporal dos camundongos no modelo de neuropatia periférica crônica induzida por OXL durante o período experimental.** O tempo inicial corresponde ao fim da primeira semana de indução do modelo, enquanto o tempo final à 14<sup>a</sup> semana do período experimental. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 06$  animais por grupo; One-way ANOVA.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA DOS CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA CRÔNICA INDUZIDA POR OXL

Visando avaliar se o modelo de neuropatia utilizado no presente estudo induz déficit motor, durante as 14 semanas os camundongos foram submetidos ao teste de rota-rod no período experimental. A figura 7 mostra o tempo de permanência em segundos dos animais sobre a barra giratória. Nenhum dos grupos experimentais exibiu alteração do tempo de permanência no aparelho, indicando ausência de déficit motor.

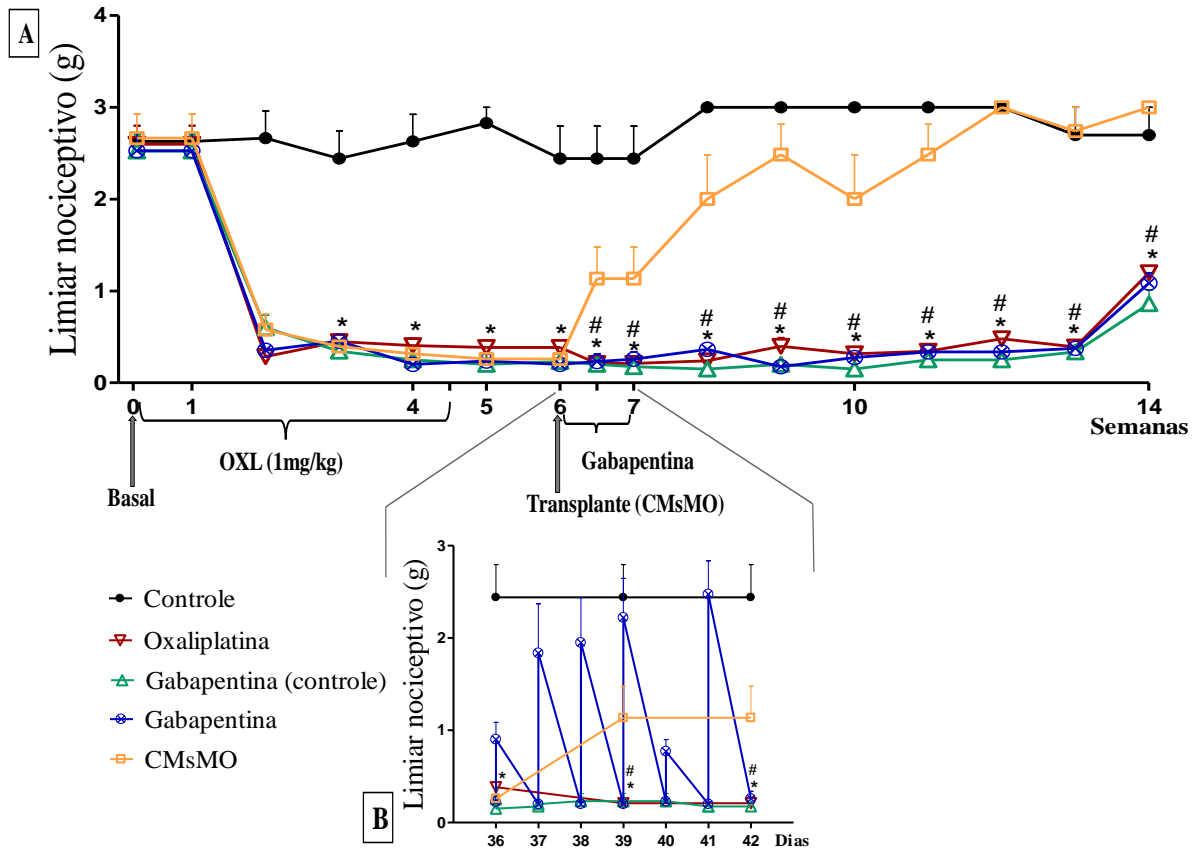


**Figura 7: Avaliação da função motora de camundongos no teste de rota-rod no modelo de neuropatia periférica crônica induzida por OXL durante o período experimental.** O tempo inicial corresponde ao fim da primeira semana de indução do modelo, enquanto o tempo final à 14ª semana do período experimental. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 06$  animais por grupo; One-way ANOVA.

#### 5.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO DE CAMUNDONGOS NEUROPÁTICOS

O limiar de resposta a estímulo mecânico foi avaliado com o objetivo de confirmar o desenvolvimento da neuropatia periférica e avaliar o efeito dos tratamentos. A partir da segunda semana de administração da OXL foi verificada a redução do limiar nociceptivo ao estímulo mecânico ( $p < 0,001$ ; Figura 8A), caracterizando a neuropatia que se manteve durante todo período experimental de 14 semanas. Dez dias após administração única, via endovenosa, de  $1 \times 10^6$  CMsMO foi observado efeito antinociceptivo estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ), que se manteve durante todo período experimental (figura 8A). O tratamento com gabapentina (30 mg/kg) duas vezes ao dia por seis dias consecutivos também induziu efeito antinociceptivo, entretanto esse efeito foi de curta duração ( $p < 0,001$ ) apresentando efeito apenas durante o período de tratamento (figuras 8A e 8B). Os tratamentos com os veículos de CMsMO ou gabapentina não induziram alterações estatisticamente significantes no limiar nociceptivo mecânico.



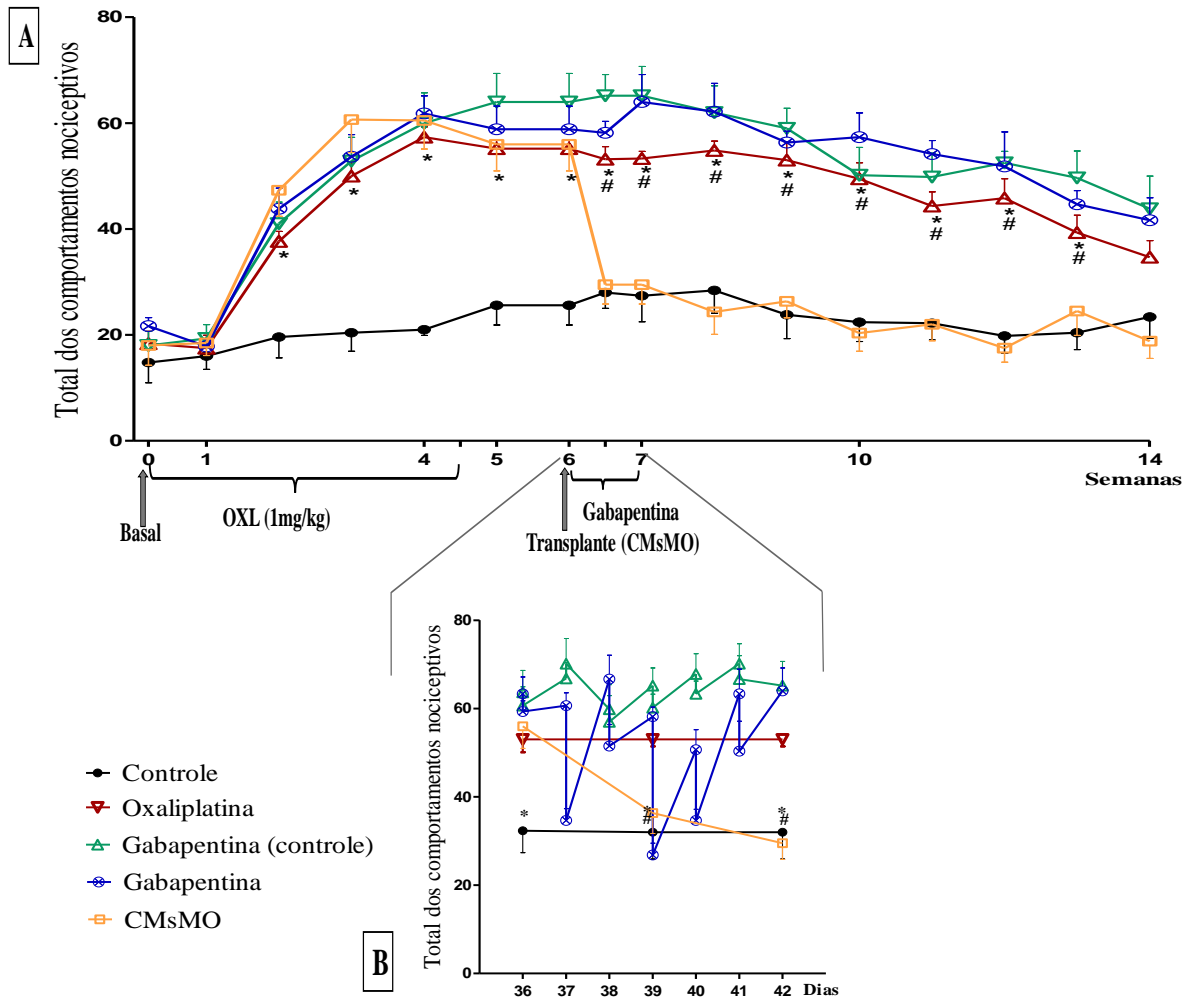


**Figura 8: Efeito dos tratamentos sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos neuropáticos ao longo do período experimental. Painel A:** mostra o limiar nociceptivo mecânico, em semanas, durante o período de indução do modelo de neuropatia. O tempo zero corresponde ao limiar nociceptivo mecânico basal dos camundongos, antes da realização de qualquer procedimento, indicado pela seta (basal). O período de indução do modelo com OXL (1 mg/kg) foi indicado no gráfico nas primeiras quatro semanas e meia com regime dose cumulativa de 9 mg/kg ao total. O grupo controle representa camundongos não neuropáticos, que receberam 9 injeções de veículo (dextrose a 5%) no lugar da OXL. A seta na sexta semana indica o dia do transplante de CMsMO ( $1 \times 10^6$ ; grupo CMsMO) ou seu veículo (grupo OXL), e a chave o período de administração diária de gabapentina (70 mg/kg; grupo gabapentina) ou seu veículo (grupo gabapentina-controle). O eixo x corresponde ao tempo em semanas e o eixo y representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações. **Painel B:** mostra em dias o efeito do tratamento diário com gabapentina sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos neuropáticos na sexta semana. Os dados estão representados como a média de 6 (seis) animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo CMsMO. Teste de two-way ANOVA seguido de Bonferroni.

## 5.5 EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO FRIO DE CAMUNDONGOS NEUROPÁTICOS

O limiar de resposta a estímulo térmico frio foi avaliado com o objetivo de confirmar o desenvolvimento da neuropatia periférica e avaliar o efeito dos tratamentos. Na segunda semana de administração da OXL foi verificado um aumento do total de comportamentos nociceptivo ( $p < 0,001$ ; Figura 9A), caracterizando a neuropatia dolorosa que foi sendo reduzida gradativamente ao longo do tempo mas se manteve estatisticamente significante até

a 13ª semana. Dez dias após administração única, via endovenosa, de  $1 \times 10^6$  CMsMO foi observado efeito antinociceptivo estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ), que se manteve durante todo período experimental (figura 9A). O tratamento com gabapentina (30 mg/kg) duas vezes ao dia por seis dias consecutivos também induziu efeito antinociceptivo, entretanto esse efeito foi de curta duração ( $p < 0,001$ ) apresentando efeito apenas durante o tratamento (figuras 9A e 9B). Os tratamentos com os veículos de CMsMO ou gabapentina não induziram alterações estatisticamente significantes no limiar nociceptivo térmico.

