



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

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO MEIO CONDICIONADO OBTIDO DE CULTURA
DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA DOR NEUROPÁTICA
EXPERIMENTAL: UMA ANÁLISE COMPARATIVA**

KELLY BARBOSA GAMA

Salvador - Bahia

2015

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

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

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO MEIO CONDICIONADO OBTIDO DE CULTURA
DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA DOR NEUROPÁTICA
EXPERIMENTAL: UMA ANÁLISE COMPARATIVA**

KELLY BARBOSA GAMA

Orientadora: Profª Dra. Cristiane Flora Villarreal

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

Salvador - Bahia

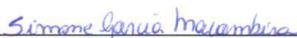
2015

“ POTENCIAL TERAPEUTICO DO MEIO CONDICIONADO OBTIDO DE CULTURA DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS NA DOR NEUROPÁTICA EXPERIMENTAL: UMA ANÁLISE
COMPARATIVA”

KELLY BARBOSA GAMA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Simone Garcia Macambira
Professora Adjunta
UFBA



Dr. Ricardo David Couto
Professor Adjunto
UFBA



Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ

“Importa, porém, caminhar hoje, amanhã e no dia seguinte.”

Jesus (Lucas, 13:33)

Aos pacientes que convivem com a dor neuropática

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir este aprendizado, dar forças nos momentos difíceis e abençoar cada passo.

Meus pais, Jucélia e Nelson, pelo incentivo a todo momento, apoio nas decisões, pelo sacrifício para que eu pudesse realizar meus sonhos, pelos bons exemplos e conselhos, pelo imenso amor.

À Rodrigo e Regina, pelo apoio, companheirismo, paciência, dedicação e amor.

Aos amigos, Diva, Géssica, Juliana, Mislene, Rodrigo, Suéllen e Vanessa, pelas boas vibrações, por toda a torcida, por se alegrarem pelas minhas conquistas, por serem a família que escolhi.

À minha família, pela preocupação, cuidado e pelo carinho.

À professora Cristiane Flora por toda a dedicação, orientação e pelos exemplos.

Aos amigos do LAFTE e do LETI: Anna, Gisele, Renan, Luiza, Marlene, Edileuza, Nanashara, Sara, Ana Carolina, Rosane, Larissa, Fênix, Simão, Felipe, Cinara, Alexandre, Taís, Marcelo, Tanira, Pâmela, Breno, por alegrarem tanto os dias de trabalho. Em especial à Afrânio, Tatiana, Cássio e Dourivaldo por todo o apoio e disposição em me socorrer.

À Clarissa e Jaqueline pelos ouvidos atenciosos e pacientes, por compartilharem problemas e alegrias.

À família B578, pelas boas vibrações. Em especial à Mila, pelo incentivo e compreensão.

À Alberto Neto e Adriano pelas orientações iniciais e pela disposição em ajudar.

À Dra. Simone, Dr. Daniel, Dr. Diogo, Dra. Elisalva, Dra. Milena pelos exemplos e orientações.

Aos funcionários da biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, em especial à Ana Fiscina, pela disposição em ajudar.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

GAMA, Kelly Barbosa. Potencial terapêutico do meio condicionado obtido de cultura de células-tronco mesenquimais na dor neuropática experimental: uma análise comparativa. 86 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Dor neuropática (DN) é um tipo de dor crônica causada por lesão ou disfunção do sistema nervoso. Atinge cerca de 3 a 17% da população mundial e é considerada um problema de saúde pública. Dentre os mecanismos envolvidos na indução e manutenção da dor neuropática, merece destaque o papel das citocinas, que atuam como neuromoduladores envolvidos na sensibilização dolorosa. Não existe atualmente tratamento clínico que leve à cura da dor neuropática. Evidências experimentais indicam que células-tronco mesenquimais, através de sua ação parácrina, possuem grande potencial na terapêutica desta síndrome. **OBJETIVO:** O presente trabalho teve por objetivo investigar o potencial terapêutico do meio condicionado (MCd) obtido a partir do sobrenadante da cultura de células-tronco mesenquimais em modelo experimental de neuropatia, comparando seus efeitos aos das próprias células-tronco mesenquimais (CMMO) e aos efeitos da terapia farmacológica atualmente utilizada no controle clínico da dor neuropática. **MÉTODOS:** As CMMO foram obtidas a partir de medulas ósseas de camundongos C57Bl/6, oriundos do CPqGM (FIOCRUZ-BA), e foram caracterizadas por citometria de fluxo e ensaios de diferenciação celular *in vitro*. Animais da mesma linhagem foram submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e seus limiares nociceptivos mecânico e térmico foram avaliados durante todo o período experimental (60 dias) com filamentos de von Frey e Hargreaves, respectivamente. Secções de medula espinal (L4-L5) e nervos isquiáticos foram coletadas para análise quantitativa de citocinas por ELISA. Todas as avaliações foram realizadas antes e depois do tratamento com MCd, com CMMO (1×10^6), e com os fármacos indometacina (1 mg/kg) e gabapentina (70 mg/kg). **RESULTADOS:** A análise comportamental demonstrou redução dos limiares nociceptivos mecânico e térmico dos camundongos após a cirurgia de ligadura, evidenciando o desenvolvimento de alodinia e hiperalgesia, indicativos de neuropatia. O tratamento dos animais neuropáticos com única administração endovenosa de MCd induziu aumento do limiar de nocicepção durante todo o período experimental. Em comparação aos outros tratamentos propostos, apenas a administração de CMMO alcançou resultados semelhantes. A indometacina e a gabapentina tiveram efeito antinociceptivo somente durante o período de tratamento com as mesmas. A análise quantitativa das citocinas IL-1 β , IL-10, TNF- α e IL-6 nos nervos isquiáticos ipsilaterais e medulas espinais dos camundongos evidenciou que o tratamento com MCd ou CMMO reduziu os níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6, e aumentou os níveis de IL-10, tanto na medula (nível central) quanto no nervo (nível periférico). Os tratamentos com indometacina e gabapentina tiveram efeitos menos consistentes sobre os níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, a depender da citocina, tempo e sítio avaliado. **CONCLUSÃO:** O efeito do MCd na DN experimental é comparável ao das CMMO, e superior em magnitude e duração ao tratamento farmacológico usual para essa síndrome. É possível que o efeito antinociceptivo do MCd na neuropatia decorra da modulação da produção de citocinas nas vias de dor, e portanto, de uma interferência com o curso da doença. Em conjunto, os dados desse estudo permitem propor que o MCd pode ser uma alternativa inovadora de aplicação futura para o tratamento da DN.

PALAVRAS-CHAVE: Dor neuropática, Alodinia mecânica, Hiperalgisia térmica, Células-tronco, Células mesenquimais de medula óssea, Meio condicionado, Citocinas.

GAMA, Kelly Barbosa. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells-conditioned medium in experimental neuropathic pain: a comparative analysis. 86 f. il. Dissertation (Master) – Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Research Center, Salvador, 2015.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Neuropathic pain (DN) is a type of chronic pain caused by injury or dysfunction of the nervous system. It affects about 3-17% of the world population and is considered a public health problem. Among the mechanisms involved in the induction and maintenance of neuropathic pain, deserves the role of cytokines, which act as neuromodulators involved in the pain maintenance. There is currently no therapeutic approach that promote the healing of neuropathic pain. Experimental evidence indicates that mesenchymal stem cells, through its paracrine action, have great potential in the treatment of this syndrome. **AIM:** The present study aimed to investigate the therapeutic potential of the mesenchymal stem cells-conditioned medium in an experimental model of neuropathy, comparing its effects to those of mesenchymal cells (CMMO) and pharmacological therapy currently used in the clinical management of neuropathic pain. **METHODS:** CMMO were obtained from C57BL/6 mice bone marrow, from CPqGM (Fiocruz-BA) and were characterized by flow cytometry and cell differentiation *in vitro* assay. Partial ligation surgery of the sciatic nerve was performed in C57BL/6 mice and the mechanical and thermal nociceptive thresholds were assessed throughout the experimental period (60 days) with von Frey filaments and Hargreaves, respectively. Spinal cord sections (L4-L5) and sciatic nerves (1 cm) were collected for quantitative analysis of cytokines by ELISA. All evaluations were performed before and after treatment with MCd, CMMO (1×10^6), indomethacin (1mg/kg), and gabapentin (70 mg/kg). **RESULTS:** As expected, the ligation surgery induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, showing the development of neuropathy. The treatment of neuropathic animals with single intravenous MCd administration induced antinociception throughout the experimental period. Compared to remaining treatments, just the CMMO administration reached similar results. Indomethacin and gabapentin had antinociceptive effect only during the period of repeated administrations. Treatment with MCd or CMMO reduced the IL-1 β , TNF- α and IL-6 levels in both the spinal cord and the sciatic nerve. In addition, these same treatments induced increase of the spinal cord and nerve IL-10 levels. Indomethacin and gabapentin induced varying effects on cytokines levels, depending on the tissue and cytokine evaluated. **CONCLUSION:** The effect of MCd in experimental DN is equivalent to CMMO, but it is greater in magnitude and duration than pharmacological treatments. The MCd-induced antinociceptive effect seems to reflect an interference with the course of the neuropathic disease. It is possible to propose that the MCd may be an innovative alternative for future application in the treatment of DN.

KEYWORDS: Neuropathic pain, Mechanical allodynia, Thermal hyperalgesia, Stem cells, Mesenchymal stem cells-conditioned medium, Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Delineamento experimental para avaliação dos limiares nociceptivos mecânico (filamentos de von Frey) e térmico (Hargreaves) dos grupos experimentais naïve, sham, operado, veículo, CMMO e MCd.	39
Figura 2	Delineamento experimental para avaliação dos limiares nociceptivos mecânico (filamentos de von Frey) e térmico (Hargreaves) do grupo experimental que recebeu tratamento diário com gabapentina 70 mg/kg, v.o.	40
Figura 3	Delineamento experimental para avaliação dos limiares nociceptivos mecânico (filamentos de von Frey) e térmico (Hargreaves) do grupo experimental que recebeu tratamento diário com indometacina 1 mg/kg, i.p.	40
Figura 4	Esquema de coleta de tecidos para análise dos níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α) por ELISA.	41
Figura 5	Fotomicrografias de CMMO induzidas à diferenciação.	44
Figura 6	Avaliação do limiar nociceptivo mecânico da pata ipsilateral de animais submetidos à cirurgia para ligadura parcial do nervo isquiático (grupo operado) e de animais falso operados (grupo sham).	45
Figura 7	Avaliação do limiar nociceptivo térmico da pata ipsilateral de animais submetidos à cirurgia para ligadura parcial do nervo isquiático (grupo operado) e de animais falso operados (grupo sham).	46
Figura 8	Comparação do ganho de peso corporal durante	47

o período experimental no modelo de ligadura do nervo isquiático.

Figura 9	Comparação da função motora entre grupos durante o período experimental no modelo de ligadura do nervo isquiático.	48
Figura 10	Efeito do meio condicionado (MCd), de células mesenquimais de medula óssea (CMMO) e do tratamento diário com gabapentina ou indometacina sobre o limiar nociceptivo mecânico na neuropatia experimental.	50
Figura 11	Efeito do meio condicionado (MCd), de células Mesenquimais de medula óssea (CMMO) e do tratamento diário com gabapentina ou indometacina sobre o limiar nociceptivo térmico na neuropatia experimental.	51
Figura 12	Variação do peso corporal durante o período experimental no modelo de ligadura do nervo isquiático.	52
Figura 13	Efeitos dos tratamentos sobre a função motora na neuropatia experimental.	53
Figura 14	Quantificação da citocina IL-1 β nos segmentos L4-L5 das medulas espinais dos animais submetidos ao modelo de ligadura.	56
Figura 15	Quantificação da citocina IL-6 nos segmentos L4-L5 das medulas espinais dos animais submetidos ao modelo de ligadura.	57
Figura 16	Quantificação da citocina TNF- α nos segmentos L4-L5 das medulas espinais dos animais submetidos ao modelo de ligadura.	58
Figura 17	Quantificação da citocina IL-10 nos segmentos L4-L5 das medulas espinais dos animais submetidos ao modelo de ligadura.	59
Figura 18	Quantificação da citocina IL-1 β nos nervos isquiáticos	60

ipsilaterais dos animais submetidos ao modelo de ligadura.

- Figura 19** Quantificação da citocina IL-6 nos nervos isquiáticos ipsilaterais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. 61
- Figura 20** Quantificação da citocina TNF- α nos nervos isquiáticos ipsilaterais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. 62
- Figura 21** Quantificação da citocina IL-10 nos nervos isquiáticos ipsilaterais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização de CMMO por citometria de fluxo	42
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMMO	Células-tronco mesenquimais de medula óssea
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
CT	Células-tronco
DN	Dor neuropática
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
GRD	Gânglios da raiz dorsal
HCl	Ácido clorídrico
i.p.	Intraperitoneal
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
MCd	Meio condicionado obtido de cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão fosfato (Phosphate buffered saline)
PBS-BSA	Tampão fosfato (Phosphate buffered saline) com albumina de soro bovino (Bovine serum albumin)
RPM	Rotações por minuto

TGF-β	Fator transformador de crescimento β (Transforming growth factor β)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (Tumor necrosis fator- alpha)
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	DOR NEUROPÁTICA	18
2.2	FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA: O PAPEL DAS CITOCINAS	19
2.3	TERAPÊUTICA DA DOR NEUROPÁTICA	22
2.4	CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR	23
2.5	O POTENCIAL DAS CÉLULAS-TRONCO NA DOR NEUROPÁTICA	26
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	ANIMAIS	31
4.2	MODELO DE DOR NEUROPÁTICA POR LIGADURA DE NERVO	31
4.3	DETERMINAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO (FILAMENTOS DE VON FREY)	32
4.4	DETERMINAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO (HARGREAVES)	32
4.5	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA	32
4.6	ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E OBTENÇÃO DE MCD	33
4.7	CITOMETRIA DE FLUXO	34
4.8	DIFERENCIAÇÃO DE CMMO	34
4.9	COLETA DE MATERIAL PARA ELISA	36
4.10	ELISA	36
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4.12	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
4.12.1	Grupos experimentais	37
4.12.2	Avaliação dos limiares nociceptivos mecânico e térmico	39
4.12.3	Coleta de tecidos para quantificação de citocinas	40

5	RESULTADOS	42
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE CMMO POR CITOMETRIA DE FLUXO	42
5.2	DIFERENCIAÇÃO DE CMMO <i>IN VITRO</i> NAS LINHAGENS ADIPOGÊNICA, CONDRÓGENICA E OSTEOGÊNICA	42
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE DN POR LIGADURA DO NERVO ISQUIÁTICO	45
5.3.1	Evolução do limiar nociceptivo	45
5.3.2	Evolução do peso corporal	47
5.3.3	Evolução da função motora	48
5.4	EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE A NEUROPATIA	49
5.4.1	Efeito sobre o limiar nociceptivo	49
5.4.2	Efeito sobre o peso corporal	52
5.4.3	Efeito sobre a função motora	53
5.5	EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA DN EXPERIMENTAL	54
5.5.1	Efeitos dos tratamentos sobre a expressão de citocinas na medula espinal	55
5.5.1.1	IL-1 β	55
5.5.1.2	IL-6	57
5.5.1.3	TNF- α	58
5.5.1.4	IL-10	59
5.5.2	Efeitos dos tratamentos sobre a expressão de citocinas no nervo isquiático	60
5.5.2.1	IL-1 β	60
5.5.2.2	IL-6	61
5.5.2.3	TNF- α	62
5.5.2.4	IL-10	63
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	73
8	PERSPECTIVAS E CONTRIBUIÇÕES	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Dor neuropática (DN) é definida pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) como um tipo de dor crônica que ocorre como consequência direta de uma lesão ou disfunção do sistema nervoso. Apesar da dificuldade de diagnóstico, decorrente da variabilidade das manifestações clínicas descritas pelos pacientes, dados estimam que a DN atinja de 3 a 17% da população mundial (VAN HECKE et al., 2014). A dor neuropática é considerada um problema de saúde pública, uma vez que além de reduzir substancialmente a qualidade de vida dos pacientes afetados, esta síndrome gera grande ônus sócio-econômico, relacionado à redução na produtividade e custos com o tratamento (MAIZELS; MCCARBERG, 2005).

Diversas substâncias têm sido utilizadas com graus variados de sucesso no controle da dor neuropática, entre elas drogas antidepressivas, anticonvulsivantes, antiarrítmicas e agentes anestésicos locais (FINNERUPA, 2010), embora muitas não tenham sido aprovadas pelas agências reguladoras para este fim (KING, 2007). Independentemente do tipo de tratamento farmacológico, somente um terço dos pacientes obtêm mais de 50% de alívio da dor (JENSEN et al., 2006), já que os fármacos atualmente disponíveis constituem paliativos sem ação curativa (VADIVELU et al., 2013). Esses dados, associados à alta prevalência mundial, tornam fundamental o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes no controle da dor neuropática.

Uma emergente estratégia para a regeneração de tecidos lesionados ou restabelecimento de função é o uso de células-tronco (CT) (AKIYAMA, 2002; SYKOVÁ, 2006). Estudos experimentais iniciais demonstraram que a administração de CT reduz a dor neuropática experimental (KLASS et al., 2007; MUSOLINO et al., 2007). Do mesmo modo, dados do nosso laboratório, indicam que células mononucleares de medula óssea (BARROS, 2010) ou células-tronco mesenquimais (GUIMARÃES et al., 2012) reduzem parâmetros comportamentais e bioquímicos de neuropatia em diferentes modelos experimentais. Os mecanismos envolvidos nas ações analgésicas de células-tronco não são ainda compreendidos, mas é possível que a ação parácrina dessas células, importante para muitas de suas propriedades terapêuticas, possa contribuir. Dessa forma, o presente trabalho investigou o potencial do meio condicionado (MCd) obtido a partir de cultura de células

mesenquimais de medula óssea (CMMO) para o controle da dor neuropática experimental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOR NEUROPÁTICA: aspectos gerais

A dor pode ser considerada um mecanismo protetor do organismo quando em condições fisiológicas. Quando um estímulo nocivo é aplicado a um tecido normal, a dor estimula reflexos que têm como objetivo minimizar os danos provocados (SOUSA, 2012). Diferente da dor fisiológica, as síndromes de dor crônica causam sofrimento ao indivíduo sem qualquer proveito biológico aparente. A dor neuropática (DN), causada por lesão ou disfunção do sistema nervoso somatossensorial, é uma das mais prevalentes e debilitantes síndromes de dor. Caracteriza-se por alterações no sistema sensorial, englobando a perda total ou parcial de sensibilidade, dor espontânea, disestesia (sensação desagradável ou dolorosa), hiperalgesia (uma sensação de dor excessiva em resposta a um estímulo nocivo) e alodinia (ocorrência de dor provocada por um estímulo que não é nocivo) (SOUSA, 2012). A DN é comumente associada com prejuízo substancial da qualidade de vida quando comparada a outros tipos de dor crônica e representa uma grande carga de custos para os serviços de saúde, além de ter consequências psicológicas e sociais negativas para os pacientes (FREYNHAGEN, BENNETT, 2009).

Alguns autores vêm destacando a importância de uma abordagem terapêutica mais complexa na DN, algo que leve mais em consideração os fatores não biológicos. Heutink e colaboradores (2013), por exemplo, afirmaram que a dor crônica pode ser perpetuada por fatores psicológicos que variam entre pacientes. Já Hearn e colaboradores (2015) afirmaram que a DN é debilitante tanto do ponto de vista fisiológico quanto do psicológico já que, nestes pacientes, os fatores biológicos estão comumente associados às variações de comportamento e de humor, à diminuição das relações sociais e com o ambiente. A DN muitas vezes provoca distúrbios do sono (causados pela própria dor, mas também por sensações desagradáveis que a acompanham); a perda de sono pode levar à ansiedade e depressão, o que acaba causando a perda de energia, diminuindo a capacidade de trabalho corporal, além de aumentar a dependência do paciente por outras pessoas (DOBROTA, 2014). Em conjunto, estes fatores impactam fortemente na qualidade de vida dos pacientes, acabam influenciando negativamente as relações sociais e geram um ciclo vicioso que só piora o quadro doloroso.

A DN pode ser consequência de diversos fatores ou doenças, entre eles destacam-se: diabetes (DAVIES, 2006); neuralgia pós-herpética (SCHAIBLE, RICHTER, 2004); lesão de nervo periférico, incluindo neuralgia pós-cirúrgica (KEHLET, JENSEN, WOOLF; 2006); radiculopatias (FREYNHAGEN, 2006), câncer e quimioterapia (BENNETT, 2012); infecção por HIV (SIMPSON et al., 2010), entre outras. Dados epidemiológicos estimam que a prevalência de DN crônica para a população mundial está na faixa de 3 a 17%, dependendo do país sob análise (VAN HECKE et al., 2014). No Brasil, há poucos dados sobre a epidemiologia da DN. Um estudo realizado na cidade de São Luiz evidenciou uma prevalência de 42% de dor crônica nos pacientes analisados, sendo 10% de dor crônica com características neuropáticas (DE MORAES VIEIRA, 2012).

2.2 FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA: O PAPEL DAS CITOCINAS

Estudos em modelos animais têm descrito processos fisiopatológicos de cunho central e periférico que são a base para o entendimento dos mecanismos de DN (ROMANELLI; ESPOSITO, 2004). Mudanças na função, na química e na estrutura dos neurônios das vias de dor estão por trás das características de sensibilidade alterada na DN. A sensibilização periférica ocorre nos nociceptores e, no sistema nervoso central, a sensibilização está presente no corno dorsal da medula espinal e em diferentes regiões encefálicas. Em adição, interações anormais entre vias simpáticas e sensoriais contribuem para os mecanismos de DN (VRANKEN, 2012).

