



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



TAÍS ADELITA DE ALMEIDA BARROS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA CELULAR EM
MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA**

TAÍS ADELITA DE ALMEIDA BARROS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA CELULAR EM
MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^º. Dr^ª. Cristiane Flora Villarreal

Feira de Santana, BA
2010

Ao meu esposo, Alexandre Martins Barros, maior incentivador deste trabalho, por sua integridade, respeito, dedicação, apoio, humor e carinho, tornando esses valores constantes em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelos valores morais e investimentos em meus estudos, herança incomensurável. Ao meu pai, Adelson Ribeiro de Almeida, pelo rigor moral. À minha mãe, Madalena Alcione Morais de Almeida, pelas suas orações. Aos meus irmãos Adelson Ribeiro de Almeida Júnior, João Victor Andrade de Almeida e Lois Arruda, por serem estrelas na imensidão do horizonte.

Aos meus sogros, José Hélio de Barros (*in memoriam*) e Ordaísa Martins, por suas vibrações positivas para o sucesso desse trabalho.

Aos animais, que participaram com suas vidas para a realização deste trabalho e a todos os animais que vêm servindo de tantas formas desde o estabelecimento da Humanidade.

Ao Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos e Dra. Milena Botelho Pereira Soares, pelo apoio e investimento, disponibilizando magníficos recursos e infra-estrutura do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) para que eu pudesse desenvolver meu trabalho.

A toda equipe do Biotério formada desde o início deste trabalho, Fabienne, Vitor, Josiane, Fernanda, Paula e especialmente à equipe do Biotério de Experimentação: Rejane, Aldine, Simone, Sr. Presciano, Silviane e Gustavo, por assegurarem com tanta competência, atenção e carinho a qualidade de seus trabalhos, além de contribuírem com os momentos de silêncio que meu trabalho experimental tanto necessitou.

À orientadora deste trabalho, Dr^a Cristiane Flora Villarreal, pela oportunidade e desafios.

Aos colegas do LETI e do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) do Hospital São Rafael que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Aristóteles Góes Neto, coordenador do programa de pós-graduação em Biotecnologia da UEFS e Helton Ricardo Carneiro Júnior, secretário do referido programa, pela dedicação exemplar ao seu trabalho.

Ao Professor Guilherme de Araújo Lucas e sua brilhante equipe que gentilmente me ensinaram a executar a cirurgia e avaliação do modelo experimental adotado nesse trabalho.

À Lucyvera Cavalcanti Ribeiro Imbroinise e Roberta Couto Silva, pelo apoio administrativo.

À Ana Carla de Oliveira Pinheiro, colega do curso de Medicina Veterinária e amiga, por facilitar com sua responsabilidade e amizade o cumprimento do meu papel de aluna de graduação juntamente com a pós-graduação.

À Ana Elisa Marques Macedo Maia, por tudo o que a amizade é capaz de erguer e fortificar em 12 anos.

À Carine Machado Azevedo, Fernanda de Borba Cunha e Marcos Maurício Tosta Leal, pela ajuda, amizade e companheirismo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa de mestrado.

“Deixemos o futuro dizer a verdade e avaliar cada um de acordo com seu trabalho e realizações. O presente é deles. O futuro, pelo qual eu realmente trabalhei, é meu”.