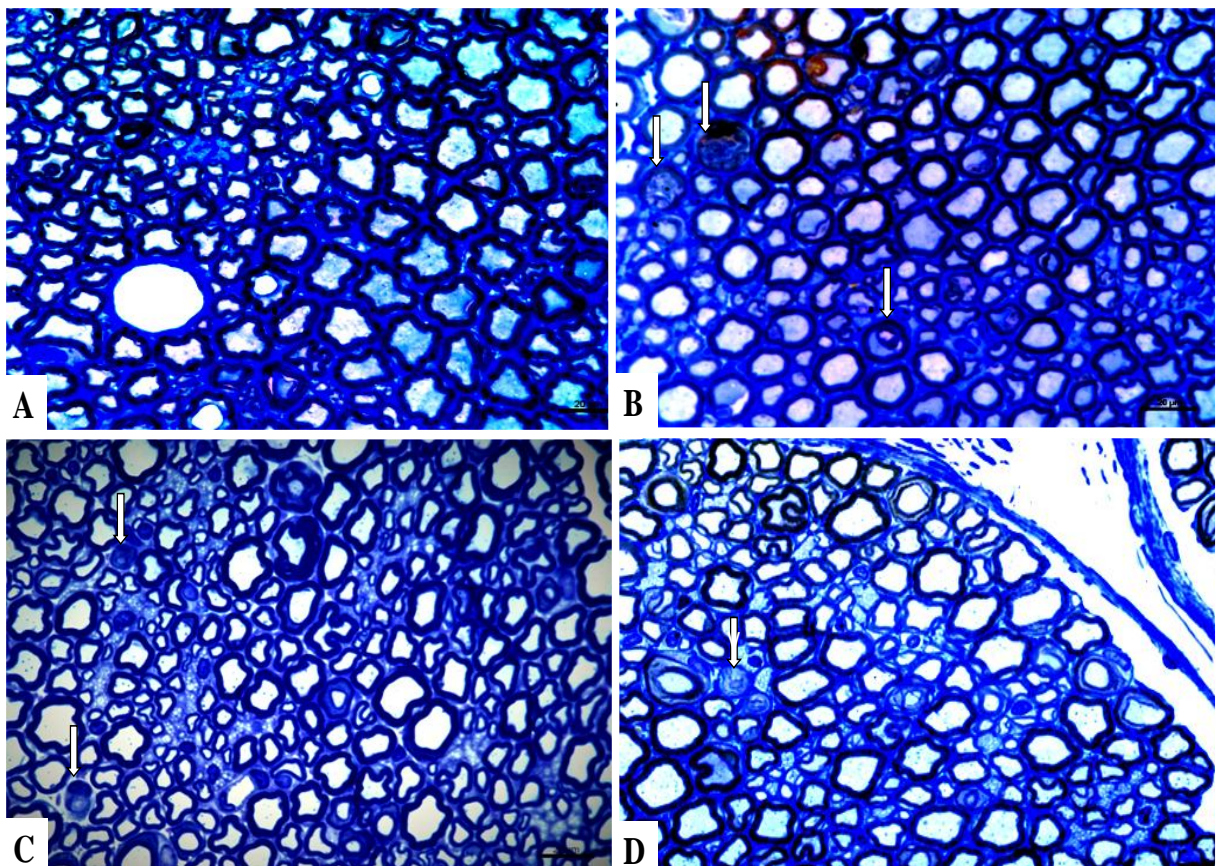


**Figura 9: Efeito dos tratamentos sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos neuropáticos ao longo do período experimental. Painel A:** mostra o limiar nociceptivo térmico, em semanas, durante o período de indução do modelo de neuropatia. O tempo zero corresponde ao limiar nociceptivo térmico basal dos camundongos, antes da realização de qualquer procedimento, indicado pela seta (basal). O período de indução do modelo com OXL (1mg/kg) foi indicado no gráfico nas primeiras quatro semanas e meia com regime dose cumulativa de 9 mg/kg ao total. O início da hiperalgesia térmica ocorre já na segunda semana de tratamento (grupo OXL). O grupo controle representa camundongos não neuropáticos, que receberam 9 injeções de veículo (dextrose a 5%) no lugar da oxaliplatina. A seta na sexta semana indica o dia do transplante de CMsMO ( $1 \times 10^6$ ; grupo CMsMO) ou seu veículo (grupo OXL), e a chave o período de administração diária de gabapentina (70 mg/kg; grupo gabapentina) ou seu veículo (grupo gabapentina-controle). O eixo x corresponde ao tempo em semanas e o eixo y representa o número total de comportamentos nociceptivos. **Painel B:** mostra em dias o efeito do tratamento gabapentina sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos neuropáticos na sexta semana. Os dados estão representados como a média de 6 (seis) animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo CMsMO. Teste de two-way ANOVA seguido de Bonferroni.

## 5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CMsMO SOBRE PARÂMETROS ESTRUTURAIS DO NERVO ISQUIÁTICO

### 5.6.1 Morfologia de fibras A

A análise histológica de cortes transversais de segmentos do nervo isquiático foi realizada em microscópio de luz e as imagens mostram alguns vestígios de degeneração axonal nos animais neuropáticos. A figura 10 apresenta os aspectos morfológicos dos grupos controle (não neuropático), OXL (neuropático + salina), gabapentina (neuropático + gabapentina) e CMsMO (neuropático + CMsMO) e em fotomicrografias obtidas do microscópio de luz. Observamos o aspecto morfológico normal do grupo controle, onde nota-se a presença de axônios mielinizados de calibres variáveis, contorno regular, bainhas de mielina íntegras e com espessura proporcional ao diâmetro dos respectivos axônios de grosso calibre (figura 10A). Nos grupos OXL, gabapentina e CMsMO evidenciamos vestígios de degeneração axonal em fibras mielínicas (figura 10B, 10C e 10D, respectivamente).



**Figura 10:** Fotomicrografias de nervos isquiáticos dos grupos experimentais (OXL, controle, gabapentina e CMsMO) para avaliação histológica das fibras mielínicas. A) Controle, grupo recebeu apenas veículo da OXL e apresenta características morfológicas normais; B) OXL, neuropáticos tratados com salina; C) gabapentina, neuropáticos tratados com gabapentina; e D) CMsMO, neuropáticos tratados com CMsMO. Em B, C e D observamos vestígios de degeneração axonal nas fibras mielínicas (setas); Coloração: azul de toluidina, barra = 20 $\mu$ m.

### 5.6.2 Morfometria de fibras A

Os dados referentes à análise morfométrica das fibras mielínicas do nervo isquiático de camundongos dos diferentes grupos experimentais estão representados nas figuras 11 à 13 no tempo de máxima analgesia e tempo final. Na figura 11 estão representados o número (painéis A e B) e densidade (painéis C e D) de axônios mielinizados. Com relação à esses parâmetros, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos. Na figura 12 apresentamos morfometria com os parâmetros de diâmetro médio dos axônios (painéis A e B) e diâmetro médio das fibras mielínicas (painéis C e D). Nenhuma diferença foi encontrada com relação aos diâmetros médios dos grupos avaliados. A figura 13 mostra nos painéis A e B a relação entre o diâmetro médio do axônio e o diâmetro da fibras (razão g), para verificação de desordens mielínicas. Para esta avaliação da mielina também não houve diferença entre os grupos estudados.

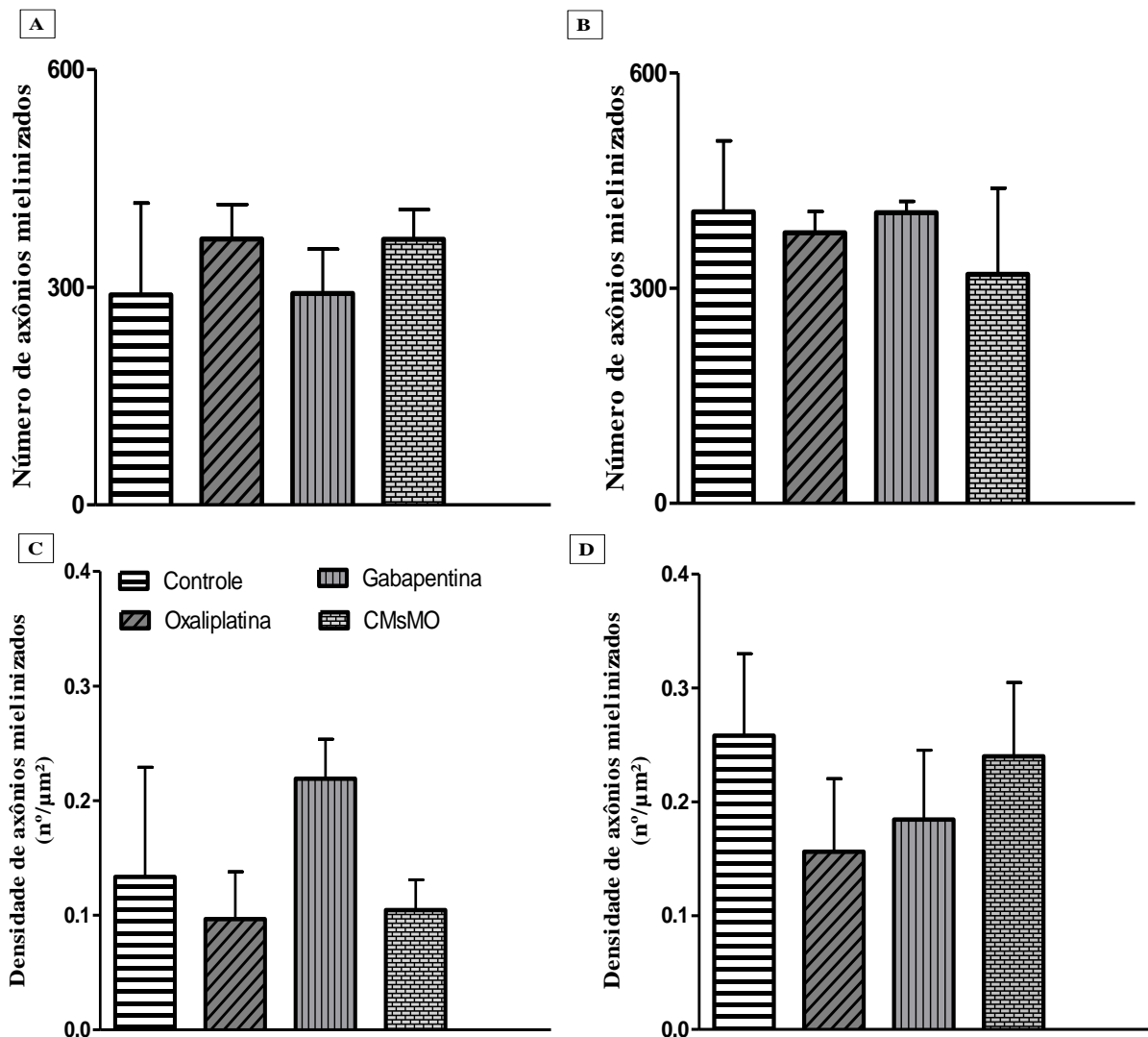
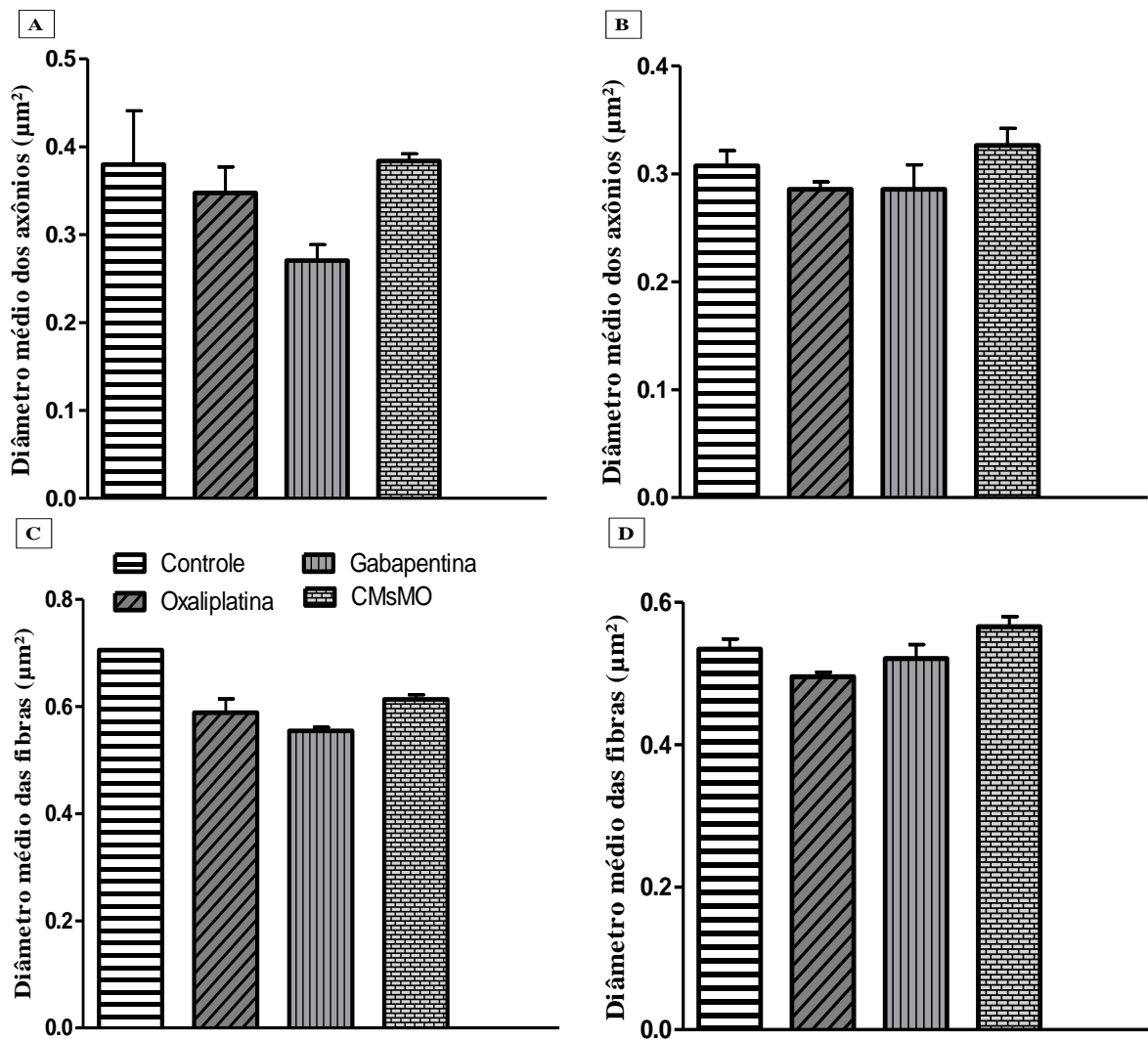
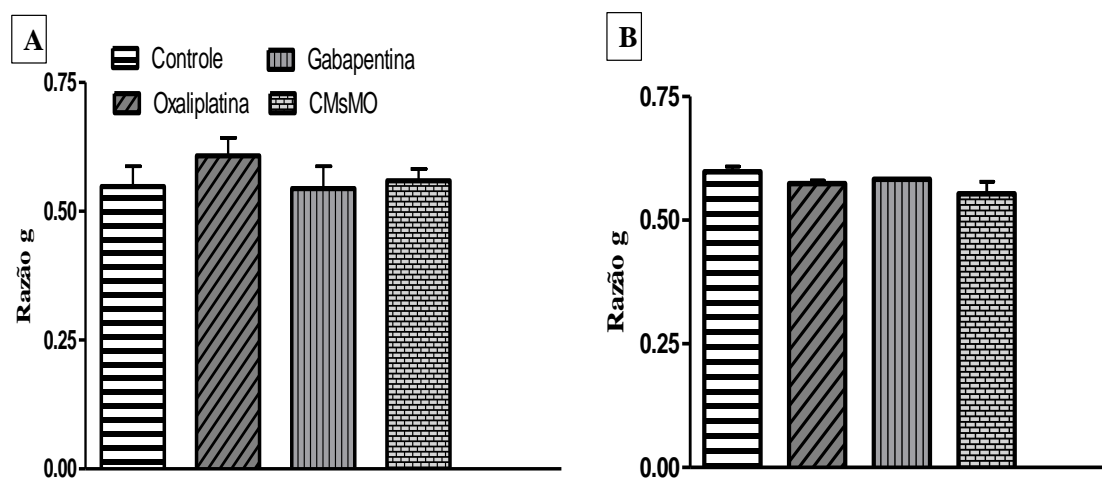


Figura 11: Número e densidade de axônios mielinizados no nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia crônica por OXL. A) Número dos axônios mielinizados no tempo de máxima

analgesia; B) número dos axônios mielinizados no tempo final (14 semanas); c) densidade dos axônios mielinizados no tempo de máxima analgesia; D) densidade dos axônios mielinizados no tempo final. O grupo controle recebeu apenas veículo da OXL e representa animais não neuropáticos; grupo oxaliplatina representa animais neuropáticos tratados com salina; grupo gabapentina representa animais neuropáticos tratados com gabapentina; grupo CMsMO representa animais neuropáticos tratados com CMsMO. Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 03$  animais. Análise estatística determinada pelo teste de Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunns.