Informações sensoriais da periferia são transmitidas para o sistema nervoso central através de 4 tipos de neurônios sensoriais primários: A α , A β , A δ e C. Todos eles são responsáveis por traduzir informações mecânicas, químicas e térmicas em atividade elétrica. Apesar de todos serem capazes de transmitir sinais sensoriais, apenas as fibras C e A δ são capazes de transmitir informações de dor da periferia para o corno dorsal da medula espinal (WILLIS; WESTLUND, 1997).

Na periferia, quando ocorre um evento que causa dano a um nervo, algumas células imunes periféricas produzem mediadores, como citocinas, fator de crescimento neural, óxido nítrico, quimiocinas e outras substâncias que, em conjunto, contribuem para o desenvolvimento de DN. Devido a estes mediadores químicos, os nociceptores das fibras C e A δ que normalmente possuem alto limiar

de ativação, respondendo apenas a estímulos nocivos, passam a apresentar sensibilidade aumentada, com redução do limiar de ativação e desenvolvimento de descargas espontâneas (MOALEM; TRACEY, 2006). Essas alterações funcionais se refletem em alterações na sensibilidade do paciente, manifestas como alodinia e hiperalgesia. No sistema nervoso central, a lesão em nervo periférico desencadeia uma série de processos que contribuem para gerar e manter a DN como condição crônica. Em resposta à lesão nervosa periférica, fibras A β podem estabelecer contatos sinápticos anormais com neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula fazendo com que a ativação de fibras periféricas não nociceptivas passe a ativar vias centrais de dor. Assim, pode haver a percepção de um estímulo inócuo como nocivo; um estímulo mecânico de baixo limiar, que normalmente não causaria dor, passa a desencadear hiperexcitabilidade neuronal que leva à sensação dolorosa (WOOLF et al., 1995). Dessa forma, eventos centrais também contribuem para os sintomas de alodinia e hiperalgesia presentes na síndrome de dor neuropática.

A contribuição de citocinas para a geração e manutenção da dor inflamatória já é bem estabelecida (CHEN; YANG; GROSSER, 2013; FERREIRA, 1993). Os mecanismos pelos quais elas podem atuar são variados: podem agir nas mesmas células que as secretaram (ação autócrina), em células vizinhas (ação parácrina), ou em células distantes das que as produziram (ação endócrina) (ZHANG; JIANXIONG, 2007). As citocinas são produzidas por diversas populações celulares, incluindo células T helper, macrófagos, células endoteliais e células da glia (ZHANG; JIANXIONG, 2007). Suas ações incluem diversos efeitos nas células do sistema imune, a modulação de respostas inflamatórias (SOMMER; KRESS, 2004), e a modulação da resposta neuronal (FENG; WANG; YANG, 2015).

Em adição, as citocinas, produzidas periférica e centralmente, parecem ter papel fundamental também na DN. Quando produzidas podem ativar astrócitos e oligodendrócitos no sistema nervoso central, que passam a liberar mediadores inflamatórios moduladores da dor. Estes mediadores contribuem para a geração da DN pelo aumento da transmissão excitatória e diminuição da inibitória. Seguindo a ativação da micróglia, um mecanismo auto-propagador de aumento na produção de citocinas é iniciado, sendo responsável por uma cascata de respostas inflamatórias no sistema nervoso central (VALLEJO et al., 2010). Há, inclusive, relatos de que o bloqueio de citocinas pró-inflamatórias ou a administração de citocinas anti-

inflamatórias reduz a hiperalgesia neuropática em modelos experimentais (SOMMER; KRESS, 2004).

As células imunes periféricas produzem, após a lesão de um nervo, citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática por ativarem os neurônios nociceptivos. Dentro de 24 horas depois da lesão nervosa periférica, microglia, oligodendrócitos e astrócitos (células gliais do sistema nervoso central) no corno dorsal da medula são ativadas por TNF- α e IL-6 e liberam mediadores pró-inflamatórios, como as próprias citocinas, que modulam o processamento da dor por afetar tanto a liberação pré-sináptica de neurotransmissores quanto a excitabilidade pós-sináptica (VRANKEN, 2012). Além disso, seguindo a ativação microglial, um mecanismo autopropagador de aumento da expressão de citocinas é iniciado e as células da glia ativadas continuam secretando citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, perpetuando o processo (FRANK; MAIER; WATKINS, 2003).

No que concerne à manutenção da homeostase do organismo, há citocinas com papel regulador, como IL-4, TGF- β e IL10, que desempenham função anti-inflamatória. A influência dessas citocinas na dor neuropática também tem sido estudada. A IL-4, um potente regulador da imunidade, é secretada por diversos tipos de células imunes e é descrita por sua função antinociceptiva em modelos de dor inflamatória (LEGER et al., 2011). Na dor neuropática, alguns estudos têm demonstrado que animais *knockout* para IL-4 apresentam uma sensibilidade dolorosa aumentada em comparação a animais selvagens, indicando que essa citocina tem papel modulador durante a neuropatia (ÜÇEYLER et al., 2011). IL-10 é uma clássica citocina anti-inflamatória, capaz de diminuir a atividade do fator de transcrição nuclear kappa B, resultando em atenuação na produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α . (CLARCK; OLD; MALCANGIO, 2013). O efeito antinociceptivo de IL-10 em condições de neuropatia tem sido amplamente descrito (BAO et al., 2014). Em adição, TGF- β modula negativamente a percepção de dor sob condições patológicas e fisiológicas (TRAMULLAS et al., 2010), além de ter importante papel na regeneração axonal (VIDAL et al., 2013).

Apesar de haver um relativo consenso entre os pesquisadores sobre os principais mecanismos envolvidos na sensibilização dolorosa, muitos mecanismos adicionais e variados tem sido propostos, demonstrando a natureza complexa desse fenômeno. De fato, os pacientes que apresentam dor neuropática são um grupo

heterogêneo. Uma variedade de diferentes percepções sensoriais (como dor espontânea, alodinia) e de descritores de dor (queimação, apertos, apunhaladas) pode ocorrer em diferentes combinações (REIMER, HELFERT, BARON; 2014). Essa característica multifatorial se reflete na terapêutica, pois fármacos que controlam bem outras síndromes de dor mostram-se terapeuticamente limitados na dor neuropática.

2.3 TERAPÊUTICA DA DOR NEUROPÁTICA

O tratamento atualmente utilizado para o controle da DN envolve diversos tipos de medicamentos e terapias, dentre eles antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, antiarrítmicos, anestésicos locais e opióides (FINNERUPA, 2010), além de terapias não farmacológicas, como acupuntura (GARROW et al., 2014), estimulação elétrica e magnética (LEUNG, FALLAH, SHUKLA, 2014; ALM, DREIMANIS, 2013).

Dentre as classes terapêuticas acima citadas, a dos anticonvulsivantes, em especial a gabapentina, parece ser a eleita com maior frequência no tratamento da DN de diversas causas (SCHREIBER et al., 2015; GILRON et al., 2015; ATTAL, BOUHASSIRA, 2015; SCHUG, GODDARD, 2014; GILRON et al., 2006). Alguns estudos, inclusive, sugerem que anticonvulsivantes, como a gabapentina e a pregabalina, apresentam melhor eficácia analgésica do que antidepressivos tricíclicos ou os opióides, além de terem como características a ausência de toxicidade grave e maior tolerabilidade, aspectos que contribuem para sua escolha (GILRON, FLATTERS, 2006).

Apesar disto, os tratamentos farmacológicos disponíveis para DN são limitados, uma vez que cerca de 50% dos pacientes não obtêm alívio da dor, enquanto 50% dos pacientes obtêm apenas um alívio parcial (DWORKIN et al., 2007). Além disso, mesmo com medicamentos bem estabelecidos, a escolha da dosagem pode ser complicada, o início de ação pode ser lento e os efeitos colaterais são bastante comuns (DWORKIN et al., 2007). As abordagens terapêuticas empregadas no tratamento da dor neuropática, independente de sua origem, buscam aliviar os sintomas desta doença. Nenhum tratamento atualmente disponível tem como estratégia tratar a causa da dor, ou seja, promover a cura da lesão (VADIVELU et al., 2013). Essa realidade pode estar apoiada no conhecimento geral

de que a regeneração do tecido nervoso, bem diferenciado e especializado, é difícil de ser alcançada. Esse conceito, no entanto, começou a ser modificado a partir da publicação dos primeiros estudos que evidenciaram o potencial regenerador das células-tronco.

2.4 CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR

Terapia celular é, por definição mínima, a utilização de células com fins terapêuticos. As células podem ser utilizadas de diversas maneiras. Podem ser injetadas por via endovenosa para exercerem ações sistêmicas ou atingirem órgãos e tecidos específicos, ou injetadas diretamente no tecido comprometido com objetivo de promover algum efeito benéfico regenerativo. As células utilizadas para terapia celular variam de acordo com o estado de maturação e diferenciação. Podem ser utilizados linfócitos ou células dendríticas sensibilizados *in vitro* nas chamadas vacinas celulares; células de sangue periférico, nas transfusões sanguíneas; como também podem ser utilizadas células-tronco com o fim de promover reparo (INCTC, 2009).

Células-tronco (CT) são células indiferenciadas, capazes de se proliferar originando outras células-tronco ou se diferenciar, originando uma variedade de diferentes tipos teciduais (SOUZA et al., 2003; SANTOS, SOARES, CARVALHO, 2004). De acordo com seu grau de plasticidade, as células-tronco classificam-se em totipotentes, pluripotentes e multipotentes (SOUZA et al., 2003). As células-tronco totipotentes são obtidas do embrião recém-formado e têm potencial para originar todas as células embrionárias e até mesmo células do folheto extraembrionário que formarão a placenta (CHOPRA, HANS, SHETTY, 2013). Entretanto, estas células são efêmeras e desaparecem poucos dias após a fertilização (ROBEY, 2000). Células-tronco pluripotentes, são capazes de originar qualquer tipo de tecido com exceção de tecidos extra-embrionários. Já as células-tronco multipotentes estão presentes em indivíduos adultos e podem originar um número limitado de tipos celulares (GAGE, 2000).

Entre as fontes conhecidas de células-tronco adultas, a medula óssea tem sido a mais estudada, e possui tanto células-tronco hematopoéticas, quanto células-tronco mesenquimais (BYDLOWSKI et al., 2009). As primeiras são capazes de se diferenciar em células sanguíneas e representam cerca de 0,01 a 0,05% de todas as

células da medula óssea (LAGASSE et al., 2000). Já as células-tronco mesenquimais, representam uma população de 0,001 a 0,01% das células da medula óssea (PITTENGER et al., 1999), e tem um grande potencial de diferenciação (JONES et al., 2002). Células-tronco mesenquimais são uma população heterogênea de células que se proliferam *in vitro*, aderem ao plástico e tem morfologia semelhante ao fibroblasto. Quando submetidas aos estímulos adequados, elas são capazes de diferenciações como a osteogênica, condrogênica, adipogênica, neurogênica e cardiogênica (DOMINICI; 2006). Essas células são encontradas não somente na medula óssea, mas também nos tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo (BYDLOWSKI et al., 2009). Devido à facilidade de obtenção e à capacidade de diferenciação, as células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMMO) têm sido utilizadas para diversas pesquisas que visam à regeneração tecidual.

O estudo das CMMO se iniciou com a sua descoberta em 1966 por Alexander Friedenstein. Ao cultivar CT de medula óssea, ele observou que algumas células aderiam ao plástico e, posteriormente, verificou que esta linhagem tinha a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares, como adipócitos, osteócitos e condrócitos. Ele também percebeu que o conjunto de proteínas da membrana plasmática destas células era diferente do observado na membrana de CT hematopoiéticas, evidenciando se tratar de uma população distinta de células (AFANASYEV, ELSTNER, ZANDER, 2009). A partir daí, o potencial terapêutico das CMMO tem sido demonstrado na literatura por diversos autores. Um dos primeiros estudos que avaliaram os efeitos da utilização de CMMO em animais foi o de Lucas e cols. (1996). Eles transplantaram CMMO em ratos logo após cirurgia abdominal e observaram que as CMMO preveniram uma das consequências mais comuns e sérias do procedimento de cirurgia abdominal, que é a formação de adesões na cavidade peritoneal durante a cicatrização.

Na última década, diversos outros autores vêm comprovando o potencial terapêutico de CMMO em diferentes doenças e sistemas. Em 2005, Togel e colaboradores demonstraram melhora após administração de CMMO em animais que sofreram falência renal aguda isquêmica. Em 2007, Gerdoni e cols. demonstraram efeito regenerador de CMMO na encefalomielite autoimune experimental. Já em 2008, Braga e cols. e Urban e cols. evidenciaram os efeitos benéficos das CMMO em modelo experimental de infarto agudo do miocárdio e

diabetes, respectivamente. Há ainda evidências da melhora hepática de animais intoxicados por acetaminofeno (STOCK et al., 2014).

Mais recentemente, o potencial da CMMO tem sido estudado em humanos e com sucesso. Guan e cols. (2015), por exemplo, avaliaram a eficácia e a segurança da administração de células mesenquimais em 6 pacientes portadores de diabetes tipo 2 por um período mínimo de 24 meses. Eles observaram que 3 destes pacientes passaram a não necessitar mais de insulina, enquanto os demais, depois da administração das células, necessitaram de doses menores da mesma. Zhou e cols. (2010) utilizaram CMMO no tratamento de 4 pacientes com doença do enxerto *versus* hospedeiro e verificaram que todos tiveram melhora e que os efeitos das células começaram nas duas primeiras semanas.

Inúmeros estudos têm demonstrado a cada dia o grande potencial das CT e a variedade de efeitos e aplicações. No entanto, os mecanismos pelos quais as células-tronco exercem seu papel terapêutico ainda não estão bem estabelecidos. Algumas teorias foram inicialmente propostas e vem sendo modificadas na tentativa de explicar como as células-tronco produzem seus efeitos. As hipóteses inicialmente propostas foram as da transdiferenciação e da fusão célula-célula (ALVAREZ-DOLADO et al., 2007).

Transdiferenciação se refere ao processo pelo qual uma célula madura muda seu fenótipo e sua função, assumindo características de outra célula madura diferenciada. Este processo ocorre sem que a célula transdiferenciada passe por um estado intermediário pluripotente ou se torne uma célula progenitora (TAKAHASHI; 2012). No entanto, apesar de ser uma teoria bastante discutida, na prática, este é um mecanismo pouco visualizado (NYGREN et al., 2004).

A hipótese da fusão célula-célula sugere que as células-tronco podem se fundir com a célula diferenciada do tecido lesado que transfere seu material genético para a célula transplantada. Assim, as células-tronco passam a apresentar marcadores celulares de superfície da célula do hospedeiro (ALVAREZ-DOLADO et al., 2007). De fato, alguns autores conseguiram observar este fenômeno (WANG et al., 2003; QIN et al., 2014; PENG et al., 2014). Porém o baixo número de células que sofreram fusão celular não justifica a forte ação terapêutica observada experimentalmente (YAO et al., 2015).

Seguindo esta ideia, algumas observações experimentais evidenciaram que novos e variados mecanismos devem contribuir para as ações terapêuticas de CT.

Togel e cols. (2005) utilizaram o transplante de CMMO em modelo de falência renal aguda e puderam observar que a administração de CMMO resultou em melhora da função renal, em índices mais baixos de apoptose, assim como redução da lesão renal. Após a administração, nenhuma das CMMO tinha se diferenciado em fenótipo celular endotelial ou tubular, porém, os níveis de citocinas pró-inflamatórias ficaram reduzidos enquanto as citocinas anti-inflamatórias se encontravam em maior quantidade. Esses dados sugeriram que um efeito parácrino, mais que transdiferenciação ou fusão, poderia ser responsável pelos efeitos das CMMO.

Muitos outros estudos sucederam esse trabalho original, confirmando a hipótese da ação parácrina de células-tronco (GUO et al., 2015; YAO et al., 2015; HUANG et al., 2015; GAO et al., 2014; MINTZ et al., 2014; LINERO, CHAPARRO, 2014; ABDEL AZIZ et al., 2014; DURAN et al., 2013; CANTINIEAUX et al., 2013). Gnechi e cols. (2005) demonstraram que células mesenquimais que superexpressam o gene de sobrevivência Akt1 liberam fatores parácrinos os quais possuem efeitos citoprotetores sobre cardiomiócitos expostos à hipóxia. *In vivo*, eles demonstraram que a injeção do meio concentrado, obtido a partir da cultura das células mesenquimais, tem efeito protetor sobre o miocárdio logo após infarto agudo em ratos. Os autores propuseram que o efeito observado se deve à proteção do miocárdio e não à diferenciação das células transplantadas em cardiomiócitos. Noiseux e cols. (2006) injetaram CMMO em ratos com infarto agudo de miocárdio e observaram reparo tecidual, mas com baixas taxas de fusão celular e diferenciação de CMMO em cardiomiócitos, sugerindo o forte efeito parácrino das CMMO. Segundo esta hipótese, substâncias que são liberadas no local da lesão induzem a migração das células-tronco transplantadas que então secretam fatores que favorecem ao reparo do tecido lesionado (CHEN et al., 2008) e ativam CT residentes. Desta forma, as células-tronco interagem com células do sistema imune produzindo fatores solúveis anti-proliferativos e anti-citotóxicos como TGF- β , NO, PGE2, IL-6 e IL-10 (BERNARDO et al., 2009), que auxiliam no reparo tecidual.

2.5. O POTENCIAL DAS CÉLULAS-TRONCO NA DOR NEUROPÁTICA

As primeiras evidências do potencial de CT para o tratamento de doenças do sistema nervoso começaram a ser investigadas a partir da década de 90. Em 1994,

Morshead e colaboradores descobriram que havia células no tecido neural adulto de camundongos que, *in vitro*, tinham propriedades de células-tronco, como a automanutenção e a capacidade de gerar grande número de descendentes. Em 1997, McKay relatou a diferenciação *in vitro* de células-tronco fetais em neurônios e células da glia. Em 2000, foi demonstrado que células-tronco de medula óssea de camundongos adultos são capazes de migrar para o encéfalo dos animais transplantados e se diferenciar em células que expressam antígenos específicos de neurônios (MEZEY et al., 2000). Em conjunto, estes estudos indicaram que as células-tronco poderiam contribuir também para o tratamento de doenças neurodegenerativas e lesões de sistema nervoso. Diversos estudos seguiram esses achados originais, investigando tal hipótese, e demonstrando os efeitos de CT em modelos experimentais de traumatismo craniano, esclerose múltipla e doenças crônicas neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica (HESS; BORLONGAN, 2008). Chopp e Li (2002) relataram que células mesenquimais promovem melhoras funcionais em modelo experimental de lesão encefálica, por promover angiogênese e neurogênese. Syková e colaboradores (2006) demonstraram melhorias em parâmetros histopatológicos e comportamentais com o uso de células tronco da medula óssea após lesão medular em ratos. Em conjunto, esses achados apontam efeitos neuroprotetores das CT, indicando seu potencial para o manejo de doenças relacionadas ao sistema nervoso.

Em linha com essa ideia, as células-tronco tem se mostrado capazes de reverter sinais característicos de dor neuropática, uma síndrome relacionada à perda de função neural, em modelos experimentais. O trabalho pioneiro de Coronel e cols. (2006), demonstrou os efeitos do tratamento com células-tronco mesenquimais de medula óssea em modelo de neuropatia causada por ligadura de nervo isquiático em ratos. Eles observaram que, nos animais com uma ligadura ipsilateral, as células transplantadas migraram para os gânglios das raízes dorsais (GRD) ipsilaterais e não para os GRD contralaterais, sugerindo que as CMMO são capazes de migrar seletivamente para o tecido afetado por lesão. Em adição, as CMMO reestabeleceram o limiar nociceptivo mecânico dos animais.

Em 2007, Musolino e cols. demonstraram que a administração de CMMO é capaz de evitar a redução do limiar nociceptivo térmico e mecânico em animais submetidos ao modelo de DN por ligadura de nervo isquiático. No mesmo ano, Klass

e cols. observaram que ratos com DN oriunda de lesão de nervo isquiático apresentaram melhora nos parâmetros de nocicepção quando receberam transplante de células mononucleares de medula óssea (KLASS et al., 2007).

Dados do nosso laboratório indicam que células mononucleares de medula óssea são capazes de reverter a neuropatia comportamental de camundongos com DN induzida por ligadura parcial de nervo isquiático (BARROS, 2010) e que CT mesenquimais obtidas da polpa dentária de camundongos são capazes de produzir um efeito antinociceptivo duradouro na DN diabética (GUIMARÃES et al., 2012). Além disso, uma única administração de CMMO é capaz de reverter de forma progressiva e duradoura a alodinia e hiperalgesia associadas à neuropatia, além de reduzir alterações morfológicas e morfométricas encontradas no nervo isquiático de animais diabéticos (EVANGELISTA, 2014).

Apesar do grande potencial terapêutico das células-tronco, sua utilização na rotina clínica ainda apresenta limitações. Além dos efeitos a longo prazo relacionados à segurança que ainda não foram estudados, o custo e a necessidade de infraestrutura e mão de obra qualificada para o cultivo das células são outras barreiras a serem transpostas. Diante disso, o desenvolvimento de técnicas que permitam explorar o potencial terapêutico das CT, sem a necessidade de administrar as próprias CT, é uma abordagem promissora. De acordo com essa ideia, e com base na hipótese do efeito parácrino de CT, um estudo publicado em 2004 avaliou o efeito terapêutico do meio condicionado obtido da cultura de células-tronco derivadas de medula óssea humana. Os autores investigaram os efeitos do tratamento sobre a arteriogênese em modelo de isquemia unilateral dos membros posteriores em camundongos. O tratamento induziu melhora na perfusão, com redução da atrofia do tecido e da lesão do membro (KINNAIRD et al., 2004). A partir daí, outros estudos explorando esse conceito foram publicados. Em 2006, Gnecci e cols. demonstraram que o meio condicionado obtido de cultura de CMMO que super-expressam o gene Akt (Akt-CMMO) reduz a apoptose induzida por hipóxia e desencadeia vigorosa contração espontânea *in vitro* em cardiomiócitos de animais que sofreram infarto do miocárdio. Em 2007, Parekkadan e colaboradores avaliaram os efeitos de meio condicionado de CMMO em modelo de falência hepática fulminante *in vivo*. O tratamento com o meio condicionado reduz drasticamente o infiltrado leucocitário no fígado dos animais, além de reduzir a morte de células hepáticas. Os efeitos do meio condicionado em modelos de lesão do sistema

nervoso já foram também investigados. Em 2009, foi publicado o estudo de Wei e cols., indicando que o meio condicionado de CT obtidas de tecido adiposo tem efeito protetor para os neurônios de ratos em modelo de lesão encefálica isquêmica por hipóxia. Em adição, Cantinieaux e cols. (2013) avaliaram, *in vivo*, os efeitos do meio condicionado de CMMO após lesão de medula espinal em ratos, e observaram que os animais tratados com meio condicionado apresentam melhora na recuperação motora. Ensaio *in vitro*, mostraram que o meio condicionado protege neurônios de apoptose, ativa macrófagos e tem efeito pró-angiogênico.

Considerando o acima exposto, as potenciais vantagens da terapia celular e a ineficácia da terapêutica farmacológica vigente para dor neuropática, este estudo buscou avaliar pela primeira vez o potencial terapêutico do meio condicionado obtido de CMMO em modelo experimental de DN.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo investigar o potencial terapêutico do meio condicionado obtido a partir da cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea em modelo experimental de neuropatia, comparando seus efeitos aos das próprias células mesenquimais e aos efeitos da terapia farmacológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar possível efeito antinociceptivo do meio condicionado obtido da cultura de células-tronco mesenquimais em modelo experimental de neuropatia;
2. Comparar os efeitos do meio condicionado da cultura de células-tronco mesenquimais, de células-tronco mesenquimais e dos fármacos de referência, gabapentina e indometacina, no controle da dor neuropática comportamental;
3. Avaliar e comparar os efeitos modulatórios do meio condicionado da cultura de células-tronco mesenquimais, de células-tronco mesenquimais e dos fármacos de referência, gabapentina e indometacina, sobre os níveis de citocinas no nervo isquiático e medula espinal em modelo de dor neuropática.

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. Os doadores de medula óssea foram da mesma linhagem, porém fêmeas entre 35 e 50 dias de idade. 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 para Uso de Animais da FIOCRUZ (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 DOR NEUROPÁTICA POR LIGADURA DO NERVO ISQUIÁTICO

Foi utilizado o modelo descrito por Malmberg e Basbaum (1998), adaptado de Seltzer *et al.*, (1990), com ligadura parcial (transfixação) de 1/3 a 1/2 do diâmetro do nervo isquiático. Os animais receberam pentabiótico (10 µL/ 10 gramas de peso vivo) por via intraperitoneal 30 minutos antes da cirurgia. Em seguida, foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol 2,5% (100 µL/10 gramas de peso vivo). Após epilação manual no local, seguida de limpeza com álcool etílico a 70%, foi realizada incisão de um centímetro na pele sendo a musculatura do bíceps femoral exposta. As fibras musculares foram afastadas e cerca de 1/3 a 1/2 do nervo isquiático foi transfixado e ligado com fio de seda trançado 8-0 (Microsuture MicroSeda 8-0). Finalizada a cirurgia, a pele foi suturada com fio de polipropileno 6-0 (TechSuture). Ao fim da cirurgia os animais foram acomodados em caixas aquecidas, com água e ração *ad libidum* e monitorados até o completo restabelecimento.

4.3 DETERMINAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO – FILAMENTOS DE VON FREY

O limiar de resposta a estímulo mecânico foi medido com filamentos de von Frey. Estes filamentos consistem de segmentos de fio de nylon cuja rigidez à tensão é previamente determinada em gramas pelo fabricante (Stoelting). Os camundongos foram postos em uma caixa de acrílico transparente, elevada sobre um espelho. O fundo da caixa consiste de uma tela de arame galvanizado que permite acesso à superfície plantar da pata. Os animais permaneceram na caixa para adaptação por um período de trinta minutos. O teste foi feito conforme modelo descrito por Chaplan (1994), sendo adaptado e padronizado para a linhagem em questão.

4.4 DETERMINAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO – HARGREAVES

O limiar de resposta a estímulo térmico foi medido em aparelho Hargreaves (*Ugo Basile*). O equipamento consiste de uma fonte móvel de luz infra-vermelha. Os animais foram colocados em caixas de acrílico transparente, com fundo em vidro e elevadas, trinta minutos antes do início dos experimentos para adaptação. O feixe de luz incide na superfície plantar da pata sendo automaticamente interrompido quando o animal exibe o reflexo de retirada. O tempo em segundos necessário para evocar o reflexo de retirada da pata foi considerado o limiar de resposta (HARGREAVES et al., 1988).

4.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA

Uma possível interferência na função motora dos animais submetidos à cirurgia e aos tratamentos, foi avaliada no teste de rota-rod. O aparelho de rota-rod (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) consiste de uma barra com diâmetro de três centímetros, subdividida em quatro compartimentos. A barra é ajustada para girar à oito rotações por minuto. Os animais foram previamente selecionados sendo excluídos aqueles que não conseguiram permanecer na barra por dois períodos consecutivos de 120 segundos. Foram utilizados camundongos operados, falso-operados (sham), camundongos que não sofreram manipulação cirúrgica alguma (naïve), além dos tratados com indometacina (1 mg/kg), gabapentina (40 mg/kg),

células-tronco mesenquimais de medula óssea (1×10^6), meio condicionado (100 μ L), veículo e diazepam (10 mg/kg; droga de referência do rota-rod). Os animais foram colocados sobre a barra giratória e a latência para queda foi cronometrada por até 120s. Os resultados foram expressos como a média de tempo (s) em que os animais de cada grupo permaneceram na barra.

4.6 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA E OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO

As células-tronco mesenquimais foram obtidas segundo protocolo descrito por Krampera e cols. (2003). Células totais de medula óssea foram isoladas dos ossos longos das patas traseiras dos camundongos, eutanasiados por inalação de CO_2 . Usando-se técnicas estéreis, a pata foi amputada na altura da articulação coxo-femural e teve a musculatura e inervações removidas para obtenção da tíbia e fêmur. As epífises foram removidas e a medula lavada usando-se uma seringa com agulha a fim de coletar as células totais da medula em um tubo com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina. Foram então submetidas ao gradiente de Ficcol e centrifugadas a 1500 RPM durante 10 minutos a uma temperatura de 15°C . As células foram ressuspensas em solução fisiológica (0,9% de NaCl), submetidas ao teste de viabilidade utilizando-se o azul de trypan e contadas em câmara de *Neubauer*. As células de medula óssea foram então cultivadas em frascos de cultura a uma densidade de 10^7 células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, sendo as células não aderentes removidas por lavagens em meio DMEM após 3 dias de cultura. Após atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e semeadas em novos frascos para expansão. As células-tronco mesenquimais foram caracterizadas por citometria de fluxo e pela sua capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. O cultivo celular foi monitorado por microscopia de contraste de fase e o meio trocado três vezes por semana até que a confluência celular fosse de 80 a 100%, sendo posteriormente centrifugadas a 1500 RPM (806 g) por 10 minutos a temperatura ambiente. Quando alcançaram a 6ª passagem, as células foram contadas em câmara de *Neubauer* e preparadas para a administração (1×10^6) nos animais. Para obtenção do meio condicionado, após as células atingirem a confluência na 6ª passagem, as culturas foram incubadas com

meio sem soro fetal bovino por 24 horas e o meio condicionado, contendo os fatores solúveis provenientes das células, foi preparado para administração nos animais. Para isto, o sobrenadante da cultura das células mesenquimais, foi retirado da garrafa e concentrado, cerca de 15 vezes, com unidades de filtração (Centriprep e Amicon Ultra – Merck Millipore, Ireland), com 10 KDa (peso molecular de corte). As frações concentradas foram coletadas e submetidas a um novo processo de filtração usando o mesmo sistema de ultrafiltração. Um volume total de 100 uL (com 10% de heparina sódica) de meio condicionado foi infundido pela veia lateral da cauda.

4.7 CITOMETRIA DE FLUXO

A caracterização de CMMO foi realizada por citometria de fluxo. Para isso, CMMO na 6ª passagem, foram tripsinizadas e a suspensão celular foi lavada 2 vezes com solução salina 0,9%. Uma concentração de 5×10^5 células foi incubada a 4°C por 30 minutos com os seguintes anticorpos na concentração 1/50: CD90PE (CALTAG, Buncingham, Inglaterra), Sca1PE-Cy5 (CALTAG), CD45APC (CALTAG), CD34PE (CALTAG), CD44PE (CALTAG), CD11b (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), CD117PE (BD) e CD73PE (BD). Anticorpos isótipos idênticos foram utilizados como controles. Após incubação, foram realizadas mais duas lavagens com solução salina 0,9% e, em seguida, realizada a aquisição dos dados e análise no citômetro de fluxo LRS Fortessa (BD). Pelo menos 50.000 eventos foram coletados e analisados.

4.8 DIFERENCIAÇÃO DE CMMO

A capacidade de diferenciação das CMMO em adipócitos, condrócitos e osteócitos, foi investigada com a utilização de meio suplementado com fatores indutores de diferenciação específicos, na oitava passagem. Para a diferenciação adipogênica, CMMO foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo (10^4 células/poço). Após atingirem 50-60% de confluência (cerca de quatro semanas), todo o meio foi removido e substituído por meio de indução adipogênica StemPro *Adipogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o

processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado com meio completo. Para observar a deposição de gordura, após quinze dias em cultivo, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. Em seguida, foram coradas com solução de *Oil red* por 5 minutos e em 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, CMMO foram cultivadas com meio DMEM e 10% SBF em placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo (10^5 células/poço). Após atingirem 40-50% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas, durante 21 dias, com meio de diferenciação condrogênica *Stem Pro Chondrogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo. Para avaliação da síntese de proteoglicanos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com solução de *Alcian Blue* (GIBCO) em HCl 0,1N por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com solução de HCl 0,1N e, em seguida, foi adicionada água destilada para a neutralização da acidez. As imagens das células diferenciadas em condrocitos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics). Para diferenciação osteogênica, 5×10^5 CMMO foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo. Ao atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas por até 14 dias, com meio de diferenciação osteogênica *Stem Pro Osteogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada em microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo. A deposição de cálcio foi observada pela coloração com vermelho de Alizarina 2%. Após fixação em paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavagem com água destilada, as células foram coradas com solução de vermelho de Alizarina 2% por 3 minutos e, em seguida, foram realizadas duas lavagens com

água destilada. As imagens das células diferenciadas em osteoblastos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

4.9 COLETA DE MATERIAL PARA ELISA

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e imediatamente tiveram coletadas secções de 1 centímetro do nervo isquiático e secções da medula espinal na porção correspondente aos nervos lombares, L4 e L5, tomando como base a crista ilíaca e as demais referências anatômicas. O material foi retirado, pesado e refrigerado em criotubos plásticos a -70°C para posterior utilização. No momento da trituração para análise por ELISA foi acrescentado tampão para extração de citocinas, composto por NaCl (0,4M), BSA (0,05%), Tween 20 (0,05%), cloreto de benzetônio (0,1 mM), EDTA (10 mM), diluídos em TrisHCl (1 M; pH=7,5), e inibidor de proteases (Sigma-Aldrich) na proporção 1:300. As amostras foram trituradas com auxílio de homogeneizador de tecidos (Omni TH Tissue Homogenizer, OMNI International, USA), centrifugadas à 10.000 RPM (10 min, 4°C), o sobrenadante foi coletado e foi feita a quantificação de proteínas totais (BRADFORD, 1976) e a dosagem de citocinas por ELISA.

4.10 ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram quantificadas nas amostras de nervo isquiático e medula espinal pela técnica de ELISA sanduíche utilizando kits Duoset ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para cada citocina. Placas de 96 poços (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50 μL do anticorpo de captura (anticorpo monoclonal purificado anti-citocina investigada), diluído em PBS, a 4°C *overnight*. As placas foram lavadas três vezes com PBS 0,05% Tween 20, em seguida foram adicionados 100 μL da solução de PBS-BSA 1% e deixadas por 2 horas a temperatura ambiente com o objetivo de bloquear sítios não-específicos. As placas foram lavadas mais uma vez e incubadas com 50 μL das amostras por poço em duplicata e da citocina padrão em várias concentrações por 2 horas a 4°C . As placas foram novamente lavadas, foi

adicionado o anticorpo anti-citocina biotilado e as placas foram incubadas por mais duas horas a temperatura ambiente. Após as lavagens, foram adicionados 50 μL /poço de estreptoavidina diluída 1:200 por 20 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi revelada com 50 μL /poço de solução reveladora contendo 10 mL de tampão citrato-fosfato 1M, 2 μL de H_2O_2 e uma pastilha TMB (tetrametilbenzidina). O bloqueio da reação foi realizado pela adição de 50 μL /poço de ácido fosfórico 1:20. A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190 - Molecular Devices, California, EUA), no comprimento de onda indicado pelo fabricante do kit para cada citocina. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos comportamentais os resultados foram representados como média \pm EPM de 6 animais por grupo. Dados dos testes de von Frey e de Hargreaves foram comparados pelo teste 2-way ANOVA e diferenças entre grupos analisadas por Bonferroni. Nos demais ensaios os resultados foram expressos como média \pm EPM e analisados por ANOVA *one-way* seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

4.12 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.12.1 Grupos experimentais

Os animais utilizados neste trabalho foram assim agrupados:

- Naïve: animais que não sofreram nenhum tipo de manipulação no que concerne à cirurgia, anestesia ou manipulação do nervo isquiático ou região adjacente. Esse grupo objetivou avaliar a resposta do animal não-estimulado, em situação de homeostase.

- Sham: animais que foram submetidos à anestesia, incisão da pele, manipulação da musculatura e do nervo isquiático com exceção da ligadura. O objetivo deste grupo foi avaliar até que ponto as respostas comportamentais obtidas foram em decorrência do procedimento cirúrgico *per si*.
- Operado: refere-se aos animais que foram submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático, mas não receberam nenhum tipo de tratamento. Este grupo serviu como parâmetro de sucesso na indução no modelo e caracterização do modelo de neuropatia.
- Veículo: animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e que receberam como tratamento apenas o veículo – solução fisiológica e heparina sódica à 10% – em um volume de 100 µl via endovenosa (veia lateral da cauda). O veículo foi administrado no sétimo dia após a cirurgia, conforme ocorreu nos animais do grupo tratado, sob indução anestésica com 2,2,2-tribromoetanol nas mesmas condições para indução do modelo.
- CMMO: refere-se aos animais que receberam 1×10^6 CMMO na passagem 5 (P5), em um volume de 100 µl de salina e 10% de heparina sódica, por via endovenosa (veia lateral da cauda), no sétimo dia após a cirurgia de ligadura.
- MCd: animais que receberam meio condicionado por via endovenosa (veia lateral da cauda). O meio condicionado foi preparado a partir do sobrenadante da cultura de 1×10^6 CMMO na passagem 5 (P5), em um volume total de 100uL (contendo 10% de heparina sódica), e administrado no sétimo dia após a cirurgia.
- Gabapentina: animais que foram submetidos à cirurgia para ligadura do nervo isquiático e que receberam 70 mg/kg/150 µl de gabapentina por via oral, duas vezes ao dia, durante seis dias (QUINTÃO et al., 2005), diluídos em solução fisiológica. O tratamento teve início no sétimo dia após a cirurgia para ligadura do nervo isquiático. O objetivo deste grupo foi comparar os efeitos dos tratamentos baseados em CT com os efeitos do fármaco mais frequentemente utilizado para o controle da dor neuropática em humanos.
- Indometacina: animais que foram submetidos à cirurgia para ligadura do nervo e receberam 1 mg/kg/200 µl de indometacina por via intraperitoneal, duas vezes ao dia (BAUM et al., 2003), diluídos solução fisiológica. O tratamento teve duração de 4 dias e iniciou-se no sétimo dia após a cirurgia.

Este grupo teve por objetivo avaliar a presença de componente inflamatório no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática no modelo experimental utilizado.

Os animais foram mantidos no biotério em caixas apropriadas contendo 4 a 5 animais cada, e receberam marcações periódicas e exclusivas na cauda com canetas hidrográficas. Os grupos foram compostos por 6 (seis) animais cada.

4.12.2 Avaliação dos limiares nociceptivos mecânico e térmico

Os testes comportamentais para avaliação de limiar nociceptivo foram realizados conforme figuras 1, 2 e 3. As leituras foram iniciadas no dia anterior à cirurgia (Basal – B), foram retomadas 1 dia após a cirurgia e seguiram o esquema representado abaixo. Foi feita uma leitura de limiar nociceptivo mecânico e uma leitura de limiar nociceptivo térmico por dia para os grupos naïve, sham, operado, veículo, CMMO e MCd (Figura 1). Os grupos gabapentina e indometacina tiveram os limiares nociceptivos avaliados 1 hora antes e 1 hora depois da primeira administração do dia. Para o grupo gabapentina, o tratamento teve início no 7º dia após a cirurgia e perdurou até o 12º dia (6 dias), tendo sido realizado duas vezes ao dia, conforme figura 2. Para o grupo indometacina, o tratamento teve início no 7º dia, foi realizado até o 10º dia (4 dias) após a cirurgia e a droga foi administrada duas vezes ao dia, como na figura 3.

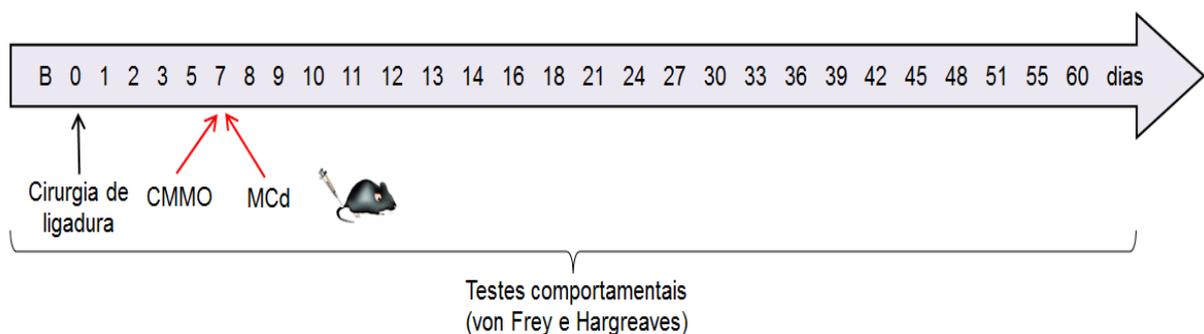


Figura 1. Delineamento experimental para avaliação dos limiares nociceptivos mecânico (filamentos de von Frey) e térmico (Hargreaves) dos grupos experimentais naïve, sham, operado, veículo, CMMO e MCd. A cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático foi realizada no dia 0 (zero) e o tratamento foi realizado no dia 7 (sete) para os grupos veículo, CMMO e MCd. Os grupos naïve, sham e operado não receberam tratamento.

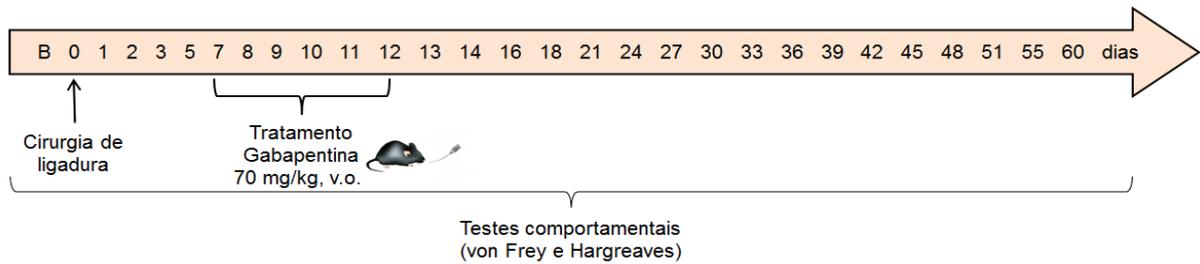


Figura 2. Delineamento experimental para avaliação dos limiares nociceptivos mecânico (filamentos de von Frey) e térmico (Hargreaves) do grupo experimental que recebeu gabapentina 70 mg/kg, v.o. A cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático foi realizada no dia 0 (zero) e o tratamento foi iniciado no dia 7 (sete) indo até o dia 12 (doze) após a cirurgia. A primeira avaliação de limiar ocorreu 1 hora antes da primeira dose e a segunda avaliação ocorreu 1 hora após o primeiro tratamento do dia.

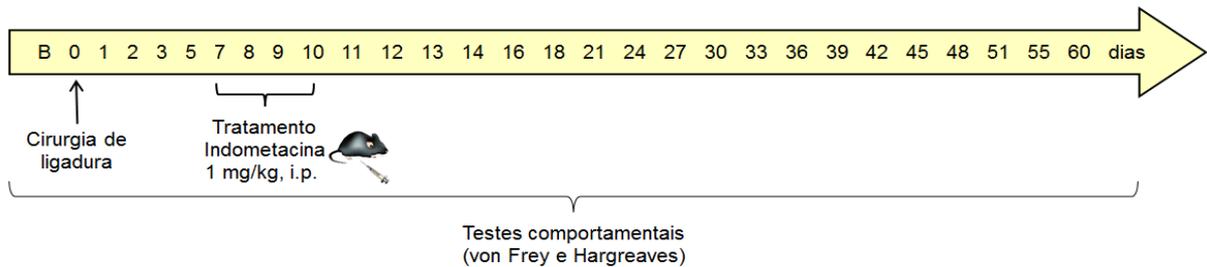


Figura 3. Delineamento experimental para avaliação dos limiares nociceptivos mecânico (filamentos de von Frey) e térmico (Hargreaves) do grupo experimental que recebeu indometacina 1 mg/kg, i.p. A cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático foi realizada no dia 0 (zero) e o tratamento foi iniciado no dia 7 (sete) até o dia 10 (dez) após a cirurgia. A primeira avaliação ocorreu 1 hora antes da primeira dose e a segunda avaliação ocorreu 1 hora após o primeiro tratamento do dia.