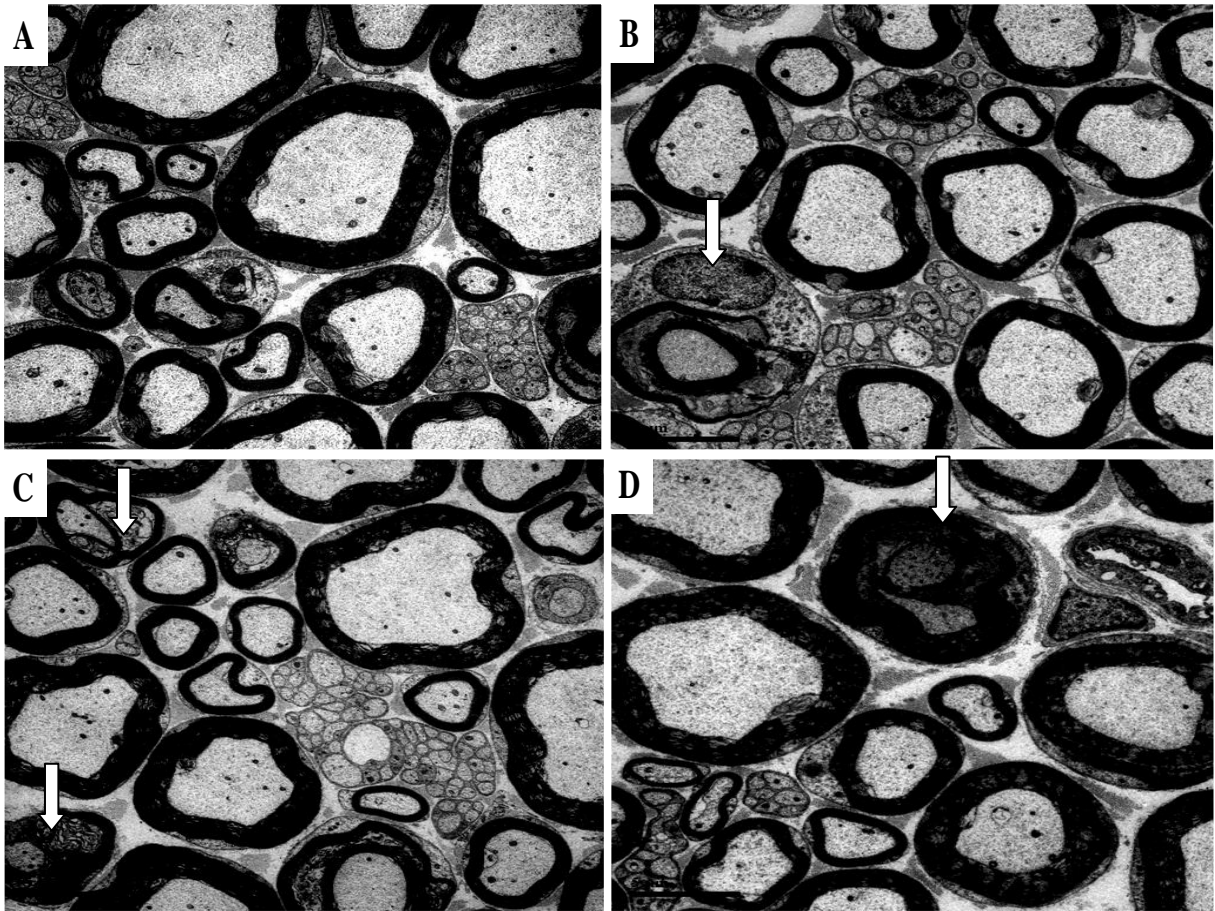
**Figura 12: Parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia por OXL, avaliação dos diâmetros dos axônios e das fibras mielínicas no tempo de máxima analgesia e tempo final.** A) Diâmetro médio dos axônios mielinizados no tempo de máxima analgesia; B) Diâmetro médio dos axônios mielinizados no tempo final; c) Diâmetro médio das fibras mielínicas no tempo de máxima analgesia; D) Diâmetro médio das fibras mielínicas no tempo final. O grupo controle recebeu apenas veículo da OXL e representa animais não neuropáticos; grupo oxaliplatina representa animais neuropáticos tratados com salina; grupo gabapentina representa animais neuropáticos tratados com gabapentina; grupo CMsMO representa animais neuropáticos tratados com CMsMO. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 03$  animais. Análise estatística determinada pelo teste de Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunns.



**Figura 13: Parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia por OXL, avaliação da razão g (diâmetro do axônio/diâmetro da fibra) no tempo de máxima analgesia e tempo final.** A) Razão g das fibras mielínicas no tempo de máxima analgesia; B) Razão g das fibras mielínicas no tempo final. O grupo controle recebeu apenas veículo da OXL e representa animais não neuropáticos; grupo oxaliplatina representa animais neuropáticos tratados com salina; grupo gabapentina representa animais neuropáticos tratados com gabapentina; grupo CMsMO representa animais neuropáticos tratados com CMsMO. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 03$  animais. Análise estatística determinada pelo teste de Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunns.

### 5.6.3 Morfologia de fibras C

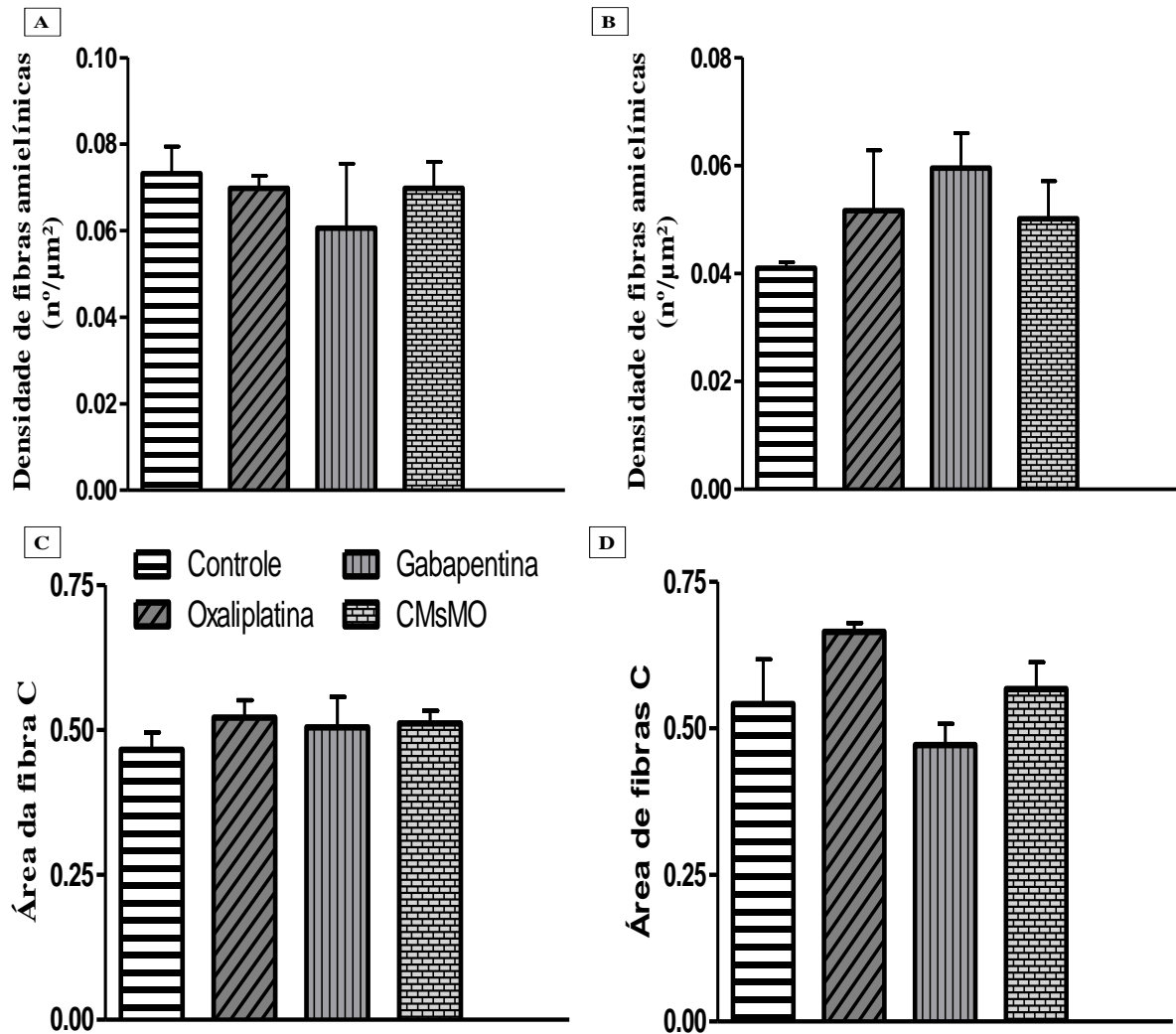
A microscopia eletrônica de transmissão realizada com os nervos isquiáticos mostrou a disposição normal das fibras amielínicas e evidenciou com maiores detalhes as características já descritas na avaliação histológica das fibras mielínicas. A figura 14 apresenta aspectos morfológicos dos grupos controle (não neuropático), OXL (neuropático + salina), CMsMO (neuropático + CMsMO) e gabapentina (neuropático+gabapentina) em eletromicrografias. A figura 14A mostra a eletromicrografia referente ao grupo controle, com axônios das fibras mielínicas envoltos pela bainha de mielina íntegra e com a espessura de mielina proporcional ao calibre da fibra. Nota-se também a presença de numerosas fibras amielínicas distribuídas homogeneamente no espaço endoneural. Nas figuras 14B, C e D estão representados respectivamente os grupos OXL, gabapentina e CMsMO, nos quais são observadas a presença de fibras mielínicas de grande calibre com aparente degeneração axonal e fibras amielínicas sem qualquer modificação detectável nessa técnica.



**Figura 14: Eletromicrografias de nervos isquiáticos dos grupos experimentais (OXL, controle, gabapentina e CMsMO) para avaliação ultraestrutural.** A) Controle, grupo recebeu apenas veículo da OXL e apresenta características morfológicas normais; B) OXL, neuropáticos tratados com salina; C) gabapentina, neuropáticos tratados com gabapentina; e D) CMsMO, neuropáticos tratados com CMsMO. Em B, C e D observamos vestígios de degeneração axonal vistos em fibras mielínicas (seta); barra = 5µm.

#### 5.6.4 Morfometria de fibras C

Os dados referentes à análise morfométrica das fibras C do nervo isquiático de camundongos dos diferentes grupos experimentais estão representados na figura 15 no tempo de máxima analgesia e no tempo final. Na figura 15 estão representadas a densidade (painéis A e B) e a área (painéis C e D) das fibras C, dispostas em cortes transversais de nervos isquiáticos. Não houve diferença estatística entre os grupos para nenhum dos parâmetros morfométricos de fibras amielínicas, indicando que não há degeneração axonal das fibras amielínicas dos animais neuropáticos em relação aos animais não neuropáticos.