4.12.3 Coleta de tecidos para quantificação de citocinas

Após a realização dos ensaios comportamentais, que estabeleceram o perfil do modelo e os efeitos dos diferentes tratamentos, foram realizadas as coletas de tecidos. Foram coletadas seções de medula espinal, na porção correspondente a L4 e L5, e um centímetro do nervo isquiático no sítio de lesão (ipsilateral) de animais ($n=6$) de todos os grupos experimentais para quantificação de citocinas. O esquema cronológico de coletas pode ser visualizado na figura 4, e segue descrito abaixo.

Grupo naïve: coleta no dia 0 (D0).

Grupo sham: coletas nos dias 7, 21 e 60 (D7, D21, D60) após a cirurgia.

Grupo operado: coleta no dia 7 (D7) após a cirurgia.

Grupos veículo, CMMO e MCd: coletas nos dias 21 e 60 (D21, D60) após a cirurgia.

Grupos indometacina e gabapentina: coletas nos dias 12 (D12) e 14 (D14), respectivamente, o que equivale à 36 horas depois da administração da última dose.

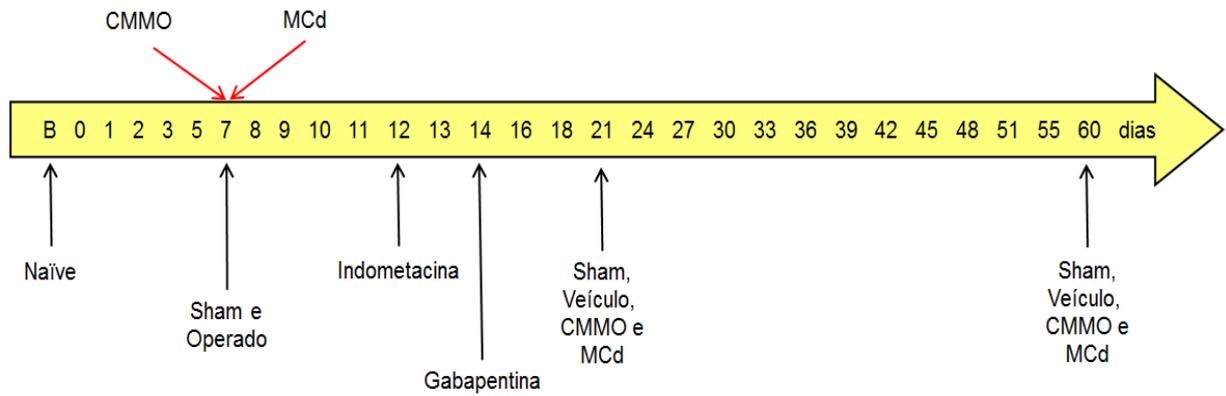


Figura 4. Esquema de coleta de tecidos para análise dos níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α) por ELISA.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE CMMO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Inicialmente foram realizados o isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea e a presença de marcadores celulares característicos deste tipo celular foi analisada por citometria de fluxo. Os resultados desta análise podem ser visualizados na tabela 1, onde é possível verificar a alta porcentagem de células positivas para os marcadores Sca-1, CD44 e CD90, e a baixa taxa de células positivas para CD11B, CD45, CD34, CD117 e CD73, conforme esperado para a caracterização das células mesenquimais.

Tabela 1. Caracterização de CMMO por citometria de fluxo

Marcador celular	Células positivas para os marcadores (%)
Sca-1	96,6
CD44	98,2
CD90	93,0
CD11B	5,1
CD45	0,6
CD34	13,4
CD117	1,5
CD73	1,3

5.2 DIFERENCIAÇÃO DE CMMO *IN VITRO* NAS LINHAGENS ADIPOGÊNICA, CONDROGÊNICA E OSTEOGÊNICA

As culturas de CMMO foram estimuladas à diferenciação em diferentes linhagens. Após 15 dias em cultivo, as células que foram estimuladas à diferenciação em adipócitos e coradas em *oil red*, apresentaram a deposição de gordura característica desta linhagem (figura 5A). Para as células que foram estimuladas a se diferenciarem em condrócitos, pode-se observar que, após 21 dias de cultivo, houve coloração de proteoglicanos, produzidos por estas células,

marcados com o corante *Alcian Blue* (figura 5C). Já a figura 5E, demonstra a diferenciação osteogênica, com a visualização de depósitos de cálcio evidenciados pelo corante vermelho de Alizarina a 2%, após 14 dias de cultivo. As figuras 5B, 5D e 5F mostram células mesenquimais que não foram estimuladas à diferenciação coradas com *oil red*, *Alcian blue* e vermelho de Alizarina 2%, respectivamente. Pode-se observar que para estes controles não houve produção de gordura, proteoglicanos ou depósito de cálcio.

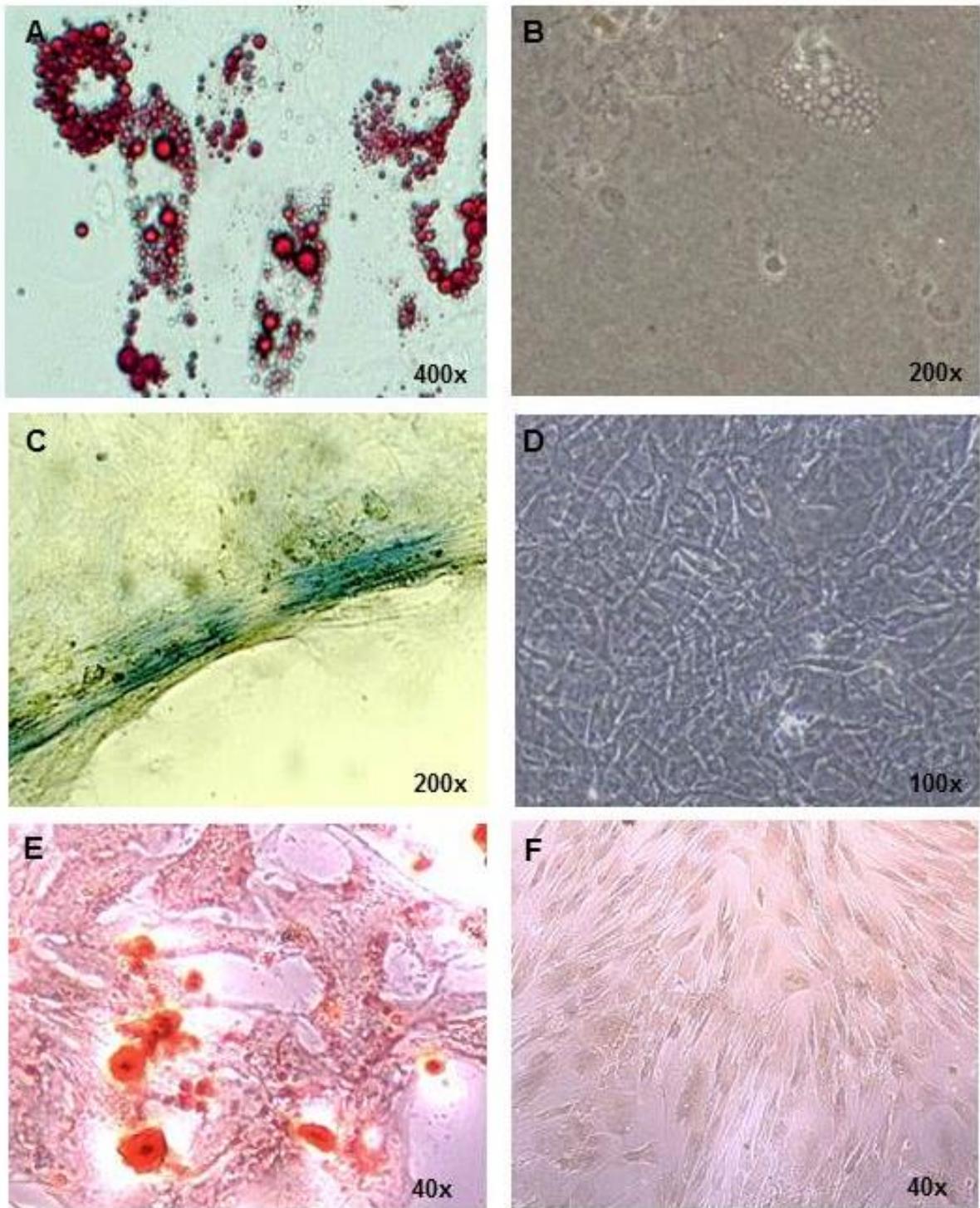


Figura 5. Fotomicrografias de CMMO induzidas à diferenciação. A) Diferenciação adipogênica, coloração *Oil red*. B) CMMO não induzidas à diferenciação e coradas com *Oil red*. C) Diferenciação condrogênica, coloração *Alcian blue*. D) CMMO não induzidas à diferenciação e coradas com *Alcian blue*. E) Diferenciação osteogênica, coloração vermelho de Alizarina 2%. F) CMMO não induzidas à diferenciação e coradas com vermelho de Alizarina 2%.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE DN POR LIGADURA DO NERVO ISQUIÁTICO

5.3.1. Evolução do limiar nociceptivo

Inicialmente, o perfil comportamental de neuropatia foi estabelecido no modelo de ligadura de nervo, avaliando-se o limiar nociceptivo mecânico e térmico dos camundongos, para evidenciar o desenvolvimento de alodinia mecânica e hiperalgesia térmica, respectivamente. As figuras 6 e 7 mostram que um dia após a indução do modelo houve uma redução significativa ($p < 0,001$) do limiar nociceptivo mecânico e térmico, respectivamente, nos animais que sofreram a cirurgia de ligadura, em comparação aos animais falso operados (grupo sham). A redução dos limiares nociceptivos foi observada por até 51 dias após a indução do modelo, para o limiar mecânico, e 45 dias para o limiar térmico. Entre os grupos sham e naïve não houveram diferenças estatísticas durante o período experimental. Esses resultados indicam sucesso na indução do modelo experimental de dor neuropática periférica.

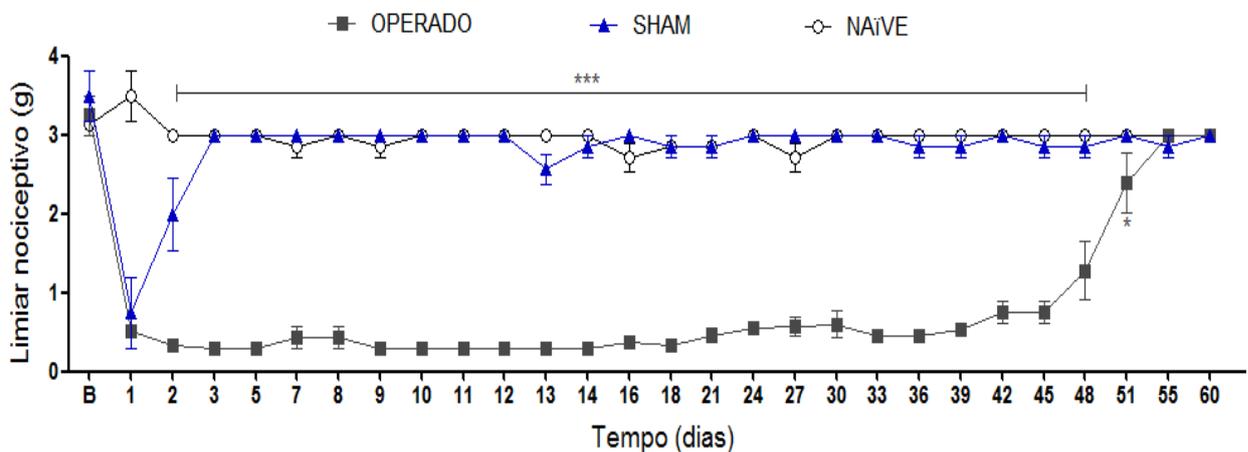


Figura 6. Avaliação do limiar nociceptivo mecânico da pata ipsilateral de animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático (grupo operado), de animais falso operados (grupo sham) e dos que não sofreram manipulação cirúrgica (naïve). O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio de todos os animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia. O eixo das ordenadas representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo sham pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

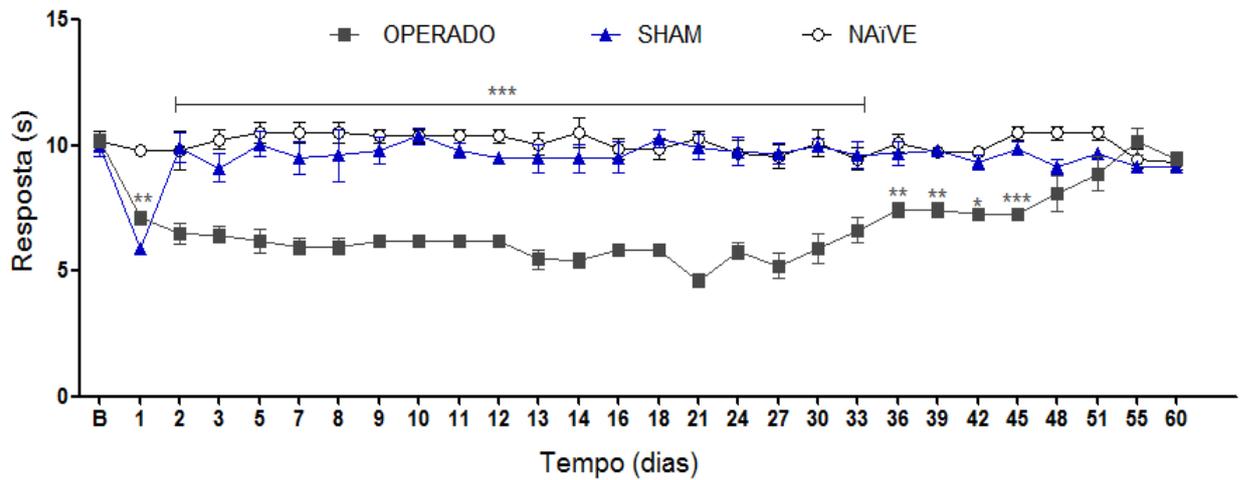


Figura 7. Avaliação do limiar nociceptivo térmico da pata ipsilateral de animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático (grupo operado), de animais falso operados (grupo sham) e dos que não sofreram manipulação cirúrgica (naíve). O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio dos animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia. O eixo das ordenadas representa a resposta nociceptiva em segundos (s), ou seja, o tempo que o animal leva para retirar a pata, após o início do estímulo térmico. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo sham pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.3.2 Evolução do peso corporal

Durante todo o período experimental, os animais tiveram seus pesos corporais monitorados. A evolução do peso no modelo de ligadura de nervo está representada na figura 8. Percebe-se que há uma redução do ganho de peso no grupo operado, em relação aos demais grupos ao longo do tempo, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos tempos de 21 e 60 dias.

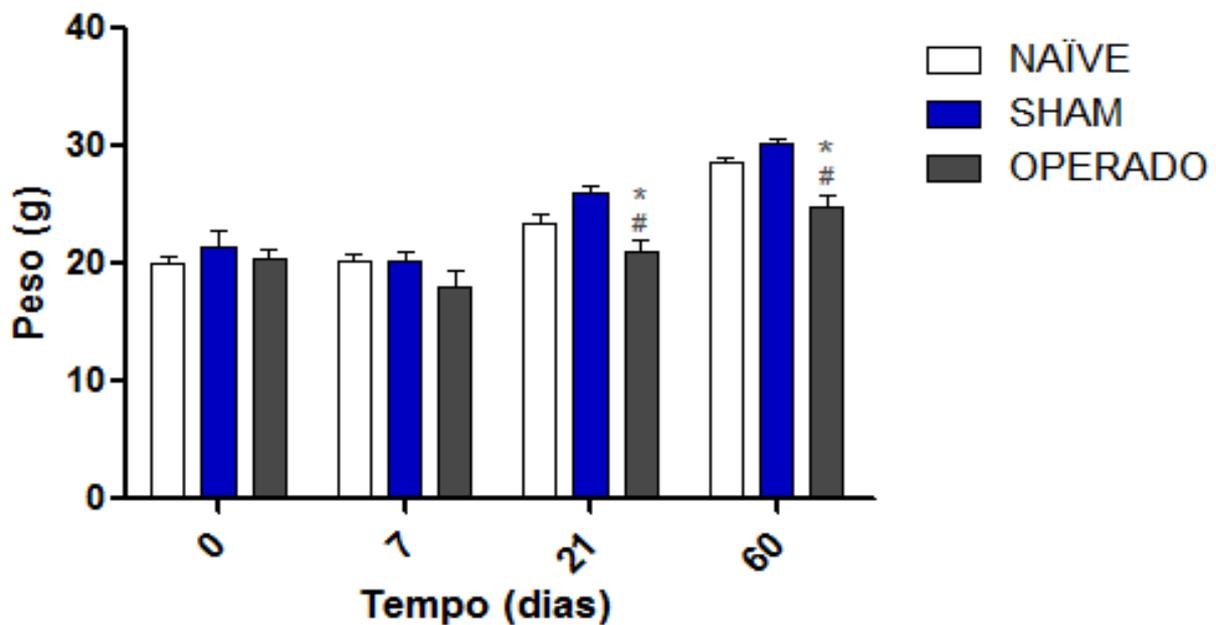


Figura 8. Comparação do ganho de peso corporal durante o período experimental no modelo de ligadura do nervo isquiático. Os grupos naíve, sham e operado referem-se, respectivamente, a animais sem nenhum procedimento experimental, a animais falso operados e a animais submetidos à cirurgia de indução do modelo. O ponto 0 refere-se ao dia anterior à cirurgia, enquanto os pontos 7, 21 e 60 aos dias após a cirurgia de ligadura. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. * $p < 0,05$, comparado ao grupo naíve; # $p < 0,05$, comparado ao grupo sham, pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.3.3 Evolução da função motora

Visando investigar se o modelo de ligadura de nervo isquiático utilizado neste trabalho poderia causar comprometimento motor e, assim, influenciar as respostas nociceptivas dos animais, foi realizado o teste de rota-rod. A figura 9 mostra a média de tempo em segundos que cada grupo de animais foi capaz de permanecer na barra giratória do equipamento. A cirurgia de ligadura do nervo isquiático não alterou a capacidade motora dos animais, já que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos naïve, sham e operado. O diazepam (10 mg/kg), utilizado como controle positivo do teste, reduziu significativamente o tempo de permanência dos camundongos no rota-rod ($p < 0,001$).

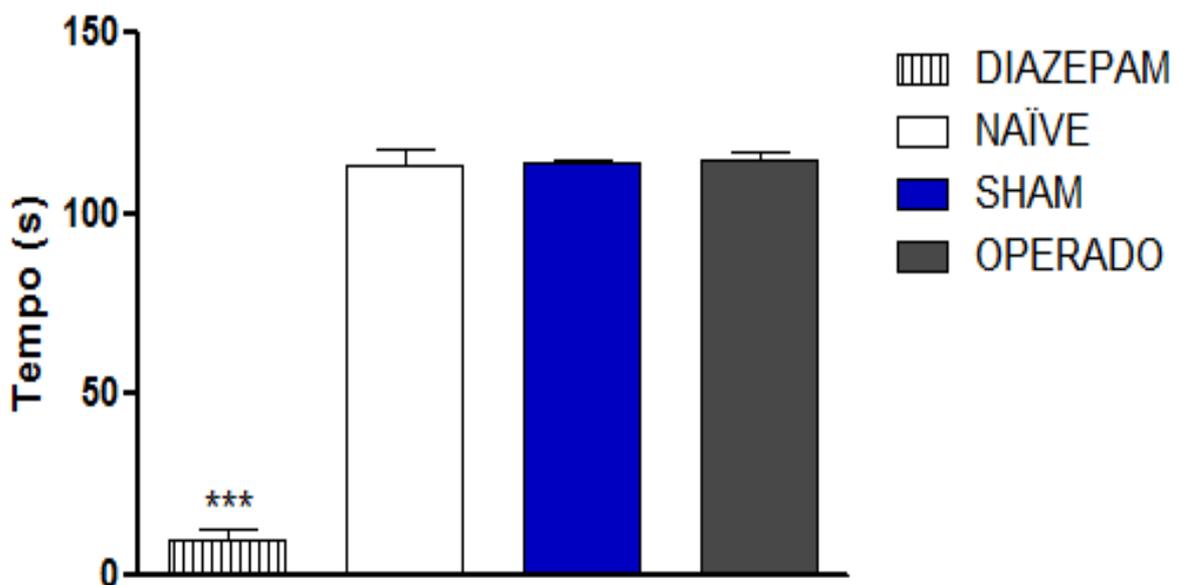


Figura 9. Comparação da função motora entre grupos durante o período experimental no modelo de ligadura do nervo isquiático. Os grupos naïve, sham e operado referem-se, respectivamente, a animais sem nenhum procedimento experimental, a animais falso operados e a animais submetidos à cirurgia de indução do modelo. O grupo diazepam refere-se aos animais que receberam a droga diazepam (10 mg/kg, i.p., 30 min antes do teste), utilizada como droga de referência no teste. O teste foi realizado no sétimo dia após a indução do modelo. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$, comparado ao grupo naïve, pelo teste *one-way* ANOVA seguido de *Tukey*.