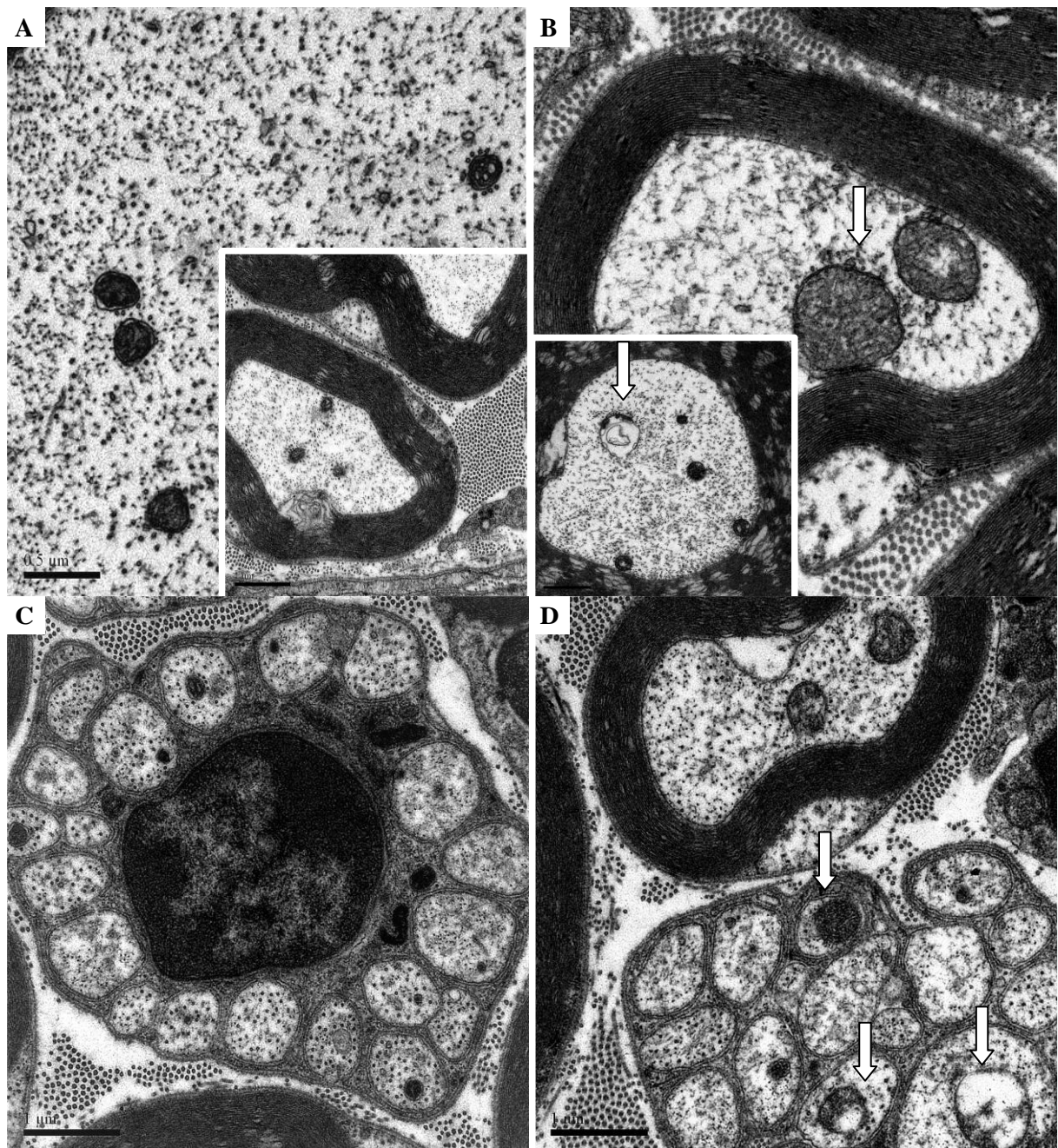
**Figura 15: Parâmetros morfométricos do nervo isquiático de camundongos em modelo experimental de neuropatia por OXL, avaliação da densidade e da área das fibras C no tempo de máxima analgesia e tempo final.** A) Densidade das fibras C no tempo de máxima analgesia; B) Densidade das fibras C no tempo final; c) Área da fibra C no tempo de máxima analgesia; D) Área da fibra C no tempo final. O grupo controle recebeu apenas veículo da OXL e representa animais não neuropáticos; grupo oxaliplatina representa animais neuropáticos tratados com salina; grupo gabapentina representa animais neuropáticos tratados com gabapentina; grupo CMsMO representa animais neuropáticos tratados com CMsMO. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, para  $n = 03$  animais. Análise estatística determinada pelo teste de Kruskal Wallis seguido de pós-teste de Dunns.

### 5.6.5 Morfologia e morfometria mitocondrial

A avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão permitiu a investigação dos aspectos morfológicos e morfométricos de mitocôndrias em fibras mielínicas e amielínicas do nervo isquiático dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. Os aspectos morfológicos atípicos foram evidenciados em comparação a parâmetros pré-estabelecidos como normais (FLATTERS et al., 2006) (figura 16). As mitocôndrias normais em fibras A (painel A) e fibras C (painel C) apresentaram duplas membranas e cristas



mitocondriais íntegras, comprimento mitocondrial dentro dos valores normais (165 - 265 nm) e vacúolos, quando presentes, menores que 50% da área da mitocôndria. As mitocôndrias atípicas em fibras A (painel B) e em fibras C (painel D) foram evidenciadas pelo aumento do tamanho da organela (comprimento maior que 265 nm), formação de vacúolos maiores que 50% que a área mitocondrial e/ou o acúmulo de material amorfo elétron-denso nos polos da mitocôndria devido a vacuolização.

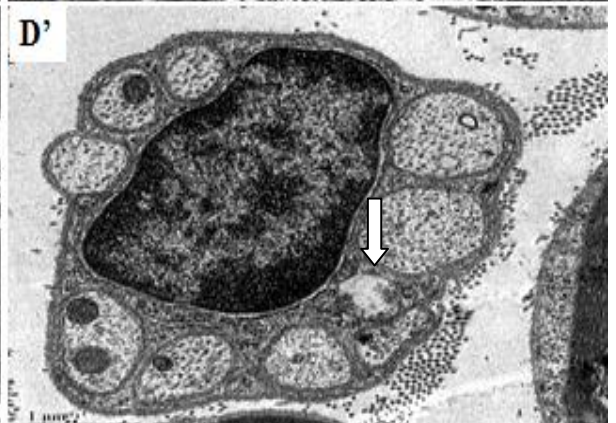
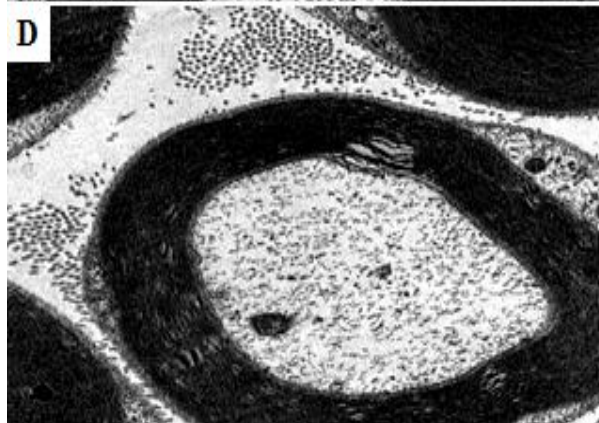
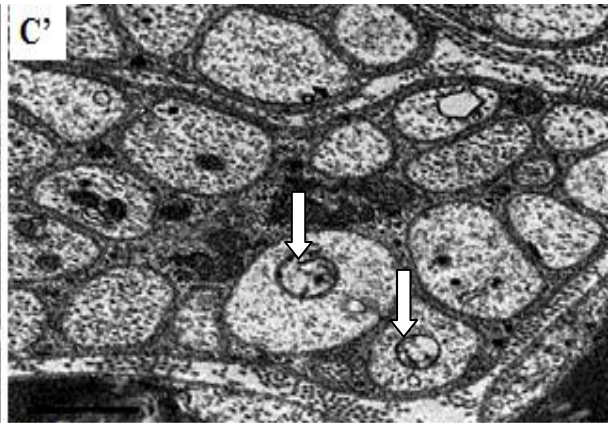
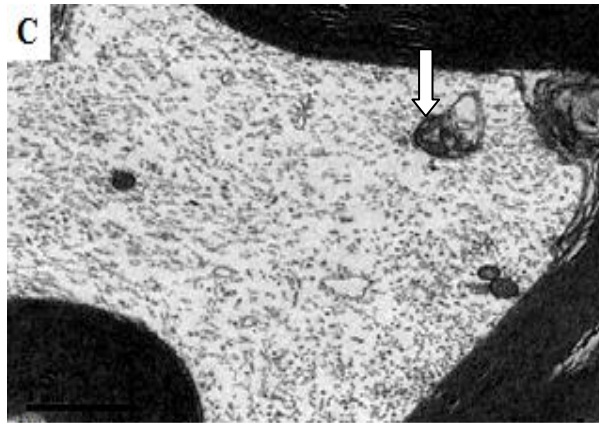
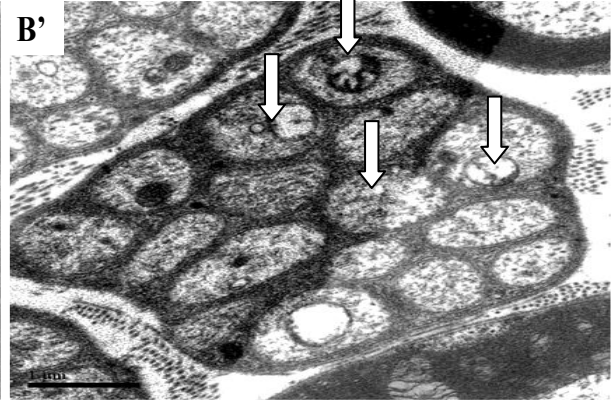
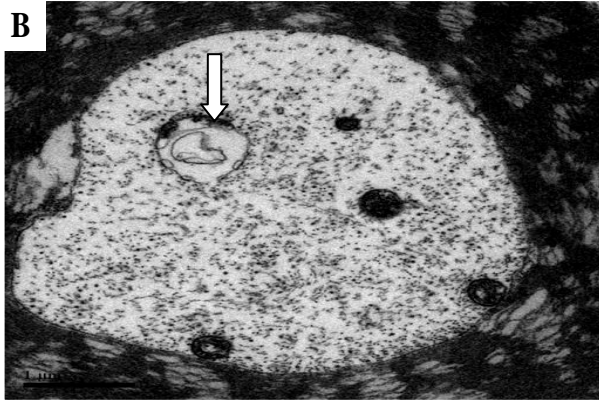
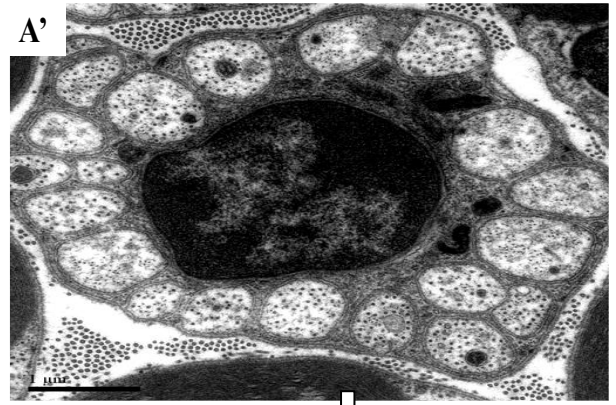
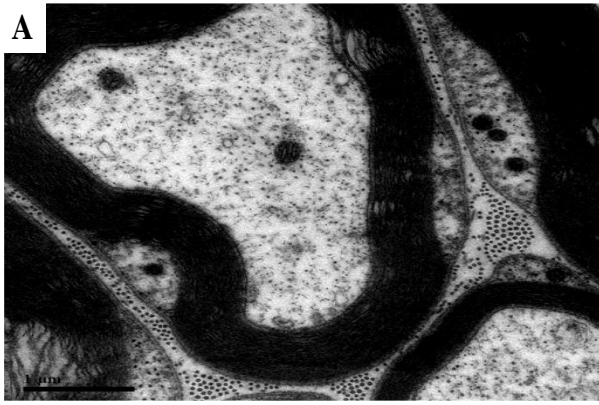


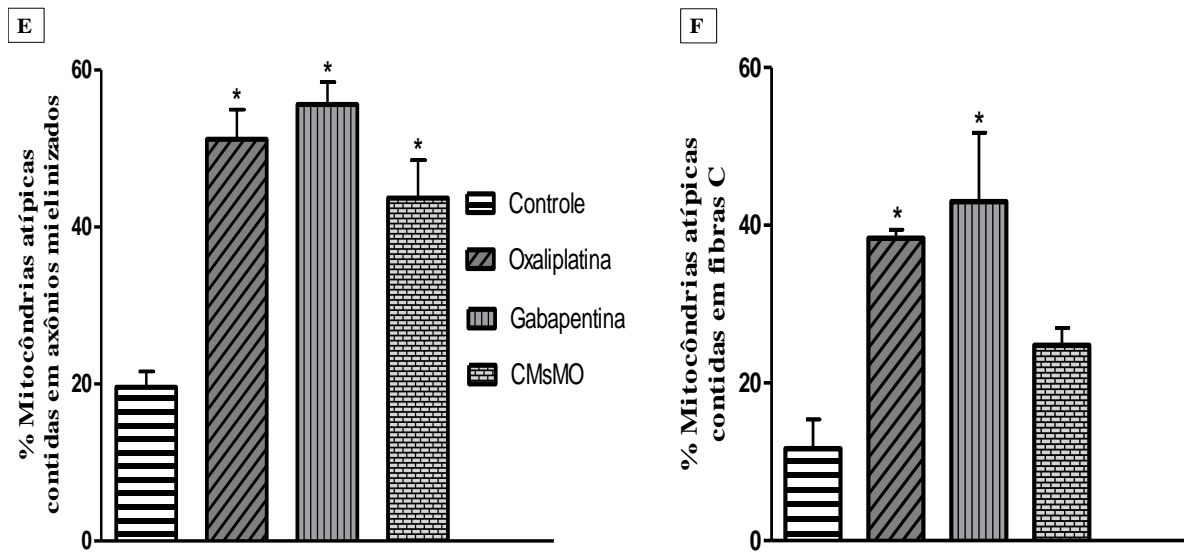
**Figura 16: Mitocôndrias normais e atípicas em fibras mielínicas e amielínicas de nervos isquiáticos.** As mitocôndrias normais estão caracterizadas pela integridade da dupla membrana e material eletron-denso em cristas mitocondriais presentes no citoplasma da organela em fibras A (painel A) e em fibras C (painel C). As mitocôndrias atípicas (painéis B e D) estão evidenciadas pelo aumento do tamanho (setas) e vacuolização que promove o afastamento de material amorfo para os polos das mitocôndrias (inset e setas). Em B atípicas

mitocondriais de fibras mielínicas e em D atipias mitocondriais em fibras C. Barra = 1 $\mu$ m (C e D) e 0,5  $\mu$ m (A e B).

Foram avaliadas mitocôndrias (n=3) de fibras A e fibras C dos grupos controle (não neuropáticos + salina); OXL (neuropáticos + salina); gabapentina (neuropático + gabapentina); CMsMO (neuropático + CMsMO), no tempo de máxima analgesia. As análises mitocondriais indicaram a presença de atipias em axônios mielinizados e não mielinizados de todos os grupos experimentais (Figura 17), entretanto, a proporção de mitocôndrias atípicas em nervos de animais neuropáticos é estatisticamente maior do que em animais não neuropáticos. O tratamento crônico com OXL provocou um aumento de 31,5% e 26,70% na incidência de mitocôndrias vacuolizadas e de tamanhos aumentados em fibras A (painel E) e em fibras C (painel F), respectivamente, em relação ao controle.

Em fibras A os tratamentos com gabapentina e CMsMO não modularam as alterações mitocondriais detectadas em animais neuropáticos (painel E). Por outro lado, em fibras C o tratamento com CMsMO reduziu a atipia mitocondrial em animais neuropáticos para níveis estatisticamente similares ao dos não neuropáticos (painel F).