5.4. EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE A NEUROPATIA

5.4.1 Efeitos sobre o limiar nociceptivo

O efeito da administração do MCd sobre o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado e comparado aos efeitos dos tratamentos com CMMO, indometacina e gabapentina (figura 10). A partir de dois dias após a indução do modelo houve diferença estatística ($p < 0,01$) entre o grupo sham e os demais em relação ao limiar nociceptivo mecânico nos animais, indicando o desenvolvimento de alodinia mecânica, que caracteriza a neuropatia periférica. Uma única administração do MCd, no dia 7 após a cirurgia de ligadura, aumentou o limiar nociceptivo mecânico de modo estatisticamente significativo duas horas após sua administração ($p < 0,001$). Esse efeito antinociceptivo se manteve por 29 dias após o tratamento (tempo de 36 dias). A administração de CMMO aumentou o limiar nociceptivo mecânico dos animais operados de forma progressiva, mas apenas detectável estatisticamente ($p < 0,001$) 6 dias após o tratamento (dia 13 após a cirurgia). A partir daí, esse efeito foi mantido até o fim do período experimental ($p < 0,01$). O tratamento repetido com indometacina (1 mg/kg; i.p.; 12/12h; 4 dias) e a gabapentina (70 mg/kg; v.o.; 12/12h; 6 dias) produziu efeito antinociceptivo nos animais neuropáticos, mas apenas durante o período de tratamento sendo esse efeito rapidamente revertido após o fim das administrações.

O limiar nociceptivo térmico também foi comparado entre os grupos que receberam os diversos tratamentos (figura 11). O MCd foi capaz de reverter a hiperalgesia térmica em apenas duas horas após sua administração ($p < 0,001$). Este efeito se manteve durante todo o período experimental, mostrando ser duradouro. A administração de CMMO foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo térmico dos animais ($p < 0,001$) no dia seguinte à administração, efeito que também se manteve até o fim do período experimental. Gabapentina (70 mg/kg; v.o.; 12/12h; 6 dias) e indometacina (1 mg/kg; i.p.; 12/12h; 4 dias) foram capazes de reverter apenas temporariamente a hiperalgesia térmica dos animais neuropáticos ($p < 0,001$). Os limiares nociceptivos térmicos para estes grupos retornaram a valores similares aqueles dos animais tratados com veículo após o fim das administrações destas drogas.

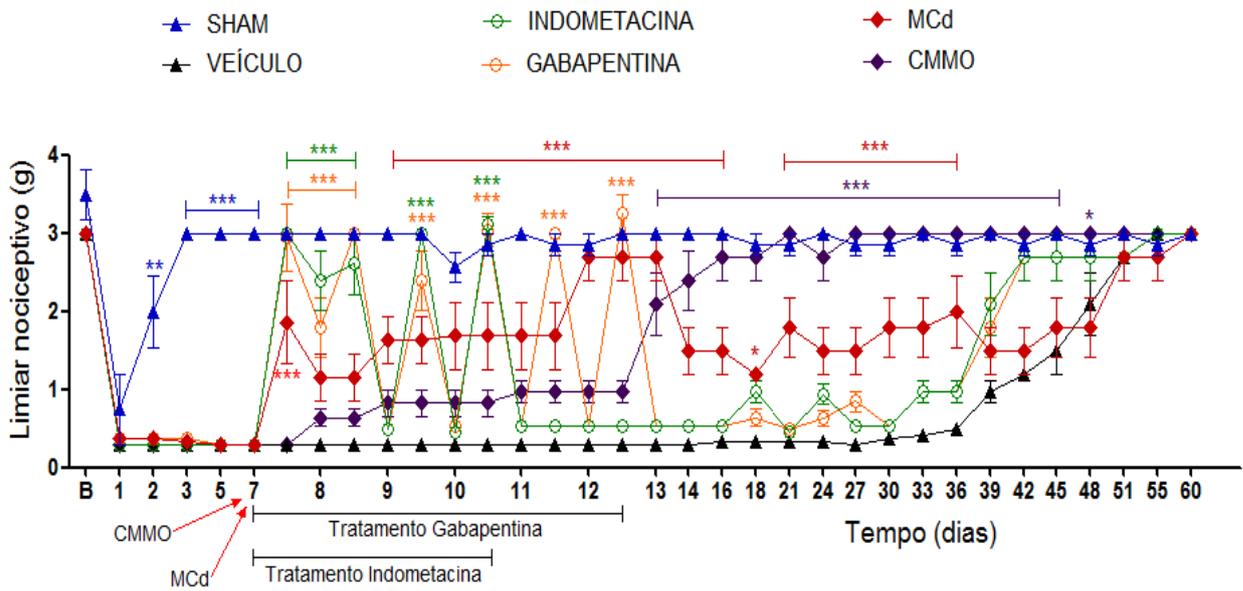


Figura 10. Efeito do meio condicionado (MCd), de células mesenquimais de medula óssea (CMMO) e do tratamento repetido com gabapentina ou indometacina sobre o limiar nociceptivo mecânico na neuropatia experimental. O limiar nociceptivo foi avaliado na pata ipsilateral dos camundongos antes e depois da indução do modelo de neuropatia por ligadura do nervo isquiático. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio dos animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia. O eixo das ordenadas representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações. O tratamento com MCd (100 uL), CMMO (1×10^6 ; 100 uL) ou veículo (100 uL) foi realizado por via endovenosa uma única vez no dia 7. O tratamento com gabapentina (70 mg/kg v.o./12h) iniciou-se no dia 7 e durou até o dia 12 (duração de seis dias). O tratamento com indometacina (1 mg/kg, i.p./12h), iniciou-se no dia 7 e durou até o dia 10 (duração de quatro dias). Para os grupos gabapentina e indometacina as avaliações do limiar nociceptivo foram feitas uma hora antes e uma hora após o primeiro tratamento do dia. Valores representam a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo, analisados pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

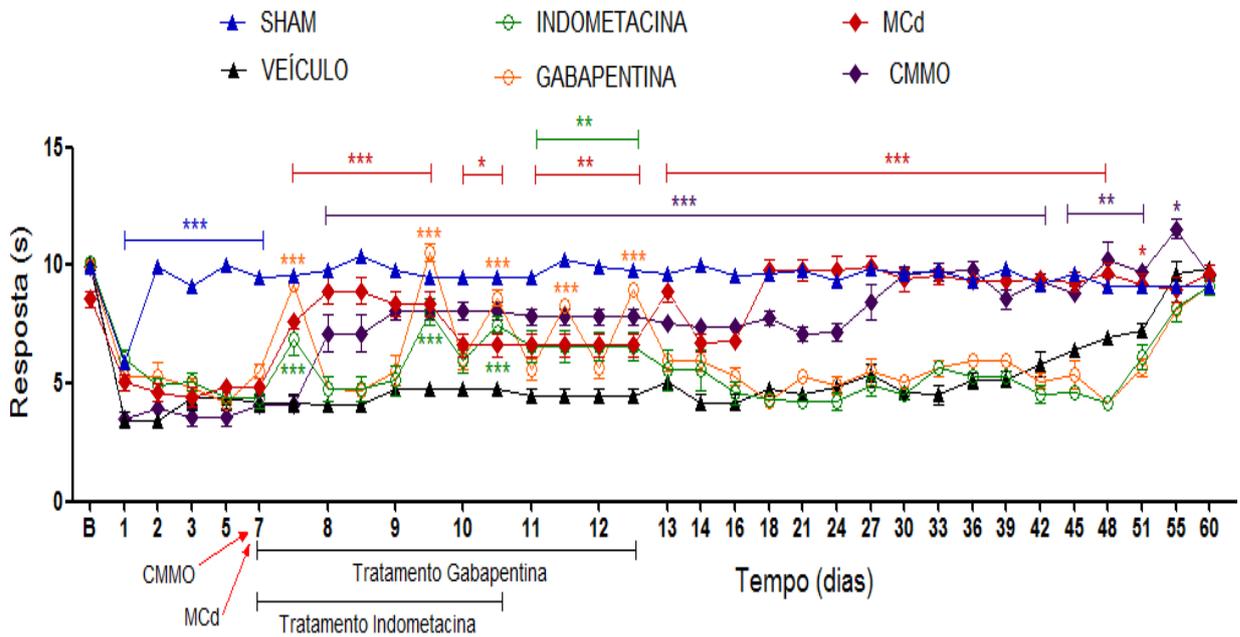


Figura 11: Efeito do meio condicionado (MCd), de células mesenquimais de medula óssea (CMMO) e do tratamento repetido com gabapentina ou indometacina sobre o limiar nociceptivo térmico na neuropatia experimental. O limiar nociceptivo foi avaliado na pata ipsilateral dos animais antes e depois da indução do modelo de neuropatia por ligadura do nervo isquiático. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio dos animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia. O eixo das ordenadas representa o limiar nociceptivo em segundos (s), ou seja, o tempo que o animal leva para retirar a pata após o início do estímulo térmico. O tratamento com MCd (100 μ L), CMMO (1×10^6 ; 100 μ L) ou veículo (100 μ L) foi realizado por via endovenosa uma única vez no dia 7. O tratamento com gabapentina (70 mg/kg v.o./12h) iniciou-se no dia 7 e durou até o dia 12 (duração de seis dias). O tratamento com indometacina (1 mg/kg, i.p./12h), iniciou-se no dia 7 e durou até o dia 10 (duração de quatro dias). Para os grupos gabapentina e indometacina as avaliações do limiar nociceptivo foram feitas uma hora antes e uma hora após o primeiro tratamento do dia. Valores representam a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparado com o grupo veículo, analisados pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.4.2 Efeito sobre o peso corporal

A variação do peso corporal nos diferentes grupos experimentais e ao longo do tempo está representada na figura 12. É possível constatar que há uma redução do ganho de peso no grupo veículo em relação ao grupo sham (falso operado) ($p < 0,001$) nos dias 21 e 60, indicando que a redução de ganho de peso está, de fato, relacionada ao desenvolvimento de neuropatia. Por outro lado, pode-se observar que os animais tratados com MCd, CMMO e indometacina apresentam um maior ganho de peso em comparação ao grupo veículo já no dia 10 após a cirurgia (3 dias após o início dos tratamentos) ($p < 0,001$ e $p < 0,01$). Resultado similar pode ser observado no tempo de 21 dias ($p < 0,001$) para os mesmos grupos. Já no tempo de 60 dias, os grupos estatisticamente diferentes dos veículos são indometacina e CMMO ($p < 0,001$).

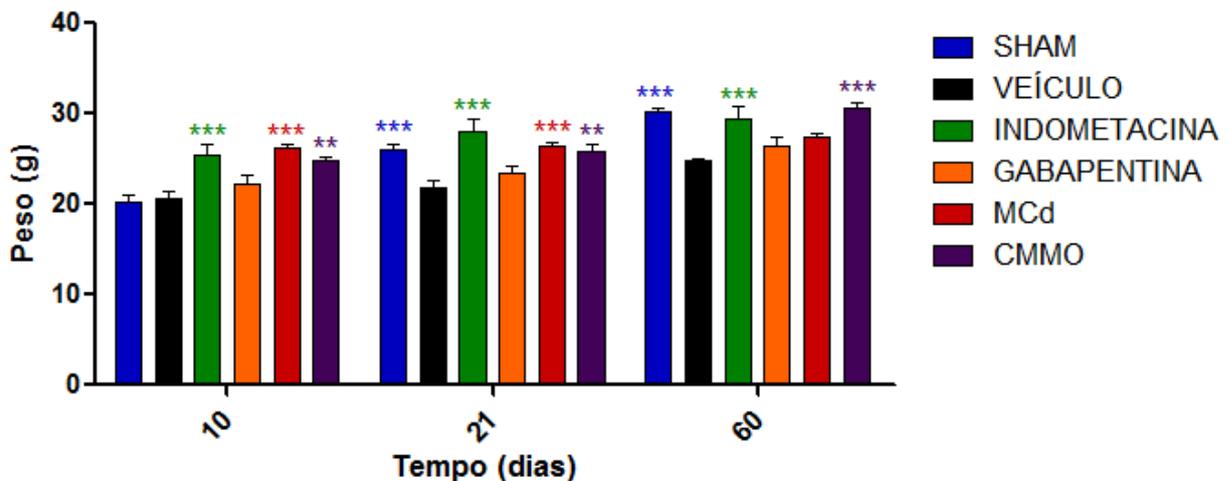


Figura 12. Variação do peso corporal durante o período experimental no modelo de ligadura do nervo isquiático. O eixo Y mostra o peso, em gramas, dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. O eixo X representa os tempos nos quais os pesos dos animais foram avaliados. Os tempos 10, 21 e 60 correspondem, respectivamente, aos dias 10, 21 e 60 após a cirurgia. Os tratamentos foram realizados, ou iniciados, no dia 7. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparado ao grupo veículo pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.4.3 Efeito sobre a função motora

O efeito dos tratamentos sobre a função motora dos animais foi analisado e os resultados estão representados na figura 13. A cirurgia de ligadura do nervo isquiático não alterou a capacidade motora dos animais. Como esperado, o diazepam (10 mg/kg), utilizado como controle positivo do teste, reduziu significativamente o tempo de permanência dos camundongos no rota-rod ($p < 0,001$). Para os demais tratamentos (indometacina, gabapentina, MCd e CMMO) não foram observadas alterações motoras nos animais.

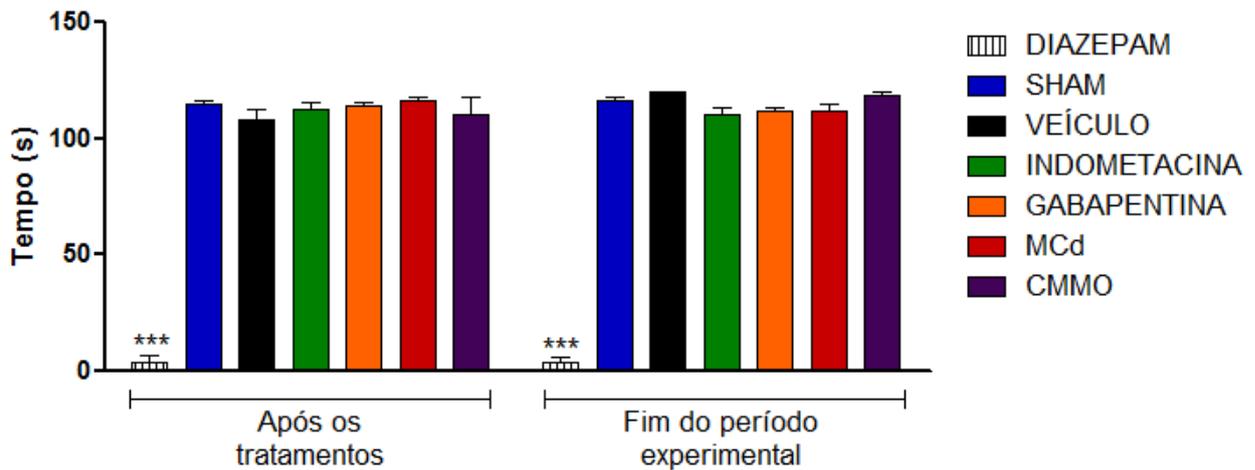


Figura 13. Efeitos dos tratamentos sobre a função motora na neuropatia experimental. O eixo Y representa o tempo (segundos) em que os animais conseguem permanecer na barra giratória. O primeiro grupo de colunas representa o teste de rota-rod realizado no dia 12 para o grupo indometacina - 1 mg/kg, i.p. (fim do tratamento diário); no dia 14 para o grupo gabapentina - 70 mg/kg v.o. (fim do tratamento diário) e no dia 7 (2 horas depois do tratamento com CMMO e MCd). Para todos os grupos, a função motora foi analisada também no tempo de 60 dias (fim do período experimental) após a ligadura do nervo isquiático. Diazepam (10mg/kg), utilizado como droga de referência, foi administrado por via intraperitoneal 30 antes da realização do teste. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$, comparado ao grupo veículo, pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.5 EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE A EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA NEUROPATIA EXPERIMENTAL

A contribuição de citocinas, produzidas periférica e centralmente, para a indução e manutenção da dor neuropática tem sido amplamente reconhecida. Com o intuito de investigar se o tratamento com o MCd produz efeito antinociceptivo associado a uma modificação no padrão fisiopatológico da neuropatia, os níveis de citocinas foram quantificados no nervo lesado e na medula espinal. Segmentos de medula espinal e nervo isquiático de animais dos diferentes grupos experimentais foram coletados e os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram determinados nessas amostras por ELISA. Os resultados estão representados nas figuras de 14 a 21. Nessas figuras, os painéis A representam dados de tempos diferentes, a depender do protocolo de tratamento de cada grupo experimental. O objetivo dessa análise é avaliar uma possível modulação dos níveis de citocinas por cada tratamento, correlacionando ao efeito antinociceptivo. Assim, para os grupos tratados com fármacos as avaliações foram feitas 36 h após o fim das administrações repetidas. Para os grupos tratados com MCd, veículo ou CMMO as avaliações foram feitas 14 dias após sua administração (dia 21 após a indução do modelo). Os painéis B mostram dados do final do período experimental, ou seja, no tempo de 60 dias após a indução do modelo. O objetivo dessas análises é avaliar se os tratamentos induzem uma modulação duradoura dos níveis de citocinas. Os eixos y representam a quantificação de cada citocina por miligrama de proteína.

5.5.1 Efeitos dos tratamentos sobre a expressão de citocinas na medula espinal

5.5.1.1 IL-1 β

Os níveis espinais de IL-1 β foram aumentados em animais neuropáticos, em relação aos não neuropáticos dos grupos sham e naive nos tempos de 21 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) e 60 ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) dias após a indução do modelo (Figura 14). A administração de MCd foi capaz de diminuir os níveis espinais de IL-1 β aos 21 ($p < 0,05$) e 60 ($p < 0,001$) dias após a cirurgia, nos animais operados, em comparação ao veículo. Este efeito também foi observado para o tratamento com CMMO ($p < 0,001$ e $p < 0,01$). Já para os tratamentos com drogas, a indometacina foi capaz de diminuir os níveis de IL-1 β ($p < 0,05$) nos dois tempos analisados, enquanto para a gabapentina não foram detectadas diferenças estatísticas nas quantidades espinais de IL-1 β , em comparação com o grupo veículo. Nesses grupos as avaliações foram feitas nos dias 12 e 14, respectivamente, correspondendo à 36 horas após a última administração destas drogas.

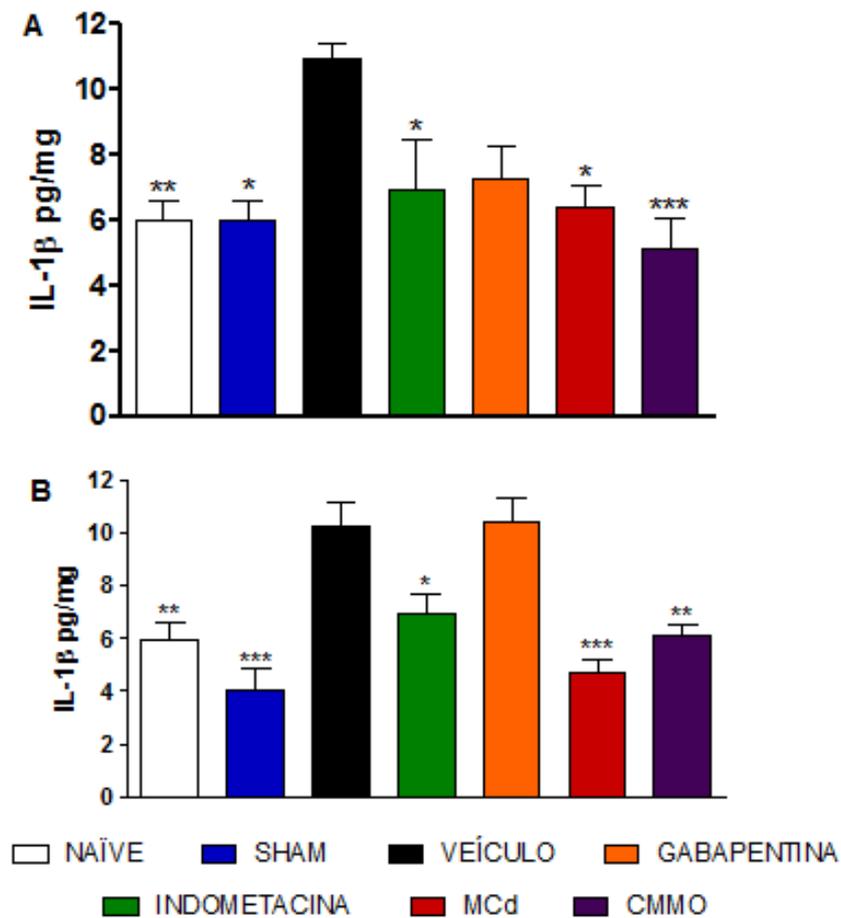


Figura 14. Quantificação da citocina IL-1 β nos segmentos L4-L5 das medulas espiniais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. A. Análise realizada em diferentes tempos, de acordo com cada tratamento: dia 7 para os grupos sham e naive, dia 12 para o grupo indometacina, dia 14 para o grupo gabapentina e dia 21 para os grupos MCd, CMMO e veículo. B. Análise realizada no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). Valores apresentados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparados com o grupo veículo, analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Tukey.

5.5.1.2 IL-6

Os níveis espinais de IL-6 foram aumentados em animais neuropáticos, em relação aos não neuropáticos ($p < 0,001$) nos tempos de 21 e 60 dias após a indução do modelo (Figura 15). A administração do MCd diminuiu os níveis espinais de IL-6 ($p < 0,05$) em animais neuropáticos, apenas no final do período experimental, enquanto o tratamento com CMMO reduziu a IL-6 espinal tanto no tempo de 21 quanto de 60 dias ($p < 0,01$). A indometacina reduziu IL-6 na medula espinal de animais neuropáticos apenas 36h após o fim de sua administração repetida ($p < 0,001$), enquanto a gabapentina reduziu no fim do período experimental ($p < 0,001$).

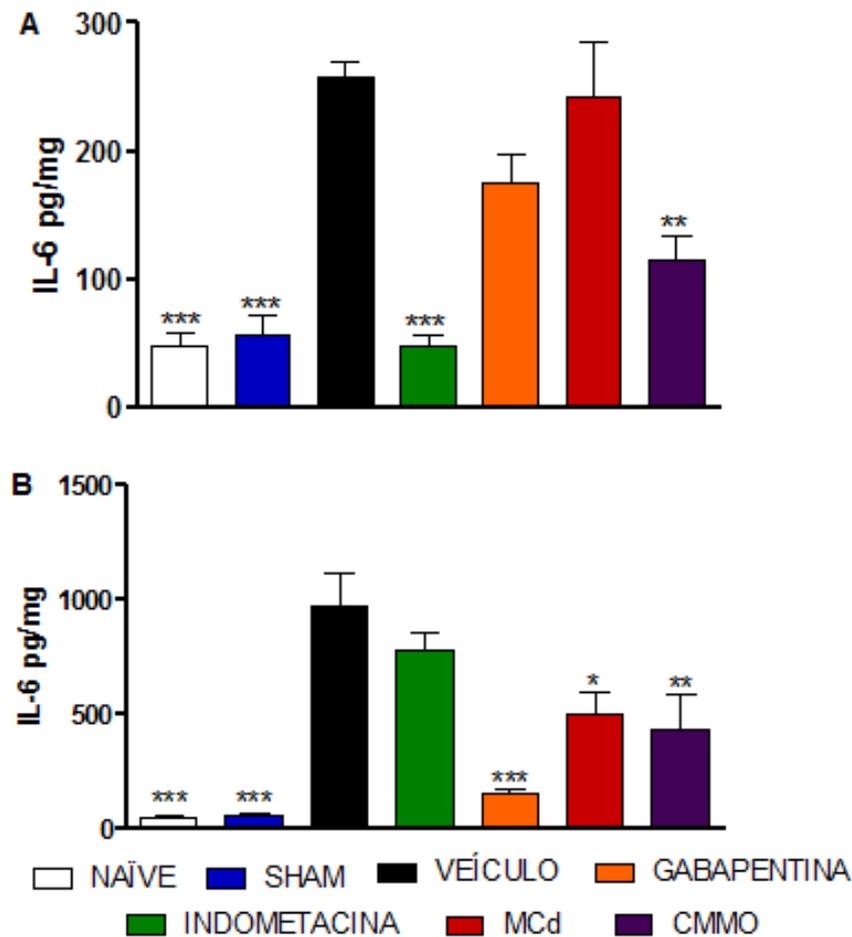


Figura 15. Quantificação da citocina IL-6 nos segmentos L4-L5 das medulas espinais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. A. Análise realizada em diferentes tempos, de acordo com cada tratamento: dia 7 para os grupos sham e naïve, dia 12 para o grupo indometacina, dia 14 para o grupo gabapentina e dia 21 para os grupos MCd, CMMO e veículo. B. Análise realizada no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). Valores apresentados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparados com o grupo veículo, analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Tukey.

5.5.1.3 TNF- α

Os níveis espinais de TNF- α foram aumentados em animais neuropáticos, em relação aos não neuropáticos dos grupos sham e naive ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) apenas no tempo de 21 dias após a indução do modelo (Figura 16). O tratamento com MCd foi o único capaz de diminuir os níveis desta citocina no fim do período experimental ($p < 0,05$). As CMMO se mostraram capazes de reduzir os níveis de TNF- α no tempo de 21 dias ($p < 0,05$), mas não no tempo de 60 dias. Em relação ao tratamento com drogas, indometacina e gabapentina reduziram os níveis de TNF- α ($p < 0,01$) apenas 36 horas após as administrações repetidas.

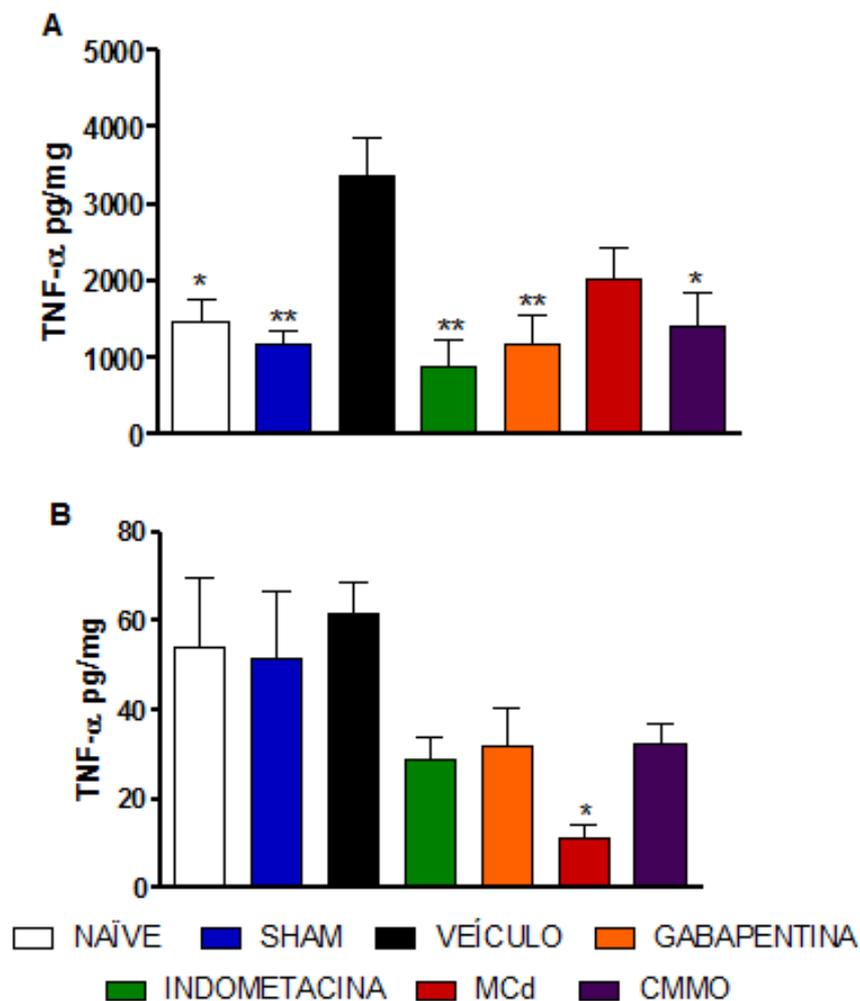


Figura 16. Quantificação da citocina TNF- α nos segmentos L4-L5 das medulas espinais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. A. Análise realizada em diferentes tempos, de acordo com cada tratamento: dia 7 para os grupos sham e naive, dia 12 para o grupo indometacina, dia 14 para o grupo gabapentina e dia 21 para os grupos MCd, CMMO e veículo. B. Análise realizada no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). Valores apresentados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparados com o grupo veículo, analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Tukey.

5.5.1.4 IL-10

Os efeitos dos diferentes tratamentos sobre IL-10 foram representados na figura 17. Os níveis espinais de IL-10 nos animais do grupo sham se apresentaram aumentados ($p < 0,01$) no tempo de 60 dias em relação ao grupo veículo. O MCd foi o único tratamento capaz de aumentar de modo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 no tempo de 21 dias após a indução da neuropatia. Não foram observadas diferenças estatísticas para o tratamento com CMMO em relação ao grupo veículo. No tempo de 60 dias, fim do período experimental, um aumento espinal da citocina IL-10 foi observado no grupo indometacina ($p < 0,01$).

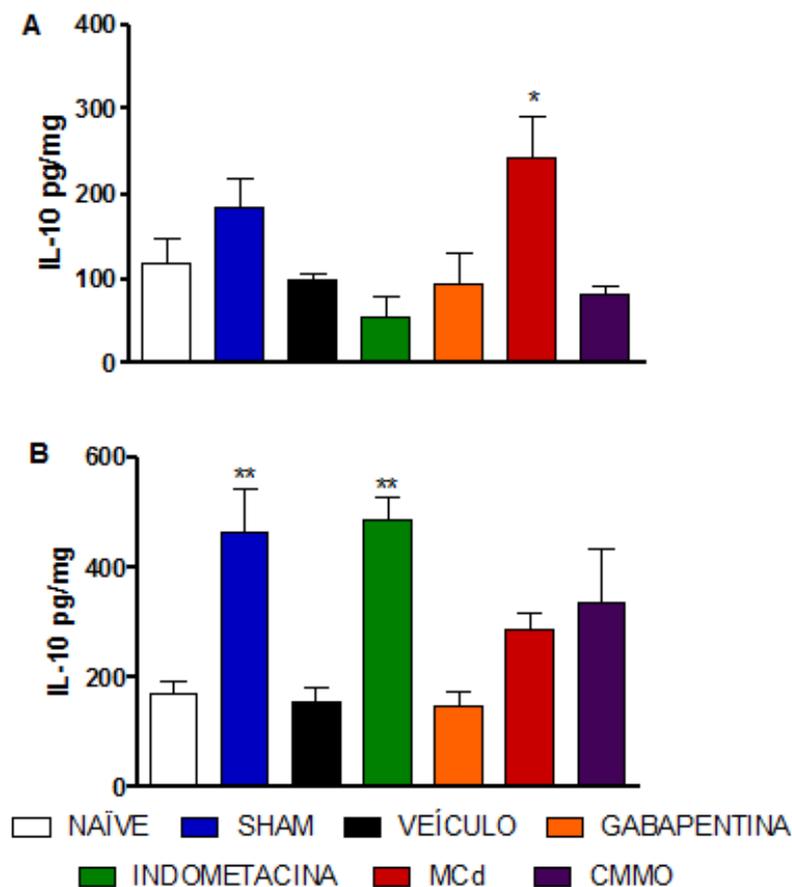


Figura 17. Quantificação da citocina IL-10 nos segmentos L4-L5 das medulas espinais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. A. Análise realizada em diferentes tempos, de acordo com cada tratamento: dia 7 para os grupos sham e naive, dia 12 para o grupo indometacina, dia 14 para o grupo gabapentina e dia 21 para os grupos MCd, CMMO e veículo. B. Análise realizada no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). Valores apresentados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparados com o grupo veículo, analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Tukey.

5.5.2. Efeito dos tratamentos sobre a expressão de citocinas no nervo isquiático

5.5.2.1 IL-1 β

Os níveis de IL-1 β no nervo isquiático foram aumentados em animais neuropáticos, em relação aos não neuropáticos ($p < 0,001$) nos tempos de 21 e 60 dias após a indução do modelo (Figura 18). A administração do MCd diminuiu os níveis de IL-1 β no nervo isquiático de animais neuropáticos tanto no tempo de 21 ($p < 0,01$) quanto no de 60 dias ($p < 0,05$), enquanto que o tratamento com CMMO reduziu IL-1 β no nervo isquiático apenas no final do período experimental ($p < 0,05$). O tratamento com indometacina e gabapentina modulou IL-1 β no nervo isquiático apenas no tempo de 36 horas após o fim das administrações repetidas ($p < 0,05$, para ambos os tratamentos).

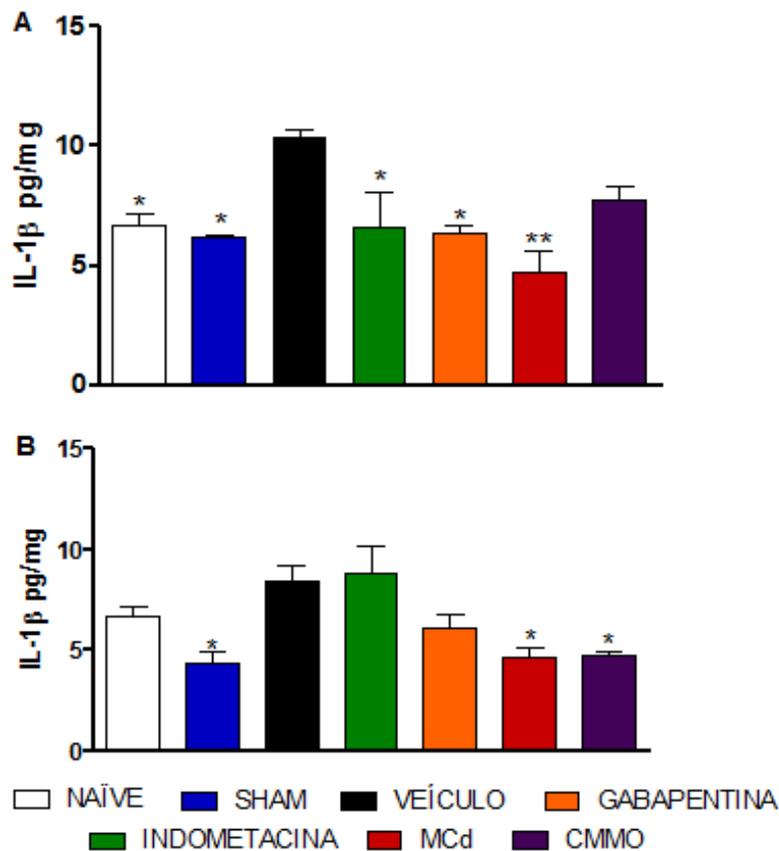


Figura 18. Quantificação da citocina IL-1 β nos nervos isquiáticos ipsilaterais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. A. Análise realizada em diferentes tempos, de acordo com cada tratamento: dia 7 para os grupos sham e naive, dia 12 para o grupo indometacina, dia 14 para o grupo gabapentina e dia 21 para os grupos MCd, CMMO e veículo. B. Análise realizada no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). Valores apresentados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparados com o grupo veículo, analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Tukey.

5.5.2.2. IL-6

Os níveis da citocina IL-6 se mostraram diminuídos nos animais não neuropáticos (figura 19) em relação aos neuropáticos no período de 21 dias ($p < 0,001$). Os tratamentos com MCd e CMMO reduziram significativamente ($p < 0,001$) os níveis de IL-6 nos nervos dos camundongos no tempo de 21 dias. Do mesmo modo, os tratamentos com indometacina e gabapentina reduziram significativamente ($p < 0,001$) os níveis de IL-6 nos nervos, na análise feita 36 horas após o fim das administrações repetidas. No período final (60 dias), apenas indometacina reduziu os níveis de IL-6 ($p < 0,05$).

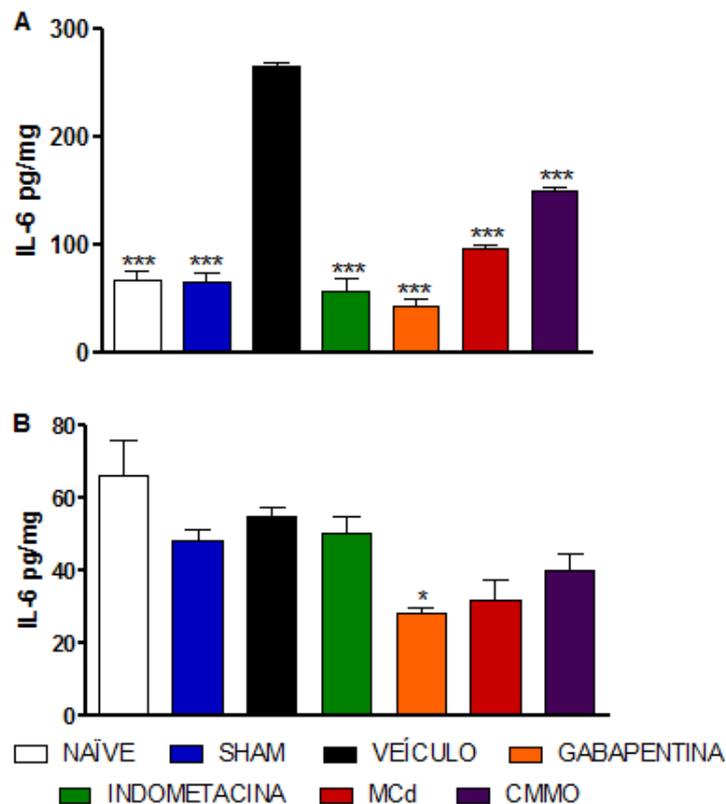


Figura 19. Quantificação da citocina IL-6 nos nervos isquiáticos ipsilaterais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. A. Análise realizada em diferentes tempos, de acordo com cada tratamento: dia 7 para os grupos sham e naive, dia 12 para o grupo indometacina, dia 14 para o grupo gabapentina e dia 21 para os grupos MCd, CMMO e veículo. B. Análise realizada no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). Valores apresentados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparados com o grupo veículo, analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Tukey.

5.5.2.3 TNF- α

Os níveis de TNF- α nos nervos isquiáticos dos animais neuropáticos ficaram aumentados em relação aos não neuropáticos (sham) no tempo de 60 dias ($p < 0,05$). O tratamento com MCd reduziu os níveis desta citocina pró-inflamatória no fim do período experimental ($p < 0,05$), já o tratamento com CMMO não modulou TNF- α nos nervos dos animais. A indometacina, mas não a gabapentina, reduziu TNF- α nos dois períodos analisados: 36 horas após as administrações repetidas e 60 dias ($p < 0,05$ e $p < 0,01$).

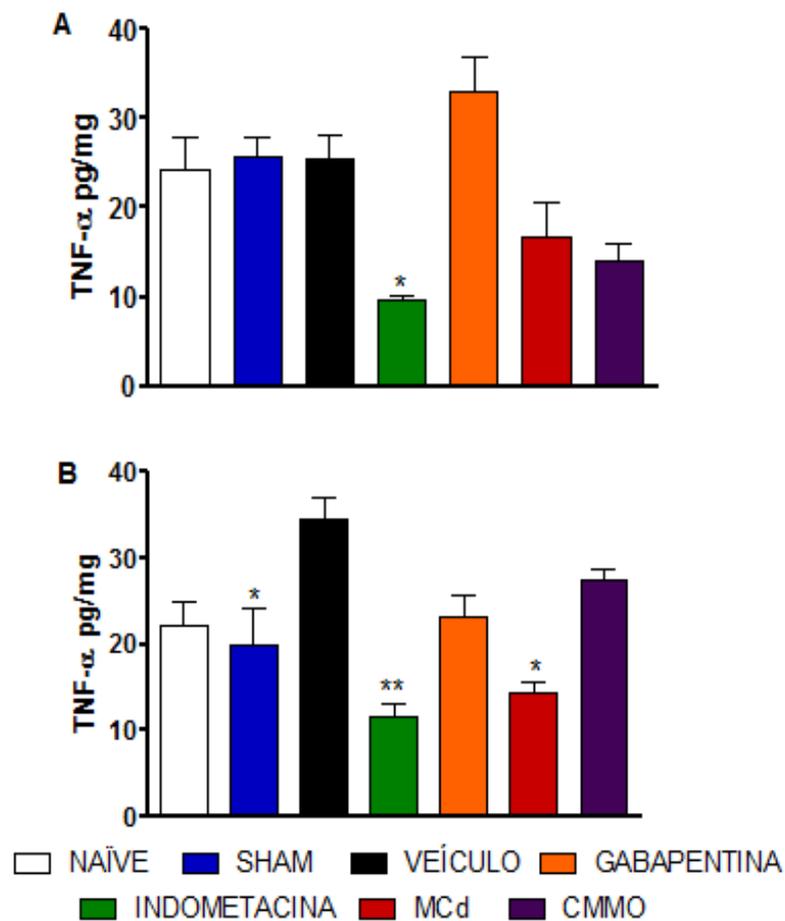


Figura 20. Quantificação da citocina TNF- α nos nervos isquiáticos ipsilaterais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. A. Análise realizada em diferentes tempos, de acordo com cada tratamento: dia 7 para os grupos sham e naive, dia 12 para o grupo indometacina, dia 14 para o grupo gabapentina e dia 21 para os grupos MCd, CMMO e veículo. B. Análise realizada no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). Valores apresentados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparados com o grupo veículo, analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Tukey.

5.5.2.4 IL-10

A análise da figura 21 permite observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação aos níveis de IL-10 no nervo isquiático, nos períodos de 21 e 60 dias.

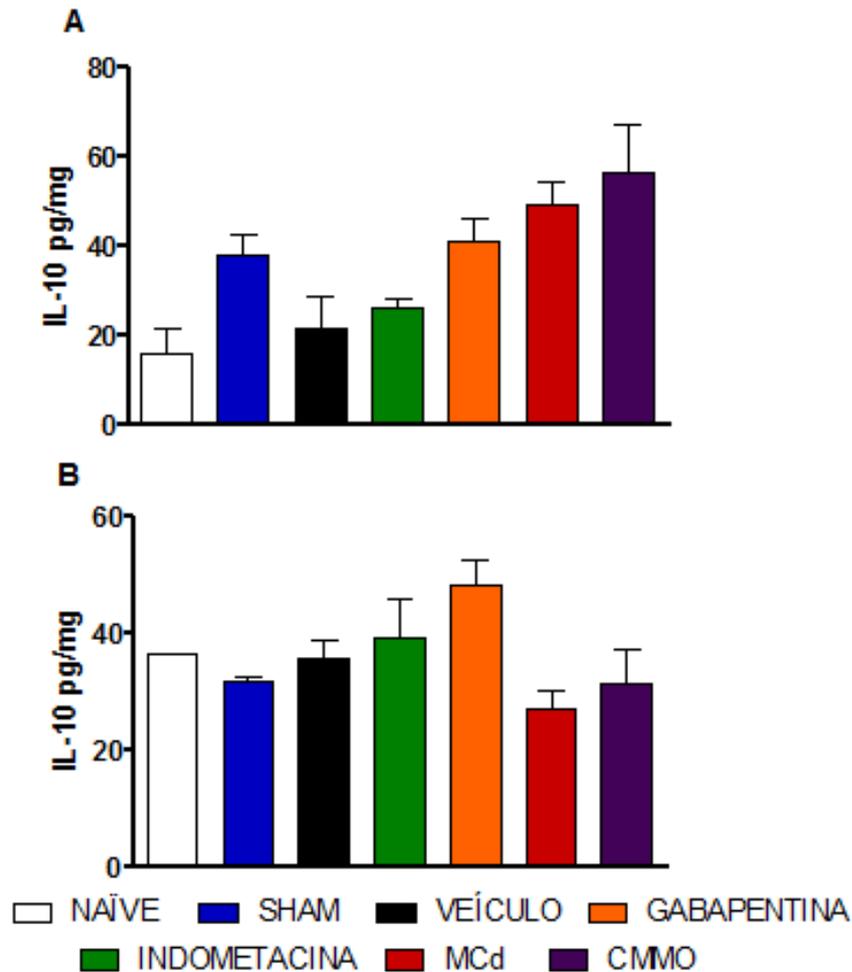


Figura 21. Quantificação da citocina IL-10 nos nervos isquiáticos ipsilaterais dos animais submetidos ao modelo de ligadura. A. Análise realizada em diferentes tempos, de acordo com cada tratamento: dia 7 para os grupos sham e naive, dia 12 para o grupo indometacina, dia 14 para o grupo gabapentina e dia 21 para os grupos MCd, CMMO e veículo. B. Análise realizada no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). Valores apresentados como a média de 6 (seis) animais por grupo \pm EPM. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, comparados com o grupo veículo, analisados pelo teste one-way ANOVA seguido de Tukey.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou, pela primeira vez, que o meio condicionado da cultura de células-tronco mesenquimais induz efeito antinociceptivo na DN experimental. Uma única administração sistêmica do MCd foi capaz de reverter a ligadura parcial do nervo isquiático, normalizando os limiares nociceptivos mecânico e térmico. O efeito antinociceptivo foi mantido até o fim do período experimental, o que pode estar relacionado ao efeito modulatório do MCd sobre a produção de citocinas no sistema nervoso central e periférico. Considerando que citocinas estão envolvidas na geração e manutenção da dor neuropática, esses dados sugerem que o MCd pode exercer um efeito “modificador da doença” e não apenas paliativo, indicando seu potencial terapêutico para o tratamento da neuropatia.