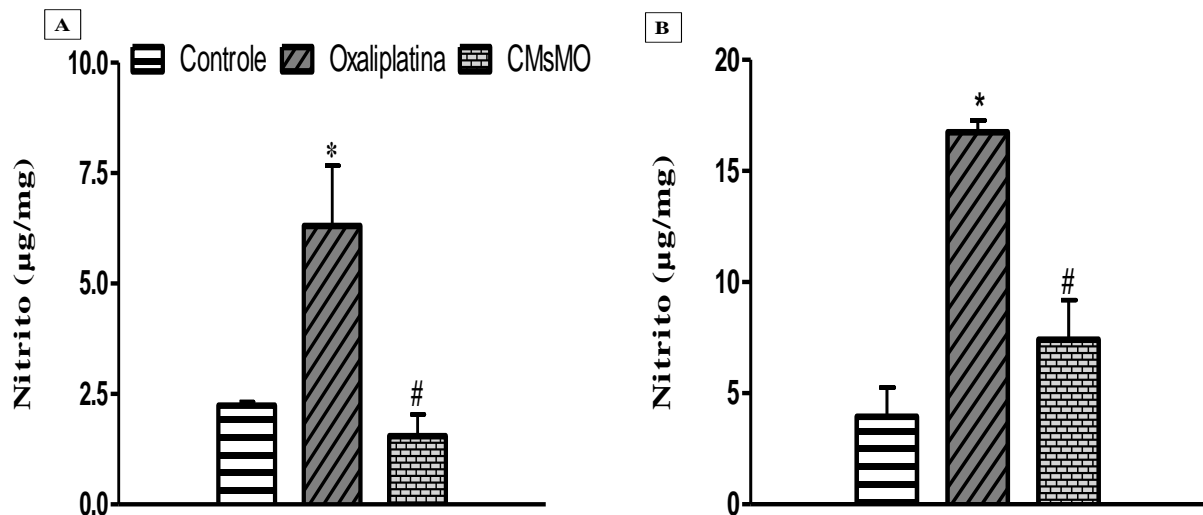


**Figura 17: Quantificação de mitocôndrias atípicas em nervos isquiáticos de camundongos em modelo de neuropatia crônica por OXL.** Em A, eletromicrografia do grupo controle mostrando axônios mielinizados (A) e não mielinizados (A') com mitocôndrias normais; Em B, C e D, respectivamente, imagens representativas dos grupos OXL, gabapentina e CMsMO, mostrando mitocôndrias vacuolizadas e de tamanhos aumentados (setas); as mitocôndrias atípicas foram observadas em axônios mielinizados (B, C, e D) e axônios não mielinizados (B', C' e D'), no tempo de máxima analgesia. Barra = 1  $\mu$ m. O percentual de mitocôndrias atípicas em axônios de fibras A (painel E) e C (painel F) de camundongos nos diferentes grupos experimentais foi calculado a partir desses parâmetros de alteração. Eixo y mostra o percentual de mitocôndrias atípicas. Os dados estão representados como a média de 3 (seis) animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle. Teste de one-way ANOVA seguido de Tukey.

## 5.7 DOSAGENS BIOQUÍMICAS NO NERVO ISQUIÁTICO

### 5.7.1 Nitrito

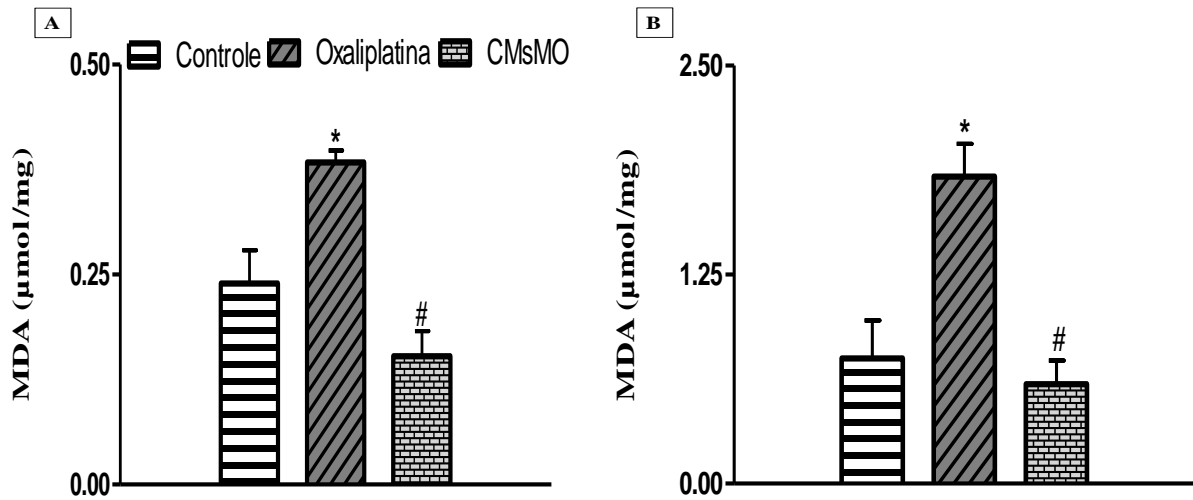
Os níveis de nitrito no nervo isquiático, indicativos de estresse nitrosativo, foram avaliados em camundongos com neuropatia induzida pela OXL tratados ou não com CMsMO, nos tempos de analgesia (Figura 18A) e final (Figura 18B). Os níveis de nitrito no nervo isquiático de animais neuropáticos foram estatisticamente maiores do que naqueles não neuropáticos ( $p < 0,05$ ). O tratamento com CMsMO reduziu os níveis de nitrito no nervo isquiático dos animais neuropáticos para níveis equivalentes aos de camundongos não neuropáticos ( $p < 0,05$ ). O mesmo perfil de efeitos foi observado no tempo de analgesia e no tempo experimental final.



**Figura 18: Efeito do tratamento com CMsMO sobre os níveis de nitrito em nervos isquiáticos de camundongos neuropáticos.** Os níveis de nitrito foram avaliados nos tempos analgesia (painel A) e final (painel B). Os grupos avaliados foram: controle (não neuropático), OXL (neuropático+salina) e CMsMO (neuropático+CMsMO). O eixo y mostra os níveis de nitrito ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) nos nervos isquiáticos. Os dados estão representados como a média de 4 animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo OXL. Significância estatística determinada por teste de one way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey.

### 5.7.2 Malondialdeído (MDA)

O ensaio de dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizado para indicar o nível de peroxidação lipídica, pela medida indireta da quantidade de malondialdeído (MDA) presente em amostras de nervos isquiáticos dos camundongos. Os níveis de MDA no nervo isquiático foram avaliados em camundongos com neuropatia induzida pela OXL tratados ou não com CMsMO (Figura 19). Tanto no tempo analgesia quanto no tempo final, os níveis de MDA no nervo isquiático foram estatisticamente maiores em animais neuropáticos em relação aos não neuropáticos (grupo controle,  $p < 0,05$ ). Os animais neuropáticos tratados com CMsMO apresentaram redução dos níveis de MDA no nervo em relação aos animais neuropáticos não tratados ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19: Efeito do tratamento com CMsMO sobre os níveis de MDA em nervos isquiáticos de camundongos neuropáticos.** Os níveis de MDA foram avaliados nos tempos analgesia (painel A) e final (painel B). Os grupos avaliados foram: controle (não neuropático), OXL (neuropático+salina) e CMsMO (neuropático+CMsMO). O eixo y mostra os níveis de MDA (µg/mg) nos nervos isquiáticos. Os dados estão representados como a média de 4 animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo OXL. Significância estatística determinada por teste de one way ANOVA seguida do pós-teste de Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

A neuropatia periférica induzida por OXL é o efeito colateral dose limitante ao tratamento de diversas neoplasias com esse quimioterápico, e a baixa eficácia dos tratamentos farmacológicos nessa neuropatia representa um obstáculo a prática clínica. No presente trabalho, a partir de estudo em modelo animal crônico, avaliamos os efeitos do transplante de CMsMO na neuropatia por OXL, comparando seus efeitos aos do tratamento farmacológico convencional com gabapentina. O modelo experimental de neuropatia induzida por OXL foi capaz de reproduzir as manifestações clínicas dessa síndrome, caracterizada por hiperalgesia térmica ao frio e alodinia mecânica. O tratamento com CMsMO em dose única reverteu essas alterações de sensibilidade, como demonstrado pelo retorno ao padrão normal de resposta comportamental nos testes nociceptivos. Dando suporte ao efeito antinociceptivo duradouro observado, CMsMO reduziram uma alteração estrutural no nervo isquiático determinante de neuropatia, que é o aumento de mitocôndrias atípicas nas fibras nociceptivas. Em adição, o tratamento com CMsMO reduziu o nível de produtos de estresse oxidativo no nervo isquiático dos animais neuropáticos. Esses resultados apontam CMsMO como uma alternativa promissora na terapêutica da neuropatia quimioterápica refratária.

A neuropatia crônica por OXL ocorre em torno de 10 a 20% dos pacientes quando em doses maiores que 750 - 850 mg/m<sup>2</sup> (ARGYRIOU et al., 2008) e tem as manifestações clínicas sensitivas como fator redutor da tolerabilidade ao tratamento e da qualidade de vida dos pacientes. Normalmente, a neuropatia quimioterápica apresenta-se em pacientes como sintomas sensoriais com distribuição nos pés e mãos (BOLAND et al., 2010) que são comumente relatados por parestesia, disestesia, alodinia e hiperalgesia (BOLAND et al., 2010), resultando em uma condição tão dolorosa, ou ainda mais dolorosa, do que a dor inicial do câncer (PELTIER e RUSSELL, 2002). Apesar de poucos estudos em modelos animais de neuropatia periférica induzida pela OXL, os protocolos já descritos para a indução desses modelos tem apresentado boa equivalência clínica. O primeiro trabalho que avaliou os efeitos do tratamento com OXL sobre o limiar nociceptivo de roedores, foi desenvolvido por LING et al. (2007a). Esses autores demonstraram que tratamento crônico com OXL em ratos induz alterações de sensibilidade térmica e mecânica, como observado na prática clínica. TA LOW e WINDEBANK (2009) demonstram que também em camundongos há aumento da sensibilidade para estímulos nociceptivos térmico frio e mecânico após o tratamento com OXL. PONTES (2009) modificaram o protocolo de LING et al (2007a) para camundongos e demonstraram que a dose de 1 mg/kg de OXL foi a mais eficaz em induzir as alterações

de limiar nociceptivo mecânico e térmico. Observa-se na prática clínica, que tratamentos de curta duração e doses baixas de OXL estão mais associados a neuropatia reversível, enquanto doses maiores e tratamentos prolongados são associados com mais frequência à neuropatia crônica. Considerando que a neuropatia quimioterápica em sua forma crônica é o foco principal para o desenvolvimento de terapêuticas, alguns estudos têm utilizado protocolos de doses repetidas de OXL (TA et al., 2009; RENN et al., 2011) na indução dos modelos experimentais. Azevedo et al. (2013) padronizaram um modelo de neuropatia crônica em camundongos utilizando OXL na dose de 1 mg/kg, em esquema consistindo de administrações endovenosas duas vezes por semana durante quatro semanas e meia. Os autores descreveram o desenvolvimento de alterações duradouras de limiar nociceptivo, caracterizando a neuropatia crônica. Utilizando o mesmo protocolo de Azevedo e colaboradores, no presente trabalho observamos que o tratamento repetido com OXL induziu aumento da sensibilidade a estímulos nociceptivos durante quatorze semanas, refletindo o estabelecimento de neuropatia quimioterápica crônica. Em equivalência clínica, os animais neuropáticos apresentaram alodinia mecânica e hiperalgesia ao frio, que são sintomas característicos da dor neuropática induzida por OXL em pacientes (CATA et al., 2006).

Park et al (2008) evidenciaram que a OXL induz aumento de atividade espontânea no tecido nervoso, indicando efeito do fármaco sobre a excitabilidade axonal. De fato, alterações de fluxo iônico nos nociceptores têm sido associadas ao desenvolvimento das neuropatias agudas por OXL. Algumas teorias relacionam a ação de um metabólito da OXL, o oxalato, que altera as propriedades funcionais de canais dependentes de voltagem nos nociceptores, com o momento inicial da neuropatia. Alterações de fluxo de sódio tem impacto direto sobre a excitabilidade do nociceptor, o que poderia ser traduzido em aumento da sensibilidade nociceptiva (GROLLEAU et al., 2008). Em linha com essa ideia, estudos tem mostrado o aumento das correntes de sódio nos nociceptores durante a neuropatia quimioterápica aguda, e a reversão da alodinia pelo bloqueio dos canais de sódio por lidocaína essa forma, a OXL origina metabólitos que alteram a função dos canais e promovem a abertura prolongada destes, gerando hiperexcitabilidade e disparos ectópicos, que induzem os sintomas nociceptivos (CAROZZI et al 2014). Além das disfunções em canais de sódio, outros canais iônicos como de potássio e cálcio também tem envolvimento com a neuropatia por OXL. Outra teoria que pode explicar a hipersensibilidade térmica são os níveis aumentados de expressão dos receptores TRPA1 sensíveis ao frio em fibras nociceptivas A $\delta$  e C de animais com neuropatia quimioterápica (ANAND e GAUCHAN, 2008). Contudo, nesse trabalho o retorno da expressão de TRPA1 a níveis normais aconteceu após 10 dias de descontinuidade



do tratamento quimioterápico, enquanto que as alterações de sensibilidade persistiram até o 25º dia, indicando que outros mecanismos neuronais, além de canalopatias, estão envolvidos na manutenção da alodinia induzida pela OXL. No presente trabalho, as alterações de resposta nociceptiva tiveram início na primeira semana de tratamento quimioterápico e, persistiram por dois meses após seu fim, o que sugere a participação de múltiplas vias na sua manutenção. Entre as vias estudadas na fisiopatologia da neuropatia quimioterápica, o papel fundamental do estresse oxidativo tem sido cada vez mais validado, como será discutido com detalhes adiante.