Um dia após a indução do modelo experimental de neuropatia, o desenvolvimento de alodinia mecânica e hiperalgesia térmica já se mostram claramente, permanecendo até o fim do período experimental. Dentre os sintomas de DN relatados na clínica, os que merecem destaque pela persistência e incômodo para os pacientes, são dor espontânea, alodinia e hiperalgesia. Este último diz respeito aos estímulos que geralmente causam dor mas, em pacientes portadores de DN, causam dor exacerbada. Alodinia diz respeito aos estímulos inócuos que, em pessoas saudáveis, não causariam dor, porém a provocam em pessoas que apresentam DN. Já a dor espontânea acontece quando, na ausência de qualquer tipo de estímulo há relato de dor (INTISO et al., 2015). O ensaio de von Frey é amplamente reconhecido como um teste de alodinia (CHAPLAN et al, 1994), enquanto o Hargreaves como um teste de hiperalgesia (HARGREAVES et al., 1988), já que induzem resposta nociceptiva à estímulos inócuos e nociceptivos, respectivamente. Dessa forma, os sintomas clínicos podem ser comparados aos sinais apresentados pelos camundongos no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático utilizado no presente estudo (JAGGI, JAIN, SINGH, 2011).

Outro parâmetro utilizado na validação desse modelo é o acompanhamento do peso corporal dos animais. Observou-se no presente estudo que o ganho de peso dos animais neuropáticos ao longo do período experimental foi menor do que o observado em animais não neuropáticos. Esse dado encontra semelhança com a síndrome em humanos, nos quais a perda de peso também é relatada, em associação ao isolamento social, depressão e diminuição da qualidade de vida

(AQUARONE, 2013). Comportamento depressivo em animais com neuropatia por ligadura do nervo isquiático já foi também descrito (GONÇALVES et al., 2008).

Os modelos experimentais têm contribuído fundamentalmente para o avanço no conhecimento dos mecanismos de dor neuropática. Entre esses modelos destacam-se os modelos de lesão do nervo isquiático, por apresentarem alta correspondência com a síndrome clínica, incluindo as manifestações de alodinia, hiperalgesia, e alterações duradouras na expressão de neurotransmissores e receptores nas vias de dor (Malmberg e Basbaum, 1998). Em conjunto, esses dados indicam que o modelo experimental utilizado no presente estudo possui boa equivalência clínica, sendo portanto adequado para a avaliação pré-clínica de novas abordagens terapêuticas para a dor neuropática.

O foco principal do presente estudo foi avaliar o efeito do MCd sobre a neuropatia experimental. Os primeiros parâmetros avaliados foram as alterações de sensibilidade típicas da dor neuropática - alodinia mecânica e hiperalgesia térmica - por meio de ensaios comportamentais. Após 24h da indução do modelo experimental os camundongos manifestaram alodinia e hiperalgesia, que se mantiveram por um período de 45 a 48 dias. O tratamento com o MCd reduziu significativamente a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica dos animais neuropáticos poucas horas após sua administração sistêmica, evidenciando seu efeito antinociceptivo. Esse efeito foi mantido durante todo o período experimental. Outros estudos já demonstraram efeitos benéficos do meio condicionado de células-tronco sobre doenças do sistema nervoso. Wei e cols. (2009) demonstraram o efeito protetor do meio condicionado sobre neurônios de ratos em modelo de isquemia encefálica. Cantinieaux e cols. (2013) demonstraram que o meio condicionado induz recuperação motora de ratos em modelo de lesão de medula espinal. Recentemente, Sugimura e cols. (2015) observaram que o meio condicionado obtido de CT de dentes humanos aumenta o número de axônios mielinizados nos nervos isquiáticos de ratos após 12 semanas da sua transecção. Apesar desses dados indicarem o potencial terapêutico do MCd para o sistema nervoso, o presente estudo é o primeiro relato dos efeitos de MCd sobre a DN.

Com o objetivo de investigar o potencial terapêutico do MCd na neuropatia, uma análise comparativa de seus efeitos frente aos efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais e de fármacos de referência foi realizada. Uma única administração de CMMO em animais neuropáticos reverteu a alodinia e hiperalgesia

até o fim do período experimental. Esses dados estão de acordo com a literatura, pois o efeito antinociceptivo de CT já foi previamente demonstrado em diferentes modelos experimentais. Musolino e cols. (2007) foram pioneiros em demonstrar que a administração de CT de medula óssea previne o desenvolvimento de alodinia mecânica e térmica em animais submetidos à constrição de nervo isquiático. Da mesma forma, Klass e cols. (2007) utilizaram células mononucleares de medula óssea em modelo de DN induzida pela constrição crônica de nervo isquiático e observaram que este tratamento melhora a DN comportamental. Siniscalco e cols. (2010) perceberam melhora na alodinia mecânica e hiperalgesia térmica após injeção intracerebral de células mesenquimais humanas em animais submetidos à modelo de DN. Siniscalco e cols. (2011) observaram que o uso das mesmas células não somente melhora parâmetros comportamentais, como também modula citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na medula dos camundongos.

Além dos estudos com modelos de ligadura de nervo, os efeitos antinociceptivos de CT foram demonstrados também em outros modelos de neuropatia. Evangelista (2014) demonstrou que a administração de CMMO normaliza a alodinia mecânica e a hipoalgesia térmica em animais com DN diabética, assim como Guimarães e cols. (2013) demonstraram que células mesenquimais da polpa do dente induzem efeito antinociceptivo na neuropatia diabética experimental. Estes dados, em conjunto, corroboram os resultados apresentados no presente estudo, reafirmando que CT revertem as alterações de sensibilidade observadas na neuropatia.

O efeito do MCd foi comparado ainda ao efeito de dois fármacos, gabapentina e indometacina. A gabapentina é a droga utilizada com mais frequência no controle clínico da DN, enquanto a indometacina é um fármaco anti-inflamatório com ampla ação analgésica. O tratamento repetido com gabapentina reduziu a alodinia e a hiperalgesia de modo consistente, mas apenas nas primeiras horas após sua administração. O tratamento com indometacina reduziu a alodinia e produziu uma diminuição discreta da hiperalgesia logo após sua administração. Os efeitos dos tratamentos farmacológicos indicam que estas drogas, apesar de induzirem efeito antinociceptivo, não exercem ação curativa e nem modificam o curso da neuropatia, apenas tratando os sinais de dor. Em linha com esses resultados, pacientes neuropáticos tratados com gabapentina frequentemente não obtém melhora

significativa na dor e, como não há cura (VADIVELU et al., 2013), o paciente fica dependente do tratamento, o que onera os serviços de saúde além de poder agravar a saúde do próprio paciente, devido aos efeitos colaterais (DWORKIN et al., 2007). Apesar desse panorama, em função da falta de melhores opções, a gabapentina ainda continua sendo a droga de escolha para o controle clínico da dor neuropática. Quanto ao uso da indometacina, apesar de seu potente efeito anti-inflamatório, a literatura tem demonstrado a ineficácia da mesma no tratamento de DN. Foi demonstrado, por exemplo, que a indometacina não é capaz de produzir efeito antinociceptivo em camundongos com DN induzida por quimioterápicos (PARVATHY; MASOCHA, 2015). Corroborando os dados do presente estudo, a indometacina não produz efeitos duradouros na nocicepção de camundongos submetidos à ligadura de nervo espinal (LABUDA; LITTLE, 2005) e à ligadura parcial de nervo isquiático (INOUE et al., 2009). Ma e Eisenach (2002), descreveram que a ligadura do nervo isquiático induz uma produção inicial de prostaglandinas nos tecidos periféricos, as quais causam uma inflamação local, sensibilizam os nociceptores e estão envolvidas na sensibilização central contribuindo para o desenvolvimento da sensibilização dolorosa. O fato do efeito antinociceptivo da indometacina não ser duradouro, como descrito no presente estudo e em outros trabalhos da literatura, indica que o papel das prostaglandinas está mais relacionado à indução do que à manutenção da dor neuropática. Essa característica torna esse fármaco muito limitado no controle da DN. De fato, os anti-inflamatórios não esteroidais não representam escolha frequente no controle da dor neuropática (SCHREIBER et al., 2015; FINNERUP et al., 2015; HERSHMAN et al., 2014).

A análise comparativa dos dados aqui obtidos com os tratamentos farmacológicos versus terapia celular indicam que, apesar de ambas as abordagens induzirem ação antinociceptiva, os efeitos tiveram perfis diferentes. Enquanto a gabapentina e a indometacina tiveram efeitos significativos mas muito passageiros, os tratamentos com CMMO e MCd apresentaram efeitos consistentes e de longa duração, sugerindo uma completa reversão da DN experimental. Considerando a cronicidade dessa síndrome e a ausência de procedimentos terapêuticos de cura, esses dados ganham enorme relevância. Apesar disto, as barreiras éticas e técnicas por trás a utilização de CT, dificultam a transposição de tratamentos experimentais com células para a prática clínica. Nesse contexto, a utilização de produtos obtidos a

partir de CT, como é o caso do MCd, surge como uma nova perspectiva para o controle da dor neuropática.

Outro parâmetro avaliado no presente estudo foi a possível interferência da neuropatia e dos tratamentos na função motora dos animais. Essa avaliação é necessária em função da natureza comportamental, baseada em respostas motoras, das análises realizadas para a determinação de alodinia e hiperalgesia. Buscou-se investigar se os tratamentos eram capazes de modificar a capacidade motora dos animais e, assim, influenciar nas leituras dos limiares nociceptivos mecânico e térmico. Observou-se que nenhum dos tratamentos induziu mudança no padrão da marcha e do equilíbrio dos animais sobre a barra giratória do rota-rod. Do mesmo modo, Siniscalco e cols. (2010), demonstraram em animais neuropáticos por ligadura parcial do nervo isquiático, que a administração sistêmica de CMMO não afeta o desempenho motor no aparelho de rota-rod. Assim, pode-se concluir que a redução do comportamento nociceptivo observada nos animais tratados com gabapentina, indometacina, CMMO e MCd, foi, de fato, relacionada a efeito antinociceptivo.

Utilizando modelo de transecção de nervo, Sugimura et al. (2015) demonstraram que o meio condicionado de CT induz alterações morfológicas regenerativas, como o aumento do número de axônios mielinizados e da razão axônio/fibra, no nervo isquiático de ratos neuropáticos. Esses dados indicam que o efeito antinociceptivo do MCd, descrito no presente trabalho, pode estar relacionado a interferência desse tratamento nos mecanismos determinantes da neuropatia. A contribuição de citocinas, produzidas periférica e centralmente, para a indução e manutenção da dor neuropática tem sido amplamente reconhecida. Com o intuito de investigar se o tratamento com o MCd produz efeito antinociceptivo associado a uma modificação no padrão fisiopatológico da neuropatia, os níveis de citocinas foram quantificados no nervo periférico lesado e na medula espinal, um sítio central envolvido na manutenção da dor neuropática.

IL-1 β é uma das várias citocinas pró-inflamatórias secretadas por células imunes, incluindo macrófagos, monócitos e micróglia, sob condições de estresse, e tem sido identificada como um dos principais agentes algogênicos da DN (THACKER et al, 2007). Na periferia, a administração de IL-1 β tem sido associada à hiperalgesia e alodinia prolongadas (ZELENKA, SCHAFERS, SOMMER, 2005). Após lesão de nervo isquiático, há uma produção aumentada de RNAm de IL-1 β no

local da lesão (OKAMOTO et al., 2001) e também na medula espinal (SWEITZER et al., 1999). Do mesmo modo, dados do presente trabalho indicaram níveis aumentados de IL-1 β no nervo isquiático e na medula espinal de animais com neuropatia induzida por ligadura do nervo isquiático. Apesar da relação causal entre IL-1 β e dor neuropática ser bem aceita, os mecanismos pelos quais a IL-1 β age ainda não são muito claros. Alguns estudos indicam que a ligação de IL-1 β ao seu receptor ativa o fator de transcrição nuclear kB induzindo a produção de agentes como óxido nítrico, bradicininas, prostaglandinas, e outras citocinas pró-inflamatórias, que induzem nocicepção (TEGEDER et al., 2004; MCMAHON, CAFFERTY, MARCHAND, 2005; MARCHAND, PERRETI, MCMAHON, 2005). Além disso, há evidências que sugerem que IL-1 β pode aumentar a transmissão do aferente primário nociceptivo para o sistema nervoso pela liberação de substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (HOU, LI, WANG, 2003).

Demonstramos aqui que tanto o tratamento com células mesenquimais quanto com o MCd reduziram os níveis de IL-1 β no nervo periférico lesado e na medula espinal durante todo o período experimental. Siniscalco e cols. (2010 e 2011) também demonstraram que camundongos neuropáticos tratados com células mesenquimais humanas apresentam níveis reduzidos de IL-1 β , corroborando os dados aqui encontrados. Considerando o papel de IL-1 β para a manutenção da dor neuropática, e que o efeito inibitório sobre IL-1 β foi paralelo ao efeito antinociceptivo, é possível propor que a redução dos níveis dessa citocina contribua para o efeito antinociceptivo de CMMO e do MCd na neuropatia. Os fármacos indometacina e gabapentina não produziram efeitos consistentes sobre os níveis de IL-1 β na medula e no nervo isquiático.

Outra citocina com papel bem estabelecido na DN é o TNF- α . Esta tem sido diretamente envolvida na produção de dor em diversos modelos de lesão de nervo e é responsável por iniciar a cascata de ativação de várias citocinas e fatores de crescimento (THACKER et al., 2007). O aumento dos níveis de TNF- α tem sido observado e associado à alodinia e hiperalgesia em diversos modelos de DN (LEUNG, CAHILL, 2010). Em adição, há aumento da expressão de receptores de TNF- α no nervo isquiático após lesão (GEORGE, BUEHL, SOMMER, 2005) e a administração endoneural de TNF- α produz comportamentos de DN (WAGNER, MYERS, 1996). No sistema nervoso central, TNF- α também tem papel na

manutenção da DN. Em modelos de constrição crônica de nervo em ratos, um aumento nos níveis de TNF- α foi encontrado no hipocampo, no *locus coeruleus* e no núcleo rubro (IGNATOWSKY et al., 1999; COVEY et al., 2002; LI et al., 2008). No SNC os mecanismos de TNF- α na DN parecem envolver, sobretudo, sistemas gliais. Em resposta à lesão do nervo, a micróglia é ativada passando a secretar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α que, em mecanismo de cascata, ativam outras citocinas com ação semelhante, perpetuando a dor (WATKINS; MAIER, 2003).

Observou-se, no presente trabalho, que os tratamentos com CMMO e MCd diminuíram os níveis de TNF- α em animais neuropáticos. Entretanto, o efeito de CMMO sobre a expressão de TNF- α foi restrito à medula, enquanto os efeitos do MCd puderam ser observados nos dois tecidos analisados. Watanabe e cols. (2015) utilizaram o transplante de CMMO em animais com lesão de medula espinal e perceberam que, em camundongos transplantados, a administração das CMMO foi fortemente associada à redução de TNF- α , corroborando os dados aqui apresentados. Os fármacos indometacina e gabapentina reduziram os níveis de TNF- α , mas esse efeito não foi mantido por todo o período experimental nas medulas dos animais. É possível que, assim como sugerido para IL-1 β , a inibição de TNF- α contribua para o efeito antinociceptivo de CMMO e do MCd na neuropatia. O fato dessa inibição ser duradoura pode ser correlacionada à manutenção do efeito antinociceptivo por todo o período experimental, como foi aqui demonstrado.

A seguir, a possível modulação de IL-6 foi também investigada. Existem evidências que sugerem o envolvimento de IL-6 nos mecanismos de DN, principalmente após lesão de nervo periférico (CUI et al, 2000). Há uma forte correlação entre a alodinia mecânica e o aumento da imunoreatividade local de IL-6 em modelos de lesão de nervo isquiático (CUI et al, 2000) assim como há relato do aumento de RNAm de IL-6 no GRD após a lesão (MURPHY et al., 1999). Além da contribuição periférica estudos indicam que IL-6 é produzida no sistema nervoso central e pode ter importante papel em diversas funções como, sinalização entre células, coordenação da resposta imune, proteção de neurônios e diferenciação, crescimento e sobrevivência neuronal (MIKA, 2008). Mika e cols. (2008) relataram um aumento da expressão do gene de IL-6 em regiões centrais importantes para transmissão nociceptiva, como a medula espinal, após lesão constriativa crônica em nervo isquiático em ratos. Em adição, camundongos *knockout* para IL-6 exibiram

hiperalgesia térmica e alodinia mecânica mais sutis após lesão constrictiva crônica de nervo isquiático quando comparados com animais selvagens (MURPHY et al., 1999). Em linha com os dados da literatura, no presente trabalho houve aumento consistente dos níveis de IL-6 na medula espinal e nervo isquiático de animais neuropáticos. Tanto os tratamentos farmacológicos quanto a terapia celular, incluindo o MCd, foram capazes de reduzir os níveis de IL-6 no nervo isquiático e na medula espinal de modo consistente. Os efeitos inibitórios do MCd sobre os níveis de IL-6 no nervo foram semelhantes aos efeitos de CMMO. Este dado segue o descrito por Watanabe e cols. (2015), que notaram redução de IL-6 nas medulas de animais transplantados com CMMO após lesão de medula espinal.

A rede de sinalização de citocinas envolve não apenas as clássicas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , mas também citocinas regulatórias como IL-10 (MARQUES et al., 2004; MOORE et al., 2001). IL-10 é considerada uma potente citocina anti-inflamatória, sendo capaz de reduzir a produção e liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (MOORE et al., 1993). Tem sido descrito que IL-10 tem potencial terapêutico na supressão da dor crônica. De fato, a administração de IL-10 bloqueia e reverte a dor neuropática em diferentes modelos experimentais (MILLIGAN et al., 2005). Ledebouer e cols. (2007) demonstraram que, a aplicação de IL-10 em uma região da medula espinal com células gliais ativadas, reverte o estado doloroso em modelos de DN. O mecanismo preciso de IL-10 no sistema nervoso central ainda requer maiores esclarecimentos, mas pode estar relacionado à diminuição da expressão de citocinas pro-inflamatórias (HAMILTON et al., 1999), e de seus receptores (SAWADA et al., 1999).

No presente trabalho o tratamento com MCd aumentou os níveis de IL-10 na medula espinal de animais neuropáticos. A administração de CMMO não produziu um aumento estatisticamente significativo de IL-10 na medula e no nervo dos animais analisados, diferente do observado por Sinicalco e cols. (2011), que relataram um aumento da citocina IL-10 nas medulas de camundongos neuropáticos tratados com CMMO. Para o tratamento farmacológico, apenas a indometacina aumentou os níveis de IL-10, efeito observado somente na medula.

A análise global dos dados de citocinas, sugere que o MCd é capaz de modular os níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 tanto no sítio de lesão quanto centralmente, de modo semelhante aos efeitos de CMMO. Indometacina e

gabapentina apresentaram resultados menos consistentes sobre a modulação de citocinas, tendo efeitos variáveis a depender do sítio e citocina sob análise. Considerando que os efeitos do MCd e de CMMO sobre os níveis de citocinas foram paralelos ao efeito antinociceptivo, é possível propor que a terapia celular induz uma antinocicepção duradoura por interferir de modo mais consistente nos mecanismos de manutenção da DN.

Os resultados obtidos com o presente trabalho indicam, pela primeira vez, o potencial terapêutico do MCd obtido de cultivo de CMMO em estados crônicos de neuropatia. Em adição ao efeito antinociceptivo, o MCd pareceu exercer uma ação “modificadora da doença” e não apenas paliativa, como fazem os analgésicos atualmente utilizados no controle dessa síndrome. Os efeitos descritos no presente estudo com o uso do MCd são equivalentes aos observados após o transplante de CMMO. Diante das barreiras tecnológicas e éticas para o uso de CT, a alternativa do uso de MCd pode ser promissora para o tratamento da DN. Além de apontarem uma nova abordagem terapêutica em potencial, esses dados reforçam também a hipótese dos mecanismos parácrinos de células-tronco.