Tendo sido estabelecido o modelo de neuropatia crônica por oxaliplatina, a seguir os efeitos do tratamento com CMsMO sobre os distúrbios nociceptivos nesse modelo foram avaliados. Para tal, inicialmente foi realizada a caracterização das células a serem transplantadas como células-tronco mesenquimais em ensaios de diferenciação celular e citometria de fluxo. Segundo a *International Society for Cellular Therapy* são três os requerimentos mínimos para uma população de células ser classificada como célula mesenquimal. A primeira é que sejam isoladas de uma população de células mononucleares com base à sua aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico. Neste sentido, em nossos cultivos as células apresentaram características morfológicas de fibroblastos e aderência ao plástico durante expansão. O segundo critério é que as células em condições especiais de meio diferenciem-se em células de linhagens mesodérmicas. Como demonstrado na sessão Resultados, a partir de diferentes condições de estímulos em cultura as CMsMO apresentaram diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica conforme esperado. O terceiro critério é a expressão obrigatória de marcadores de superfície típicos de células mesenquimais e ausência de marcadores característicos de outras linhagens celulares. Em concordância com esses critérios, as CMsMO expressaram Sca-1, CD 105, CD 90, CD 73, CD44 e CD29 típicos de células mesenquimais; e tiveram baixa expressão de CD 45, CD 34, CD 117 (presentes em células hematopoiéticas) e CD 11b (presentes em células do sistema imune). Em conjunto, esses dados confirmam a eficiência do protocolo empregado aqui para a obtenção de CMsMO, que foram a seguir utilizadas nos tratamentos.

Nossas avaliações comportamentais de limiar nociceptivo mostraram que animais neuropáticos transplantados com CMsMO obtiveram progressiva melhora das alterações nociceptivas, até o completo reestabelecimento dos padrões sensitivos para níveis normais. Na avaliação nociceptiva mecânica e térmica os animais tratados com injeção única de CMsMO obtiveram melhora três dias após o transplante e mantiveram a reversão da alodinia e hiperalgesia até o fim do experimento. Tais dados demonstraram o efeito antinociceptivo das células-tronco frente a neuropatia quimioterápica.

A neuropatia periférica quimioterápica afeta predominantemente os nervos sensoriais (SCHLEGEL, 2011), enquanto que o envolvimento dos nervos motores ou autonômicos é raro (GRISOLD et al., 2012). A lesão cumulativa persistente causada por agentes quimioterápicos na maioria das vezes afeta células nervosas sensoriais (QUASTHOFF e HARTUNG, 2002). Corroborando essa ideia, no presente trabalho, o tratamento crônico com OXL induziu alterações de sensibilidade nociceptiva, mas não afetou a função motora dos camundongos, como evidenciado no teste rota-rod. O tratamento crônico com OXL também não produziu alterações no peso corporal dos camundongos ao longo do período experimental. Considerando que a avaliação de limiar nociceptivo em roedores é baseada em respostas comportamentais motoras, a integridade da função motora é fundamental para evitar erros de interpretação nos testes nociceptivo. Dessa forma, os resultados negativos no teste de rota-rod, corroboram o efeito antinociceptivo de CMsMO, por descartarem a interferência de déficits motores.

De fato, trabalhos anteriores, em outros modelos de neuropatia, já demonstraram efeito antinociceptivo da terapia celular. Os primeiros estudos abordando o uso da terapia celular no controle da dor neuropática utilizaram modelos murinos de lesão mecânica de nervos isquiáticos na indução da neuropatia (KLASS et al., 2007; MUSSOLINO et al., 2007). Klass et al (2007) mostraram o efeito antinociceptivo das células mononucleares de medula óssea na reversão da dor neuropática comportamental após a lesão de nervo. Do mesmo modo, MUSSOLINO et al. (2007) mostraram no modelo de ligadura de nervo, o efeito preventivo de CMsMO sobre a alodinia mecânica e térmica. Em 2008, Shibata e colaboradores apresentaram os primeiros estudos da terapia celular na neuropatia diabética. Nesse estudo os autores demonstraram que células mesenquimais injetadas no músculo esquelético de camundongos diabéticos por estreptozotocina aumentam os níveis de fatores angiogênicos no nervo, promovendo a vascularização. Do mesmo modo, em nosso laboratório foi demonstrado o efeito antinociceptivo das células mesenquimais da polpa do dente na dor neuropática comportamental diabética (GUIMARÃES et al., 2013). Evangelista et. al (2014) estudando camundongos com neuropatia diabética demonstraram que o tratamento com CMsMO leva os limiares nociceptivos de animais neuropáticos a níveis similares aos de animais não neuropáticos. Dessa forma, o potencial benefício da terapia celular para o controle da dor neuropática tem sido demonstrado em diferentes condições experimentais. Entretanto, esse é o primeiro estudo demonstrando o efeito antinociceptivo de CMsMO na neuropatia quimioterápica crônica.

Na análise comparativa, o tratamento com gabapentina, ainda que em esquema de administrações diárias, contribuiu apenas de forma transitória para a normalização dos

limiares nociceptivos dos animais neuropáticos. O efeito antinociceptivo da gabapentina foi passageiro, sendo totalmente revertido 24h após o fim das administrações diárias. A gabapentina possui um papel bem estabelecido no controle da dor crônica em pacientes com neuropatias diversas. Ainda que considerada padrão ouro para a dor neuropática, possui eficácia analgésica modesta e é responsável por produzir efeitos colaterais como tonturas, sonolência, fadiga e ganho de peso, os quais dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento (BACKONJA et al., 1998; TURAN et al., 2006; TURK, WILSON, COHANA, 2011). Os dados apresentados aqui mostram que a ação antinociceptiva das CMsMO foi prolongada e capaz de reverter a dor neuropática comportamental, enquanto que a gabapentina demonstrou efeito paliativo passageiro, equivalente ao seu perfil clínico. É possível propor, a partir da comparação de efeitos com a droga referência de amplo uso em pacientes, que a ação antinociceptiva das CMsMO abre perspectivas para uma abordagem terapêutica mais eficaz das manifestações dolorosas induzidas pelo uso crônico de quimioterápicos.

A partir dos dados dos testes comportamentais, evidenciando a reversão duradoura das alterações de sensibilidade na neuropatia pelo tratamento com CMsMO, os efeitos da terapia celular sobre alterações estruturais dos nervos periféricos de animais neuropáticos foram investigados. A neuropatia induzida por fármacos antineoplásicos tem sido associada a danos de neurônios sensoriais em nervos periféricos que alteram a função sensorial. Diferentes alterações estruturais têm sido descritas, dependendo do agente quimioterápico, esquema de tratamento e modelo experimental utilizado. Xiao et al., (2012) demonstraram em um modelo de neuropatia crônica por OXL em ratos que não há indícios de degeneração de fibras C e A no nervo periférico. Por outro lado, Renn et al., (2011) demonstraram que fibras mielínicas do nervo isquiático de camundongos com neuropatia crônica por OXL, tem alterações indicativas de axonopatia. No presente estudo avaliamos aspectos morfológicos e morfométricos de axônios de fibras mielinizadas e não mielinizadas do nervo isquiático dos camundongos. Evidenciamos apenas raros vestígios de degeneração axonal em fibras mielínicas de camundongos neuropáticos, contudo na avaliação morfométrica não houve diferença em nenhum dos parâmetros avaliados. Em relação aos animais não neuropáticos, os camundongos neuropáticos não apresentaram diferenças quanto ao número ou densidade de axônios mielinizados, assim como também não houve diferença quanto ao diâmetro dos axônios e das fibras. Esses dados indicam que, como previamente demonstrado para outros quimioterápicos (CAROZZI et al., 2010; FLATTERS et al., 2006; XIÃO et al., 2012), a OXL não promove atrofia axonal ou perdas degenerativas de axônios mielinizados. Ainda, a medida de avaliação da mielina através dos valores da razão g indica que nesse modelo não há indício de processos de desmielinização, como demonstrado por Flatters e Bennett (2006) na neuropatia induzida

por paclitaxel. Do mesmo modo que no presente estudo, Carozzi et al (2010) descreveram que quimioterápicos podem induzir discretas alterações morfológicas nos nervos periféricos, sem alterar significativamente sua morfometria. Esses autores demonstraram que camundongos tratados com paclitaxel, bortezomib e cisplatina exibem alterações morfológicas brandas nos nervos isquiáticos, mas na avaliação morfométrica, a quantificação de parâmetros como diâmetro axonal e mielinização, mostra que não há diferenças entre animais controle e neuropáticos.

A avaliação morfológica e morfométrica das fibras nociceptivas amielínicas no nervo isquiático mostraram que os animais neuropáticos não sofrem alteração significativa na densidade e na área axonal de fibras C. Em linha com esses resultados, a neuropatia por paclitaxel não induz degeneração axonal já que o número e densidade de fibras C em nervos safenos não diferem entre animais neuropáticos e não neuropáticos (XIÃO et al., 2012; FLATTERS e BENNETT, 2006). Sahenk et al. (1994) sugeriram que a neurotoxicidade induzida por paclitaxel promove alterações estruturais mais prováveis por processos de ganglionopatia do que axonopatia. Nesta mesma direção, no modelo de neuropatia por OXL utilizado no presente estudo, não foram detectadas alterações estruturais nos axônios de fibras sensitivas.

Os complexos platinos, tanto cisplatina quanto OXL, se ligam fortemente ao DNA neuronal durante o tratamento quimioterápico, sendo que a quantidade de ligantes ao DNA é comparável aos níveis citotóxicos do fármaco (MCDONALD et al., 2005; TA et al., 2006). Podratz et al. (2007) sugeriram que a ligação dos complexos platinos ao DNA mitocondrial é o mecanismo potencial para o dano neuronal induzido pelo tratamento. O DNA mitocondrial codifica 13 polipeptídeos da cadeia respiratória e possui um sistema de reparo do DNA limitado, com isso o desarranjo na transcrição destes genes pode comprometer a produção de ATP. O dano mitocondrial reduz a função respiratória, aumenta a produção de EROs e inibe a atividade de antioxidantes, estabelecendo um ciclo vicioso.

As observações de atipia mitocondrial em axônios de nervos periféricos provocada pelo tratamento com OXL sugeriram a hipótese de mitotoxicidade, a qual propõe que essas drogas são capazes de causar deficiência de energia em axônios sensoriais. Este déficit energético axonal tem sido considerado o mecanismo mais aceito para justificar a neuropatia sensorial crônica desenvolvida após tratamentos com OXL (BENNETT et al., 2011; FLATTERS e BENNETT, 2006; XIAO et al., 2011). Já foi demonstrado que este dano persistente à força eletromotriz da célula neuronal promove a disfunção da bomba de sódio/potássio com subsequente aumento de descargas espontâneas anormais nas fibras nociceptivas, gerando quadros hiperalgésicos (ZHENG et al., 2011; FLATTERS e

BENNETT, 2006; XIAO et al., 2011, 2012). Considerando a relevância dessa via fisiopatológica na neuropatia quimioterápica, avaliações mitocondriais morfológicas e morfométricas nas fibras sensoriais dos nervos isquiáticos foram incluídas no presente estudo. A análise mitocondrial de fibras mielínicas e fibras C do nervo isquiático evidenciou a presença de atipia mitocondrial nos dois tipos de fibras sensitivas, tanto nos grupos neuropáticos quanto não neuropáticos, entretanto essas alterações foram estatisticamente mais frequentes em animais neuropáticos. Tais dados confirmam os achados da literatura, mostrando que a neuropatia induzida por OXL possui forte relação com a disfunção mitocondrial.

Interessantemente, em animais neuropáticos tratados com CMsMO os níveis de atipia mitocondrial em fibras C, mas não em axônios mielinizados, foi reduzido a níveis equivalentes ao de animais não neuropáticos. Jin et al. (2008) demonstraram que a transmissão de impulsos nas fibras A é mais sensível a anoxia do que em fibras C, sugerindo que pode haver diferenças no metabolismo mitocondrial dessas fibras. Em linha com essa ideia, no presente trabalho demonstrou-se que em estado metabólico basal dos animais (grupo controle) o percentual de fibras atípicas foi maior nas mielinizadas em comparação as fibras C. Essa diferente susceptibilidade mitocondrial pode justificar o fato do tratamento com CMsMO ser capaz de promover atividade mitoprotetora em fibras C, mas não em fibras A. Além disso, não se pode descartar que o tempo de análise tenha interferido nesse resultado. A avaliação da morfologia mitocondrial foi realizada na quarta semana após transplante, e é possível que fibras mielínicas, ao apresentarem maior sensibilidade a anoxia, possam requerer um tempo maior para recuperação.

Não se sabe exatamente os mecanismos desencadeantes da mitotoxicidade, mas as mitocôndrias constituem o lócus primário para formação de espécies nitrosativas. Conklin et al. (2004) demonstraram que os agentes antineoplásicos produzem EROs para induzir a apoptose de células tumorais, contudo, durante a quimioterapia os efeitos tóxicos atingem também tecidos normais, como o tecido nervoso. É conhecido que as espécies reativas, como o peroxinitrito, contribuem para a manutenção da dor neuropática induzida por quimioterápicos (RADI et al., 2002; SZABO et al., 2007). O peroxinitrito, formado a partir do NO e  $O_2^-$  dentro das mitocôndrias, pode promover a nitração de proteínas e lipídeos, a falha bioenergética neuronal e disfunções da organela. Dessa forma, os níveis de espécies reativas no nervo isquiático de camundongos com neuropatia por OXL, tratados ou não com CMsMO, foram a seguir investigados.

Por meio da medida dos níveis de nitrito nos nervos isquiáticos, os dados apresentados aqui apontam maior produção de NO em nervos de camundongos com neuropatia por OXL, em relação a camundongos não neuropáticos. Estudos *in vitro* corroboram a hipótese de que esse aumento de espécies reativas no nervo, pode ter relação causal com a mitotoxicidade e a neuropatia quimioterápica. Foi demonstrado em mitocôndrias isoladas que o tratamento com complexos platinos e taxanos promove a formação EROs e “upregulation” de NO sintase (VARBIRO et al., 2001). O peroxinitrito assim formado sofre rápida difusão através das membranas e reage fortemente com proteínas presentes em diversos compartimentos mitocondriais resultando nas disfunções mitocondriais: nitração de proteínas da cadeia transportadora de elétrons mitocondriais, o que reduz a transferência de elétrons com interrupção da produção de ATP; nitração da tirosina do ATP sintase; nitração de proteínas de poros da membrana, aumentando a permeabilidade e reduzindo os potenciais de membrana mitocondrial (CHEN et al., 2008; LEMASTERS et al., 2006; ZOROV et al., 2009). Em condições fisiológicas o ambiente pró-oxidante ativa mecanismos de defesa antioxidantes, mantendo o balanço redox. Contudo, o estresse oxidativo prolongado reduz a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, aumentando o dano oxidativo (LEE et al., 2002). Na neuropatia já foi relatado que a SOD Mn, a mais importante enzima antioxidante mitocondrial no balanço de SO, sofre nitração mediada pelos níveis persistentes de peroxinitrito (MACMILLAN et al., 2001). Dessa forma, é possível que os níveis elevados de NO no nervo isquiático, evidenciados no presente estudo, contribuam diretamente para a mitotoxicidade nas fibras sensoriais, gerando um ciclo vicioso responsável pela manutenção da neuropatia crônica por OXL.

Ainda mais relevante é a demonstração do presente estudo, que o tratamento com CMsMO reverteu a neuropatia sensorial e, paralelamente, reduziu os níveis de NO no nervo isquiático para níveis similares ao de animais não neuropáticos. Atualmente, é consenso que CMsMO transplantadas podem promover reparo tecidual não apenas por estímulo a proliferação, migração e diferenciação celular, mas principalmente via secreção de fatores que são capazes de estimular a regeneração do tecido, assim como de reduzir reações inflamatórias e imunes (LANZA et al., 2009; CAPLAN et al., 2006; SI et al., 2009). Em adição, propriedades antioxidantes de CMsMO já foram demonstradas em diferentes sistemas. CMsMO protegem contra a degeneração neuronal no acidente vascular encefálico por mecanismos que incluem a redução de estresse oxidativo (CALIÓ et al., 2014). De acordo com esses dados é possível propor como hipótese mecanística, que por meio de propriedades antioxidantes e mitoprotetoras, CMsMO restituem o balanço redox no nervo induzindo efeitos terapêuticos na neuropatia quimioterápica. De fato, a utilidade de agentes antioxidantes e

mitoprotetores tem sido investigada para prevenir ou aliviar o comprometimento mitocondrial e desenvolvimento de neuropatia sensorial. Contudo em estudos clínicos tais agentes apresentam ação limitada na dor neuropática (KIM et al., 2010; FIDANBOYLU et al., 2011). Esse resultado pode refletir a curta duração do efeito protetor dessas substâncias, sendo utilizados em uma síndrome crônica associada a alterações fisiopatológicas mantidas. Nesse sentido, a terapia celular parece ter perfil mais favorável, considerando que a redução dos níveis de NO no nervo após um único transplante de CMsMO foi mantida durante todo o período experimental. Por outro lado, os efeitos do tratamento com CMsMO na neuropatia quimioterápica clínica precisam ser ainda investigados.

Os dados de mensuração de MDA reforçam a hipótese mecanística para CMsMO na neuropatia quimioterápica. A ocorrência de peroxidação lipídica foi evidenciada nos animais neuropáticos pelo aumento significativo de MDA no nervo isquiático desses animais em relação aos não neuropáticos. MDA é um dos aldeídos originários da decomposição dos peróxidos de ácidos graxos poliinsaturados de membranas. Os lipídeos celulares são alvos frequentes das espécies reativas formadas durante o estresse oxidativo (CONKLIN et al., 2004). Os aldeídos são produtos secundários da peroxidação lipídica mais estáveis que os produtos primários, podendo atravessar membranas e lesar seus componentes. A peroxidação lipídica altera funções biológicas de organelas como peroxissomos, retículo endoplasmático e mitocôndrias (NOHL e HEGNER, 1978). Na neuropatia por oxaliplatina, o papel da peroxidação lipídica já foi proposto. Em modelo de neuropatia induzida por OXL foram demonstrados níveis aumentados de produtos de peroxidação lipídica na medula espinal, culminando em desbalanço redox e alteração da função de peroxissomos (ZANARDELLI et al., 2014). Dados apresentados aqui estão de acordo essa hipótese já que os níveis de MDA nos nervos isquiáticos de camundongos com neuropatia por OXL foram maiores que nos de camundongos não neuropáticos. Em adição, o tratamento com CMsMO reduziu os níveis de MDA nos nervos de animais neuropáticos. Estes achados coincidem com os resultados obtidos para NO confirmando a habilidade das células em promover o balanço redox.

Em suma, este trabalho evidencia os efeitos antinociceptivos de CMsMO na neuropatia crônica induzida por OXL. A ação antinociceptiva de CMsMO parece estar associada a efeitos antioxidantes e mitoprotetores no tecido nervoso, reestabelecendo a homeostase redox e funções sensoriais. Este trabalho contribui como base inicial para o futuro emprego de CMsMO na terapêutica da neuropatia quimioterápica refratária.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e analisados neste trabalho, permitem concluir que:

O transplante de CMsMO induz efeito antinociceptivo duradouro na neuropatia crônica por OXL;

O efeito antinociceptivo de CMsMO na neuropatia crônica por OXL é mais consistente e duradouro do que aquele obtido com o tratamento diário com gabapentina;

CMsMO melhoram o ambiente homeostático oxidativo no nervo periférico de animais neuropáticos, o que pode representar um dos mecanismos pelos quais essas células induzem antinocicepção na neuropatia crônica por OXL.



## REFERÊNCIAS

ACQUISTAPACE, A. et al. Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. **Stem Cell**, v. 29, p. 812-824, 2011.

AGUILERA-MUNOZ, J. et al. Guidelines for the clinical management of neuropathic pain (II). **Rev. Neurol.**, v. 40, n. 5, p. 303-316, 2005.

ARETI, A. et al. Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. **Redox Biol.**, v. 2, p. 289-295, 2014.

ARGYRIOU, A. A. et al. Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 66, n. 3, p. 218-228, 2008.

ARGYRIOU, A. A. et al. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, n. 4, p. 368-377, 2008.

AUTHIER, N. et al. Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. **Neurotherapeutics**, v. 6, n. 4, p. 620-629, 2009.

AZEVEDO, MARIA ISABEL et al. "The Antioxidant Effects of the Flavonoids Rutin and Quercetin Inhibit Oxaliplatin-Induced Chronic Painful Peripheral Neuropathy." **Molecular Pain** 9 (2013): 53. PMC. Web. 18 Feb. 2017.

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

BACKONJA, M. M. et al. Value of quantitative sensory testing in neurological and pain disorders: NeuPSIG consensus. **Pain**, v. 154, n. 9, p. 1807-1819, 2013.

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

BAINS M.; HALL E.D. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1822, p. 675–684, 2012.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BENNETT GJ, LIU GK, XIAO WH, JIN HW, SIAU C. Terminal arbor degeneration (TAD): a novel lesion produced by the antineoplastic agent, paclitaxel. **Eur. J. Neurosci.**33:1667–1676. 2011

BENNETT, C. L. et al. A review of safety, efficacy, and utilization of erythropoietin, darbepoetin, and peginesatide for patients with cancer or chronic kidney disease: a report from the Southern Network on Adverse Reactions (SONAR). **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 38, n. 8, p. 783-96, Nov 2012.

BENRUD-LARSON, L. M. Chronic pain in neurorehabilitation populations: prevalence, severity and impact. **Neurorehabilitation Neural. Repair**, 2000

BIANCO P, ROBEY PG. Stem cells in tissue engineering. **Nature**. 1;414(6859):118-21. 2001

BOLAND B. A., SHERRY V., POLOMANO R. C. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy in cancer survivors. **Oncol. Nurse Edn**. 24, 33–38, 42–43.2010

CALIÓ ML, MARINHO DS, KO GM, RIBEIRO RR, CARBONEL AF, OYAMA LM, ORMANJI M, GUIRAO TP, CALIÓ PL, REIS LA, SIMÕES MDE J, LISBÔA-NASCIMENTO T, FERREIRA AT, BERTONCINI CR. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells decreases oxidative stress, apoptosis, and hippocampal damage in brain of a spontaneous stroke model. **Free Radic Biol Med**.70:141-54. 2014

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J. Cell. Physiol.**, v. 213, p. 341-347, 2007.

CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neurosci. Lett.**, v. 596, p. 90-107, 2015.

- CATA J. P., WENG H. R., LEE B. N., REUBEN J. M., DOUGHERTY P. M. Clinical and experimental findings in humans and animals with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Minerva Anesthesiol.** 72, 151–169. 2006
- CAVALETTI, G. et al. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. **Eur. J. Cancer**, v. 37, p. 2457–2463, 2001
- CAVALETTI, G. Peripheral neurotoxicity of platinum-based chemotherapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1p following 71; author reply 1p following 71, Jan 2008.
- CERSOSIMO, R. J. Oxaliplatin-associated neuropathy: a review. **Ann. Pharmacother.**, v. 39, n. 1, p. 128-135, 2005.
- CHAPLAN, S.R. BACH, F.W. POGREL, J.W. CHUNG, J.M. YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J. Neurosci. Methods**, v. 53, p. 55– 63, 1994.
- CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol.**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2002.
- CHOPRA, H.; HANS, M.K., SHETTY, S. Stem cells-the hidden treasure: A strategic review. **Dental Res. J.**, v. 10, p. 421-427, 2013.
- CHU, S. H. et al. Clinical experience of mycophenolate mofetil in the treatment of chronic allograft nephropathy in kidney transplantation: three-year follow-up. **Transplant Proc.**, v. 36, n. 7, p. 2073-2075, 2004.
- CONKLIN PL, BARTH C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. **Plant, Cell and Environm.**, v. 27, p. 959–970, 2004
- CVITKOVIC, E.; BEKRADDA, M. Oxaliplatin: a new therapeutic option in colorectal cancer. **Semin. Oncol.**, v. 26, n. 6, p. 647-662, 1999.
- DAVIES, M. et. al. The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, p. 1518-1522, 2006.
- DE MORAES VIEIRA, E.B. et. al. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luis, Brazil. **J Pain Symptom Manage**, v.44, p. 239-251, 2012.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol. Sei.**, v. 15, p. 190-197, 1994.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002

DURAN, J.M. et. al. Bone-derived stem cells repair the heart after myocardial infarction through transdifferentiation and paracrine signaling mechanisms. **Circ. Res.**, v.113, p. 539-552, 2013.

DWORKIN, R. H. et. al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132, p. 237-251, 2007.

EVANGELISTA, A. F. Avaliação do efeito do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea em modelo murino de neuropatia periférica diabética. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)** – Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

FLATTERS, S.J.; FOX, A.J.; DICKENSON, A.H. Nerve injury alters the effects of interleukin-6 on nociceptive transmission in peripheral afferents. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 484, n. 2-3, p. 183-191, 2004.

FLATTERS SJ1, BENNETT GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain.**;122(3):245-57.2006.

FIDANBOYLU M, GRIFFITHS LA, FLATTERS SJ. Global inhibition of reactive oxygen species (ROS) inhibits paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. **PLoS One.**6(9):e25212. 2011

FINNERUPA, N.B.; SINDRUPB, S.H.; JENSENA, T.S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. **Pain**, v.150, p. 573-581, 2010.

FREYNHAGEN, R. et al. Screening of neuropathic pain components in patients with chronic back pain associated with nerve root compression: a prospective observational pilot study (MIPORT). **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 22, n. 3, p. 529-537, 2006.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

FURLAN, A.D. et al. Opioids for chronic noncancer pain: a meta-analysis of effectiveness and side effects. **CMAJ**, v.174, n. 11, p. 1589-1594, 2006.

Gage, G. J., Kipke, D. R., Shain, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. **J. Vis. Exp.** (65), e3564, doi:10.3791/3564 (2012)

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**;126:131–8. 1982

GRISOLD W., OBERNDORFER S., WINDEBANK A. J. Chemotherapy and Polyneuropathies. **Eur. Assoc. NeuroOncol. Mag.** 2, 25–36. 2012

GROLLEAU, F. et al. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels. **J. Neurophysiol.**, v. 85, p. 2293–2297, 2001

GROTHEY, A. Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity. **Clin. Colorectal. Cancer**, v. 5 Suppl 1, p. S38-46, 2005.

GUIMARAES, E. T. et al. Transplantation of stem cells obtained from murine dental pulp improves pancreatic damage, renal function, and painful diabetic neuropathy in diabetic type 1 mouse model. **Cell Transplant.**, v. 22, n. 12, p. 2345-2354, 2013.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, Suppl. 10, p. 5–12, 1994.

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

HAYASHIDA, K.I.; PARKER, R.; EISENACH, J.C. Oral gabapentin activates spinal cholinergic circuits to reduce hypersensitivity after peripheral nerve injury and interacts synergistically with oral Donepezil. **Anesthesiology**, v. 106, n. 6, p. 1213-1219, 2007.

HAYASHIDA, K.; EISENACH, J.C. Multiplicative interactions to enhance gabapentin to treat neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 598, n. 1-3, p. 21-26, 2008.

HESS, D. C.; BORLONGAN, C. V. Stem cells and neurological diseases. **Cell Prolif.**, v.41, p. 94-114, 2008.

HIRAO, A.; ARAI, F.; SUDA, T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. **Cell Cycle**, v. 3, n. 12, p. 1481-1483, 2004.

HOFSTETTER, C.P. et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. **Nat. Neurosci.**, v. 8, p. 346–353, 2005.

HORIE, N. Transplanted stem cell-secreted vascular endothelial growth factor effects post-stroke recovery, inflammation and vascular repair. **Stem Cells**, v. 29, p. 274-285, 2011.

HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signalling. **Cell Signal.**, v. 11, p. 1–14, 1999.