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e analisados neste trabalho permitem concluir que:

- Uma única administração de MCd foi capaz de melhorar de forma progressiva e duradoura as alterações da sensibilidade térmica e mecânica na DN induzida nos camundongos;
- Os resultados obtidos com o MCd na neuropatia foram equivalentes aos observados aqui, e já descritos na literatura para CMMO;
- Uma única administração de MCd produziu efeito mais duradouro que o tratamento diário com gabapentina ou indometacina, que contribuíram apenas de forma transitória para a normalização dos limiares nociceptivos dos animais com DN;
- Os tratamentos com CMMO e MCd foram capazes de modular as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10, envolvidas na indução e manutenção da DN, tanto no sítio periférico de lesão quanto na medula espinal;
- Os tratamentos com indometacina e gabapentina modularam as mesmas citocinas, porém de modo variável, a depender da citocina, tempo e sítio avaliados. De um modo geral, a modulação induzida pelos fármacos foi mais consistente nas primeiras horas após sua administração.

8 PERSPECTIVAS E CONTRIBUIÇÕES

A utilização de um produto obtido de células-tronco e com eficácia terapêutica comprovada pode ser uma alternativa às barreiras éticas e técnicas que dificultam o uso de células-tronco na rotina clínica. É possível que terapias baseadas em células sejam capazes, no futuro, de preencher a lacuna existente na terapêutica da dor neuropática, que acarreta sofrimento e má qualidade de vida para milhares de pessoas portadoras dessa síndrome. O presente estudo pode representar o passo inicial de incentivo para a realização de novas investigações sobre o potencial do MCd para o controle da dor neuropática.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, M. et al. The role of bone marrow derived-mesenchymal stem cells in attenuation of kidney function in rats with diabetic nephropathy. **Diabetol. Metab. Syndr.**, v. 6, n. 1, 2014.
- AFANASYEV, B. V. et al. A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. **CTT**, v. 1, n. 3, p. 35-38, 2009.
- AKIYAMA, Y.; RADTKE, C.; KOCSIS, J.D. Remyelination of the Rat Spinal Cord by Transplantation of Identified Bone Marrow Stromal Cells. **J. Neurosci.**, n.15, v. 22, p. 6623-6630, 2002.
- ALM, P.A.; DREIMANIS, K. Neuropathic pain: transcranial electric motor cortex stimulation using high frequency random noise. Case report of a novel treatment. **J. Pain Res.**, v. 6, p. 479- 486, 2013.
- ALVAREZ-DOLADO, M. Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine. **Front. Biosci.**, v. 12, p. 1-12, 2007.
- AQUARONE, R L. **Dor neuropática: implicações na qualidade de vida de pessoas com lesão medular**. 98 f. Dissertação (Mestrado) – USP, 2013.
- ATTAL, N.; BOUHASSIRA, D. Pharmacotherapy of neuropathic pain: which drugs, which treatment algorithms? **Pain**, v. 156, p. 104-114, 2015.
- BAO, Y.H. et.al. Gabapentin Enhances the Morphine Anti-Nociceptive Effect in Neuropathic Pain via the Interleukin-10-Heme Oxygenase-1 Signalling Pathway in Rats. **J. Mol. Neurosci.**, v. 54, n.1, p. 137-146, 2014.
- BARROS, T. A. A. **Avaliação dos efeitos da terapia celular em modelo experimental de dor neuropática**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2010.
- BASBAUM, A. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p.267-284, 2009.
- BAUM, M. et al. Correction of proximal tubule phosphate transport defect in Hyp mice in vivo and in vitro with indomethacin. **PNAS**, v. 100, n. 19, p.11098-11103, 2003.
- BEHR, B. et.al. Stem Cells. **Plastic. Reconst. Surgery**, v.136, n. 4, p. 1163-1171, 2010.
- BENNETT, M.I. et.al. Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: A systematic review. **Pain**, v. 153, n. 2, p. 359-365, 2012.
- BERNARDO, M.E.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W.E. Mesenchymal stromal cells. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1176, p. 101-117, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, L.M.M. et al., In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction. **J. Biomed. Sci.**, v. 15, n. 3, p. 365-374, 2008.

BYDLOWSKI, S.P. et.al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, p. 25-35, 2009.

CANTINIEAUX, D. et.al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. **PLoS One**, v. 8, n. 8, 2013.

CHAPLAN, S.R. et.al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J. Neurosci. Meth.**, v. 53, n.1, p. 55-63, 1994.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandin Other Lipid Mediat.**, v. 104, p. 58-66, 2013.

CHEN, Y. et al. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 40, n.5, 2008.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol.**, v.1, n. 2, 2002.

CHOPRA, H.; HANS, M.K., SHETTY, S. Stem cells-the hidden treasure: A strategic review. **Dent. Res. J.**, v. 10, p. 421-427, 2013.

CLARCK, A.K.; OLD, E.A.; MALCANGIO, M. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. **J. Pain Res.**, p. 803- 814, v.6, 2013.

CORONEL, M. F.; MUSOLINO, P. L.; VILLAR, M. J. Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction. **Neurosci. Lett.**, v. 405, n. 1, p. 5-9, 2006.

COVEY, W.C. et al. Expression of neuron-associated tumor necrosis factor alpha in the brain is increased during persistent pain. **Reg. Anesth. Pain Med.**, v. 27, n. 4, p. 357-366, 2002.

CUI, J.G. et al. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain**, v. 88, n. 3, p. 239-248, 2000.

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.

DOBROTA, V. et al. The impact of neuropathic pain and other comorbidities on the quality of life in patients with diabetes. **Health Qual. Life Outcomes**, v. 12, p. 171, 2014.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

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. **Avaliação do efeito do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea em modelo murino de neuropatia periférica diabética**. 91 F. Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

FAGOT-LARGEAULT, A. Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e antropológicas. **Est. Avançados**, v.18, n.51, p. 227-245, 2004.

FENG, D. et al. Effects of the conditioned medium of mesenchymal stem cells on mouse oocyte activation and development. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 6, p. 506-514, 2009.

FENG, Q.; WANG, Y.I.; YANG, Y. Neuroprotective effect of interleukin-6 in a rat model of cerebral ischemia. **Exp. Ther. Med.**, v. 9, n. 5, p. 1695-1701, 2015.

FERREIRA, S.H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, v. 46, p. 1-9, 1993.

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

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

FRANK, J.W.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Glial activation and pathological pain. **Neurochem. Int.**, v.45, p. 389-395, 2003.

FREYNHAGEN, R. et.al. painDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. **Curr. Med. Res. Opin.**, v.22, p. 1911-1920, 2006.

FREYNHAGEN, R.; BENNETT, M. I. Diagnosis and management of neuropathic

pain. **BMJ**, v. 339, 2009.

GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v.287, p. 1433-1438, 2000.

GAO D. et al. Mesenchymal stromal cells enhance wound healing by ameliorating impaired metabolism in diabetic mice. **Cytotherapy**, v. 16, n. 11, p. 1467-1475, 2014.

GARROW, A.P. et.al. Role of acupuncture in the management of diabetic painful neuropathy (DPN): a pilot RCT. **Acupunct. Med.**, v.0, p. 1-8, 2014.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. **Exp. Neurol.**, v. 192, n. 1, p. 163 -166, 2005.

GERDONI, E. et al., Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Ann. Neurol.**, v. 61, n. 3, p. 219-227, 2007.

GILRON, I., et al. Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. **CMAJ**, v. 175, n, 3, p.265-275, 2006.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic Pain: Principles of Diagnosis and Treatment. **Mayo Clin. Proc.**, v. 90, n. 4, p. 532-545, 2015.

GILRON, I.; FLATTERS, S. Gabapentin and pregabalin for the treatment or neuropathic pain: A review of laboratory and clinical evidence. **Pain Res. Manage.**, v. 13, p. 56, 2006.

GNECCHI, M. et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. **FASEB J.**, v. 20, n. 6, p. 661-669, 2006.

GNECCHI, M. et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. **Nat. Med.**, v. 11, n. 4, p. 367-368, 2005.

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

GONÇALVES, L. et al. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. **Exp. Neurol.**, v. 213, n. 1, p. 48-56, 2008.

GRINFELD,S.; GOMES, R.G.C. Células-Tronco: Um Breve Estudo. **Intern. J. Dent.**, v.3, p. 324-329, 2004.

GUAN, L. X. et al. Therapeutic efficacy of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in patients with type 2 diabetes. **Exp. Ther. Med.**, v. 9, n. 5, p. 1623-1630, 2015.

GUIMARÃES, 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, p. 2345-2354, 2012.

GUO, Z. Y. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms. **Neural. Regen. Res.**, v. 10, n. 4, p. 651-658, 2015.

HAMILTON, T. A. et al. Regulation of macrophage gene expression by pro- and anti-inflammatory cytokines. **Pathobiology**, v. 67, n.5, p. 241-244, 1999.

HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 77-88, 1988.

HEARN, J. et al. Living with chronic neuropathic pain after spinal cord injury: an interpretative phenomenological analysis of community experience. **Disabil. Rehabil.**, v.37, n.23, p. 2203-2211, 2015.

HERSMAN, D. L. et al. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. **J. Clin. Oncol.**, v. 32, n. 18, p. 1941-1967, 2014.

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

HEUTINK, M. et al. Which pain coping strategies and cognitions are associated with outcomes of a cognitive behavioral intervention for neuropathic pain after spinal cord injury? **Top. Spinal Cord Inj. Rehabil.**, v. 19, n. 4, p. 330-340, 2013.

HONORE, P. et al. Interleukin-1alpha gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. **Behav. Brain Res.**, v. 167, n. 2, p. 355-364, 2006.

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.

HOU, L.; LI, W.; WANG, X. Mechanism of interleukin-1 beta-induced calcitonin gene-related peptide production from dorsal root ganglion neurons of neonatal rats. **J. Neurosci. Res.**, v. 73, n. 2, p. 188-197, 2003.

HUANG, S. et al. Paracrine action of mesenchymal stromal cells delivered by microspheres contributes to cutaneous wound healing and prevents scar formation in mice. **Cytotherapy**, v. 17, n. 7, p. 922-931, 2015.

IGNATOWSKI, T.A. et al. Brain-derived TNFalpha mediates neuropathic pain. **Brain Res.**, v. 841, n. 1, p. 70-77, 1999.

INCTC. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia

Celular, 2009. Disponível em:

<http://lgmb.fmrp.usp.br/inctc/index.php?option=com_content&view=article&id=53%3Aotematerapia&catid=25%3Athe-project&lang=pt>. Acesso em: 18 jun 2015.

INOUE, N. et al. Etodolac attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 109, n. 4, p. 600-605, 2009.

INTISO, E. et al. Botulinum Toxin Type A for the Treatment of Neuropathic Pain in Neuro-Rehabilitation. **Toxins**, v. 7, n. 7, p. 2452-2480, 2015.

JAGGI, A. S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain . **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 25, n. 1, p, 1-28, 2011.

JENSEN, T.T. et al. New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. **Diabetes and Vascular Disease Research**, 2006.

JONES, E.A. et. al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. **Arthritis Rheum.**, v. 46, p.3349-3360, 2002.

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

KING, J.C. Therapeutic options for neuropathic pain. **J. Trauma**, n.6, v.62, 2007.

KINNAIRD, T. et al. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. **Circ. Res.**, v. 94, n. 5, p. 678-685, 2004.

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

KLUSÁKOVÁ, I.; DUBOVÝ, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. **Ann. Anat.**, v. 191, n. 3, p. 248-259, 2009.

KRAMPERA, M. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v.101, n. 9, p. 3722-3729, 2003.

KRAYCHETE, D.C.; GOZZANI, J.L.; KRAYCHETE, J.C. Dor neuropática – Aspectos neuroquímicos. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 58, n. 5, p.492-505, 2008.

LABUDA, C.J.; LITTLE, P.J. Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 144, n. 2, p. 175-181, 2005.

LAGASSE, E. et.al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. **Nat. Med.**, v. 6, n. 11, p. 1229-1234, 2000.

LEDEBOER, A. et al. Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. **Brain Behav. Immun.**, v. 21, n. 5, p. 686-698, 2007.

LEGER, T. et al. Glatiramer acetate attenuates neuropathic allodynia through modulation of adaptive immune cells. **J. Neuroimmunol.**, v. 234, p.19-26, 2011.

LEUNG, A.; FALLAH, A.; SHUKLA, S. Transcutaneous Magnetic Stimulation (tMS) in Alleviating Post-Traumatic Peripheral Neuropathic Pain States: A Case Series. **Pain Med.**, v. 15, n. 7, p. 1196-1199, 2014.

LEUNG, L.; CAHILL, C.M. TNF-alpha and neuropathic pain--a review. **J. Neuroinflammation**, v. 7, p. 27, 2010.

LI X. et al. Tumor necrosis factor- α of Red nucleus involved in the development of neuropathic allodynia. **Brain Res. Bull.**, v. 77, n. 5, p. 233-236, 2008.

LINERO, I.; CHAPARRO, O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. **PLoS One**. V. 9, n. 9, 2014.

LLUIS, F.; COSMA, M.P. Cell-Fusion-Mediated Somatic-Cell Reprogramming: A Mechanism for Tissue Regeneration. **J. Cell. Physiol.**, v. 223, n. 1, p. 6-13, 2010.

LUCAS, P. A. et al. Effect of rat mesenchymal stem cells on development of abdominal adhesions after surgery. **J. Surg. Res.**, v. 62, n. 2, p. 229-232, 1996.

LV, S. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate diabetic glomerular fibrosis in vivo and in vitro by inhibiting TGF- β signalling via secretion of bone morphogenetic protein 7. **Diab. Vasc. Dis. Res.**, v. 11, n. 4, p. 251-261, 2014.

MA, W.; EISENACH, J.C. Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. **Eur. J. Neurosci.**, v. 15, n. 6, p.1037-1047, 2002.

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

MALMBERG, A.B.; BASBAUM, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, n. 1, p.215-222, 1998.

MARCHAND, F.; PERRETI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 6, n. 7, p. 521-532, 2005.

MARQUES, C.P. et al. Interleukin-10 attenuates production of HSV-induced inflammatory mediators by human microglia. **Glia**, v. 47, n. 4, p. 358-366, 2004.

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

MCMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell

factors as pain mediators and modulators. **Exp. Neurol.**, v. 192, n. 2, p.444-462, 2005.

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

MIKA, J. Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. **Pharmacol. Rep.**, v. 60, n.3, p. 297-307, 2008.

MIKA, J. et al. Interleukin-1 alpha has antiallodynic and antihyperalgesic activities in a rat neuropathic pain model. **Pain**, v. 138, n. 3, p.587-597, 2008.

MILLIGAN, E. et al. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. **Eur. J. Neurosci.**, v. 21, n. 8, p. 2136-2148, 2005.

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.

MOALEN, G.; TRACEY, D.J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Res. Rev.**, v. 51, n. 2, p. 240-264, 2006.

MOORE, K. et al. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 165-190,1993.

MORSHEAD, C. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. **Neuron.**, v. 13, n. 5, 1994.

MURAKAMI, T. et.al. Anti-interleukin-6 receptor antibody reduces neuropathic pain following spinal cord injury in mice. **Exp. Ther. Med.**, v. 6, n. 5, p. 1194-1198, 2013.

MURPHY, P.G. et al. Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, n. 7, p.2243-2253, 1999.

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

NIEDERBERGER, E.; KÜHLEIN H.; GEISLINGER G. Update on the Pathobiology of Neuropathic Pain. **Expert Rev. Proteomics**, v. 5, n. 6, p. 799-818, 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, n. 6, p. 840-840, 2006.

NYGREN, J. et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate

cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. **Nat. Med.**, v. 10, n. 5, p. 494-501, 2004.

OGAWA, N. et al. Gene Therapy for Neuropathic Pain by Silencing of TNF- α Expression with Lentiviral Vectors Targeting the Dorsal Root Ganglion in Mice. **PLoS ONE**, v.9, v. 9, n. 3, 2014.

OKAMOTO, K. et al. Pro and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Exp. Neurol.**, v. 169, n. 2, p. 381-391, 2001.

PAREKKADAN, B. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Molecules Reverse Fulminant Hepatic Failure. **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, 2007.

PARVATHY, S.S.; MASOCHA, W. Coadministration of indomethacin and minocycline attenuates established paclitaxel-induced neuropathic thermal hyperalgesia: Involvement of cannabinoid CB1 receptors. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 10541, 2015.

PENG, S. et al. Cell fusion phenomena detected after in utero transplantation of Ds-red-harboring porcine amniotic fluid stem cells into EGFP transgenic mice. **Prenat. Diagn.**, v. 34, n. 5, p. 487-495, 2014.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

QIN, J. Cell fusion enhances mesendodermal differentiation of human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells Dev.**, v. 23, n. 23, p. 28775-2882, 2014.

QUINTÃO, N. et al. The Effects of Diacerhein on Mechanical Allodynia in Inflammatory and Neuropathic Models of Nociception in Mice. **Anesth. Analg.**, v. 101, n. 6, p. 1763-1769, 2005.

REIMER, M.; HELFERT, S.; BARON, R. Phenotyping neuropathic pain patients: implications for individual therapy and clinical trials. **Current Opin. Support Palliat. Care**, v. 8, n. 2, p. 124-129, 2014.

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

ROMANELLI, P.; ESPOSITO, V. The functional anatomy of neuropathic pain. **Neurosurg. Clin. N. Am.**, v. 15, n. 3, p. 257-268, 2004.

SACERDOTE, P. et al. Systemic administration of human adipose-derived stem cells reverts nociceptive hypersensitivity in an experimental model of neuropathy. **Stem Cells Dev.**, v. 22, n. 8, p.1252-1263, 2013.

SANTOS, R.B.; SOARES, M.B.P.; CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 37, p. 490-495, 2004.

SAWADA, H. et al. Autonomic neuropathy in transgenic mice caused by immunotoxin targeting of the peripheral nervous system. **J. Neurosci. Res.**, v. 51, n. 2, p. 162-173, 1998.

SCHAIBLE, H.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

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

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v.43, p. 205-218, 1990.

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

SINISCALCO, D. et.al. Intra-brain microinjection of human mesenchymal stem cells decreases allodynia in neuropathic mice. **Cel. Mol. Life Sci.**, v. 67, p. 655-669, 2010.

SINISCALCO, D. et.al. Long-lasting effect of human mesenchymal stem cells systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice. **Front. Integr. Neurosci.**, v.5, 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.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci. Lett.**, v.361, p. 184-187, 2004.

SOUSA, R. **A disfunção redox espinal na dor neuropática**. 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde) – Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Porto, 2012.

SOUZA, V.F. et.al. Células-tronco: uma breve revisão. **R. Ci. Med. Biol.**, v.2, n.2, 2003.

SCHREIBER A.K., et al. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. **World J. Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 432-444, 2015.

SCHUG, S.; GODDARD, C. Recent advances in the pharmacological management of acute and chronic pain. **Ann. Palliat. Med.**, v. 3, n. 4, p. 263-275, 2014.

STOCK P, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, n. 4, p. 7004-7028, 2014.

SUGIMURA, Y. et al. Peripheral Nerve Regeneration by Secretomes of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. **Stem Cells Dev.**, 2015.

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.

SWEITZER, S.M. et al. Acute peripheral inflammation induces moderate glial activation and spinal IL-1beta expression that correlates with pain behavior in the rat. **Brain Res.**, v. 829, n. 1, p. 209-221, 1999.

TAKAHASHI, K. Cellular reprogramming: lowering gravity on Waddington's epigenetic landscape. **J. Cell. Sci.**, v. 125, p. 2553-2560, 2012.

TEGEDER, I. et al. Specific inhibition on I (kappa)B kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. **J. Neurosci.**, v. 24, n. 7, p. 1637-1645, 2004.

THACKER, M.A. et al. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. **Anesth. Analg.**, v. 205, n. 3, p. 838-847, 2007.

TOGEL, F. et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, n. 1, p. 31-42, 2005.

TRAMULLAS, M. et.al. BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation. **J. Neurosci.**, v.30, p. 1502-1511, 2010.

URBAN, V.S. et al. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 244-253, 2008.

ÜÇEYLER, N. et.al. IL-4 deficiency is associated with mechanical hypersensitivity in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 12, 2011.

VADIVELU, S. et.al. Potential role of stem cells for neuropathic pain disorders. **Neurosurg. Focus**, v.35, n. 3, 2013.

VALEJJO, R. et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Pract.**, v. 10, n. 3, p. 167-184, 2010.

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

VIDAL, P.M. et.al. The role of "anti-inflammatory" cytokines in axon regeneration. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.24, n. 1, p. 1-12, 2013.

VRANKEN, J.H. Elucidation of Pathophysiology and Treatment of Neuropathic Pain. **Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.**, v. 12, p. 304-314, 2012.

WAGNER, R.; MYERS, R.R. Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. **Neuroreport**, v. 7, n. 18, p. 2897-2901, 1996.

WANG, X. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 897-901, 2003.

WATANABE, S. et al. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. **Stem Cells**, v. 33, n. 6, p.1902-1914, 2015.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 2, n. 12, p. 973-985, 2003.

WEI, X. et al. IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats. **Stem Cells**, v. 27, n. 2, p. 478-488, 2009.

WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J. Clin. Neurophysiol.**, v. 27, n. 2, p. 478-488, 1997.

WOLF, G. et al. Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice. **Pain**, v. 120, n. 3, p. 315-324, 2006.

WOOLF, C.J. Somatic pain - pathogenesis and prevention. **Brit. J. Anaesth.**, v. 75, n. 2, p. 169-176, 1995.

YAO, Y. et al. Paracrine Action of Mesenchymal Stem Cells Revealed by Single Cell Gene Profiling in Infarcted Murine Hearts. **PLoS One**, v. 10, n. 6, 2015.

ZELENKA, M.; SCHAFERS, M.; SOMMER, C. Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 257-263, 2005.

ZHANG, J.M.; JIANXIONG, M.D. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int. Anesthesiol. Clin.**, v.45, p.27-37, 2007.

ZHANG, E. et al. Intrathecal administration of mesenchymal stem cells reduces the reactive oxygen species and pain behavior in neuropathic rats. **Korean J. Pain**, v. 27, n. 3, p.239-245, 2014.

ZHOU, H. et al. Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, v. 16, n. 3, p. 403-412, 2010.

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