KANN, O.; KOVACS, R. Mitochondria and neuronal activity. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 292, n. 2, p. C641-57, 2007.

KEHLET, H.; JENSEN, T. S.; WOOLF, C. J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. **Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1618-1625, 2006.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573-584, 2007.

KELLY, S. et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, p. 11839-11844, 2004.

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

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

KLASS, M. et al. Intravenous mononuclear marrow cells reverse neuropathic pain from experimental mononeuropathy. **Anesth. Analg.**, v. 104, n. 4, p. 944-948, 2007.

KROENKE, K.; KREBS, E.E.; BAIR, M.J. Pharmacotherapy of chronic pain: a synthesis of recommendations from systematic reviews. **Gen. Hosp. Psych.**, v. 31, n. 3, p. 206-219, 2009.

KUHN, N.Z.; TUAN, R.S. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. **J. Cell Physiol.**, v.222, p. 268-277, 2010.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 463–471, 1999.

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

JENSEN, T.S. et al. New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. **Diabetes Vasc. Dis. Res.**, v. 3, n. 2, p. 108-119, 2006.

JIN, H. W. et al. Prevention of paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy by acetyl-L-carnitine: Effects on axonal mitochondria, sensory nerve fiber terminal arbors, and cutaneous Langerhans cells. **Exp. Neurol.**, v. 210, p. 229–237, 2008.

JOSEPH. E.K. et al. Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. **J, Pain**, v. 5, p. 463–472, 2008.

LAFLAMME, M. A. et al. Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 2, p. 307–339, 2007

LANZA R., GEARHART J., HOGAN B., MELTON D., PEDERSEN R., THOMAS E.D., THOMSON J., WILMUT I. Second Edition. Academic Press/Elsevier; San Diego, CA. Essentials of Stem Cell Biology. 2009

LEE, M.S.; LILL, M.; MAKKAR, R.R. Stem cell transplantation in myocardial infarction. **Rev. Cardiovasc. Med.**, v. 5, p. 82-98, 2004.

LEE, W. K.; THÉVENOD, F. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions? **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 291, p. 195–202, 2006.

LEMASTERS JJ1, HOLMUHAMEDOV E. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box. **Biochim Biophys Acta.**1762(2):181-90. 2006

LING, B. et al. Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. **Pain**, v. 128, n. 3, p. 225-234, 2007.

LIMA, R. S.; SOARES, M. P. B.; SANTOS, R. R. Terapia celular na doença de Chagas. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.**, v. 31, n. 1, p. 878- 879, 2009.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

MAIZELS, M.; MCCARBERG, B. Antidepressants and Antiepileptic Drugs for Chronic Non-Cancer Pain. **Am. Family Phys.**, v. 71, p. 483-490, 2005.

MARSHALL J. The Landry-Guillain-Barré syndrome. **Brain**, v. 86, p. 55–66, 1990.

MARTIN ALGARRA S, HENRIQUEZ I, REBOLLO J, ARTIEDA J. Severe polyneuropathy and motor loss after intrathecal thiotepa combination chemotherapy: description of two cases. **Anti-cancer Drugs** 1:33–35.1966.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in médium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 7634-7638, 1981.

MCDONALD E. S., RANDON K. R., KNIGHT A., WINDEBANK A. J. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. **Neurobiol. Dis.** 18, 305–313.2005.



MACMILLAN, H. L., FLEMING, J. E., STREINER, D. L., LIN, E., BOYLE, M. H., JAMIESON, E., et al. Childhood abuse and lifetime psychopathology in a community sample. **Am. J. Psychiatry** 158, 1878–1883. 2001.

MCKEAGE, M. J. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. **Drug Safety**, v. 13, p. 228–244, 1995.

MINTZ, P. J. et. al. Exploiting Human CD34+ Stem Cell-conditioned Medium for Tissue Repair. **Mol. Ther.**, v. 22, n. 1, p. 149–159, 2014.

MORRISON, S. J. Stem cell potential: Can anything make anything? **Curr. Biol.**, v.11, n.1, p. R7–R9, 2001.

MUGGIA, F. M. Relevance of chemotherapy dose and schedule to outcomes in ovarian cancer. **Semin. Oncol.**, v. 31, n. 6 Suppl 15, p. 19-24, 2004.

MUÑOZ-ELIAS, G. et al. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 4585-4595, 2004.

MUSOLINO, P. L. et al. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. **Neurosci. Lett.**, v. 418, n. 1, p. 97-101, 2007.

NIKCEVICH, D. A.; GROTHEY, A.; SLOAN, J.A. Effect of intravenous calcium and magnesium on oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: Results of the phase III placebo-controlled Double-blind NCCTG trial N04C7 (abstract). **J. Clin. Oncol.** 2008.

NOISEUX, N. et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation, **Mol. Ther.**, v. 14, p. 840–850, 2006.

OBROSOVA, I. G. Diabetes and the peripheral nerve. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1792, n. 10, p. 931-940, 2009.

O'CONNOR, A. B. Neuropathic pain: quality-of-life impact, costs and cost effectiveness of therapy. **Pharmacoeconomics**, 2009.

PARK, E. S. et al. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. **Neurosci. Lett.**, v. 391, p. 108-111, 2006.

PARK, I. et al. Phase I/II and pharmacokinetic study of S-1 and oxaliplatin in previously untreated advanced gastric cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 65, n. 3, p. 473-480, 2010.

PARK, S. B. et al. Oxaliplatin-induced neurotoxicity: changes in axonal excitability precede development of neuropathy. **Brain**, v. 132, n. Pt 10, p. 2712-2723, 2009.

PEREIRA1, L. C.; QUEIROZ2, P. R. Terapia celular em tratamento de doenças do sistema nervoso. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 11, n. 1, p. 29-41, 2013

PETERSEN, B.E. et al. Bone marrow as a source of hepatic oval cells. **Science**, v. 284, n. 5417, p. 1168-1170, 1999.

PETIT, T. et al. Phase II study of an oxaliplatin/vinorelbine combination in patients with anthracycline- and taxane-pre-treated metastatic breast cancer. **Anticancer Drugs**, v. 17, n. 3, p. 337-343, 2006.

PETIT, T. et al. Long-term survival of 106 stage III ovarian cancer patients with minimal residual disease after second-look laparotomy and consolidation radiotherapy. **Gynecol. Oncol.**, v. 104, n. 1, p. 104-108, 2007.

PIETRANGELI, A. et al. Persistence of high-dose oxaliplatin-induced neuropathy at long-term follow-up. **Eur. Neurol.**, v. 56, n. 1, p. 13-16, 2006.

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

PODRATZ, J. L. et al. Platinum adduct formation in mitochondrial DNA may underlie the phenomenon of coasting. **J. Peripher. Nerv. Syst.**, v. 12, p. 69, 2007.

QUASTHOFF S, HARTUNG HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **J. Neurol.**, v. 249, p. 9–17, 2002.

RADI, R.; TURRENS, J. F.; CHANG, L. Y.; BUSH, K. M.; CRAPO, J. D.; FREEMAN, B. A. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266:22028–22034; 1991.

RADI, R.; CASSINA, A.; HODARA, R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. **Biol. Chem.**, v. 383, p. 401–409, 2002.

RAO, R. D. et al. Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a phase 3 randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial (N00C3). **Cancer**, v. 110, n. 9, p. 2110-2118, 2007.

REEVES, B. N. et al. Further data supporting that paclitaxel-associated acute pain syndrome is associated with development of peripheral neuropathy: North Central Cancer Treatment Group trial N08C1. **Cancer**, v. 118, n. 20, p. 5171-1718, 2012.

RENN, C. L. et al. Multimodal assessment of painful peripheral neuropathy induced by chronic oxaliplatin-based chemotherapy in mice. **Mol. Pain**, v. 26, n. 7, p. 29, 2011.

RO, L.S.; CHANG, K.H. Neuropathic Pain: Mechanisms and Treatments. **Chang Gung Med. J.**, v. 28, n. 9, p. 597-605, 2005.

ROBEY, P.G. Stem cells near the century mark. **J. Clin. Investig.**, v. 105, p. 1489-1491, 2000.

SABATOWSKI, R. et al. Pregabalin reduces pain and improves sleep and mood disturbances in patients with post-herpetic neuralgia: results of a randomised, placebo-controlled clinical trial. **Pain**, v. 109, n. 1-2, p. 26-35, 2004.

SAHENK Z1, BAROHN R, NEW P, MENDELL JR. Taxol neuropathy. Electrodiagnostic and sural nerve biopsy findings. **Arch Neurol.** Jul;51(7):726-9. 1994

SAKURAI, M. et al. Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. **Pain**, v. 147, p. 165–174, 2009.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMELZ, M.; TEGEDER, I. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 58, n. 2, p. 323-342, 2006.

SCHLEGEL U. Central nervous system toxicity of chemotherapy. *Eur. Assoc. NeuroOncol. Mag.* 1, 25–29. 2011.

SCRENCI, D. et al. Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs. **Br. J. Cancer**, v. 82, n. 4, p. 966-972, Feb 2000.

SVENDSEN CN, LANGSTON JW. Stem cells for Parkinson disease and ALS: replacement or protection? **Nat Med**.10(3):224-5. 2004.

SHIBATA, T. et al. Transplantation of bone marrow–derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. **Diabetes**, v. 57, p. 3099-30107, 2008.

SI Y., et al. Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA. **J Radiat Res** 50(1):19-26. 2009.

SILVER, M. et al. Double-blind, placebo-controlled trial of Lamotrigine in combination with other medications for neuropathic pain. **J. Pain Sympt. Manag.**, v. 34, n. 4, p. 446-454, 2007.

SIMPSON, D. M. et al. Pregabalin for painful HIV neuropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Neurology**, v. 74, n. 5, p. 413-420, 2010.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 6, p. 457-478, 2011.

SMITH, B.; TORRANCE, N. Epidemiology of Neuropathic Pain and Its Impact on Quality of Life. **Curr. Pain Headache Rep.**, v. 18, p. 350-354, 2012.

STUBBLEFIELD, M. D. et al. NCCN task force report: management of neuropathy in cancer. **J. Natl. Compr. Canc. Netw.**, v. 7 Suppl 5, p. S1-S26; quiz S27-8, 2009.

SYKOVÁ, E. et al. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels: two strategies for spinal cord injury repair. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v.26, p.1113-1129, 2006.

SZABO C, ISCHIROPOULOS H, RADI R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**.6:662–680. 2007.

TA, L. E. et al. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 6, p. 992-1002, 2006.

TA LE, SCHMELZER JD, BIEBER AJ, LOPRINZI CL, SIECK GC, BREDESON JD, LOW PA, WINDEBANK AJ. A novel and selective poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ameliorates chemotherapy-induced painful neuropathy. **PLoS One**.8(1):e54161. 2013

THANNICKAL VJ, FANBURG BL. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 279, p. L1005–L1028, 2000.

TOTH, C. C. et al. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. **Mol. Pain**, v. 6, p. 2-22, 2010.

TURAN, A. et al. Gabapentin: An Alternative to the Cyclooxygenase-2 Inhibitors for Perioperative Pain Management. **Pain Med.**, v. 102, p. 175-181, 2006.

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

VADALOUCA, A. et al. Therapeutic management of chronic neuropathic pain: an examination of pharmacologic treatment. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1088, p. 164-186, 2006.

VADIVELU, S. et.al. Potential role of stem cells for neuropathic pain disorders. **Neurosurg. Focus**, v.35, 2013.

VAN HECKE, O. et al. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**, v. 155, n. 4, p. 654-662, 2014.

VARBIRO, G. et al. Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, p. 548–558, 2001.

VINIK, A. Clinical review: use of antiepileptic drugs in the treatment of chronic painful diabetic neuropathy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, n. 8, p. 4936-4945, 2005.

VOGEL, G. Stem cells: new excitements, persistent questions. **Science**, v. 290, p.1672-1674, 2000.

WILLS ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animals. **Biochem J**.99:667–76. 1965.

WINDEBANK, A. J.; GRISOLD, W. Chemotherapy-induced neuropathy. **J. Peripher. Nerv Syst.**, v. 13, n. 1, p. 27-46, 2008.

WOLF, S. et al. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. **Eur. J. Cancer**, v. 44, n. 11, p. 1507-1515, 2008.

WU ZZ, LU HP, CHAO CC. Identification and functional analysis of genes which confer resistance to cisplatin in tumor cells. **Biochem Pharmacol.**80:262–276. 2010.

XIAO, W. H.; BENNETT, G. J. Chronic inflammatory pain and persistent spontaneous discharge in A-fibers and C-fibers. **Anesthesiology**, v. 107, p. 813–821, 2007.

XIAO, W. H.; BENNETT, G. J. C-fiber spontaneous discharge evoked by chronic inflammation is suppressed by a long-term infusion of lidocaine yielding nanogram per milliliter plasma levels. **Pain**, v. 137, p. 218–228, 2008.

XIAO, W. H. et al. Olesoxime (cholest-4-en-3-one, oxime): Analgesic and neuroprotective effects in a rat model of painful peripheral neuropathy produced by the chemotherapeutic agent, paclitaxel. **Pain**, v. 147, p. 202–209, 2009.

XIAO, W. H. et al. Mitochondrial abnormality in sensory, but not motor, axons in paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy. **Neuroscience**, 2011.

Xiao W. H., Zheng H., Bennett G. J. Characterization of oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy in the rat and comparison with the neuropathy induced by paclitaxel. **Neuroscience** 203, 194–206.2012.

ZHENG, H.; XIAO, W. H.; BENNETT, G. J. Functional deficits in peripheral nerve mitochondria in rats with paclitaxel- and oxaliplatin-evoked painful peripheral neuropathy. **Exp. Neurol.**, 232:154. 2011.

ZANARDELLI, M. et al. Oxaliplatin neurotoxicity involves peroxisome alterations. PPARgamma agonism as preventive pharmacological approach. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102758, 2014.

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109–110, 1983.

ZOROV DB, JUHASZOVA M, YANIV Y, NUSS HB, WANG S, SOLLOTT SJ. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. **Cardiovasc Res.**83:213–225. 2009.