Nicola Tesla

RESUMO

Dor neuropática é causada por disfunção do sistema nervoso e acomete cerca de 5% da população mundial. Seu controle é ainda ineficiente e apenas um terço dos pacientes submetidos à terapia vigente apresenta mais de 50% de alívio da dor. O presente trabalho investigou a potencialidade da terapia celular em recuperar a função do sistema nervoso na dor neuropática experimental. Foi utilizado o modelo de ligadura parcial do nervo isquiático em camundongos e avaliou-se a alodinia mecânica com filamentos de von Frey. Camundongos foram tratados por via endovenosa com células mononucleares de medula óssea (CMMO) murina, fatores solúveis resultantes do lisado destas células e populações celulares de mesma origem aderente e não-aderente a polímeros. O tratamento com CMMO também foi administrado a animais *knock out* para o gene da citocina IL-10. Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram dosados em secções do nervo isquiático e medula espinal. A marcação para GFAP em células de Schwann também foi avaliada nos grupos experimentais. Como resultados, a administração de CMMO reduziu a alodinia bem como a expressão da citocina TNF- α , com aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, no nervo isquiático e na medula espinal. Em animais *knock out* para IL-10 o tratamento não foi efetivo. Em adição, animais tratados com CMMO apresentaram menor expressão de células de Schwann, envolvidas com a produção de fatores nociceptivos, no nervo isquiático. Esses resultados reforçam o potencial da terapia celular para o controle da dor neuropática com participação de fatores solúveis, principalmente IL-10.

Palavras-chave: Dor neuropática. Terapia Celular. Células mononucleares. Citocinas. Alodinia mecânica. Medula óssea.

ABSTRACT

Neuropathic pain is caused by dysfunction of the nervous system and affects about 5% of the world. Its control is still inefficient and only a third of patients undergoing therapy existing features more than 50% pain relief. This study investigated the potential of cell therapy for recovery from nervous system function in experimental neuropathic pain. We use the model of partial sciatic nerve ligation in mice and evaluated the mechanical allodynia with von Frey filaments. Mice were treated intravenously with mononuclear cells obtained from bone marrow (BMMC), soluble factors resulting from the lysate of these cells and cell populations of the same origin adherent and non-adherent to polymers. Treatment with BMMC was also administered to animals for the gene knockout of the cytokine IL-10. Levels of cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α were measured in sections of the sciatic nerve and spinal cord. The markup for GFAP in Schwann cells was evaluated in experimental groups. As a result, the administration of BMMC reduced allodynia and the expression of cytokines typically pro-inflammatory IL-1 β and TNF- α , with increased expression of anti-inflammatory cytokine IL-10 in sciatic nerve and spinal cord. In knockout animals IL-10 treatment was ineffective. In addition, animals treated with BMMC showed a lower number of Schwann cells, involved in the production of noxious factors in the sciatic nerve. These results emphasize the potential of cell therapy for neuropathic pain management with the participation of soluble factors, mainly IL-10.

Keywords: Bone marrow mononuclear cells. Cell therapy. Cytokines. Mechanical allodynia. Stem cells. Neuropathic pain.

LISTA DE SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
B.I.D.	<i>Bis in die</i> (duas vezes ao dia)
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (fator neurotrófico derivado do encéfalo)
CSIF	<i>Cytokine-synthesis inhibitory factor</i> (fator inibitório da síntese de citocinas)
CMMO	Células-tronco mononucleares de medula óssea
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Médium</i> (meio de Eagle modificado por Dulbecco)
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente reforçada)
G	Força G ou força da gravidade
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (proteína ácida fibrilar glial)
GRD	Gânglio da raiz dorsal
I.P.	Intraperitoneal
I.V.	Intravenoso
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i> (Associação Internacional para o Estudo da Dor)
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
KO	<i>Knockout</i> (nocaute, silenciado geneticamente)
Mn	MiliNewton
NGF	<i>nerve growth factor</i> (fator de crescimento neural)
NO	Óxido nítrico
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i> (Temperatura ótima de corte, resina para conservação de materiais em temperatura iguais ou inferiores a -20°C que serão submetidos à secção)
PO	<i>Per os</i> (Via oral)

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salina)
PFA	<i>Paraformaldehyde</i> (Paraformaldeído)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RNA _m	<i>Messenger Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico mensageiro)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TCA	<i>Tricyclic antidepressants</i> (Antidepressivos tricíclicos)
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i> (Fator de crescimento transformante beta)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> (fator de necrose tumoral alfa)
VF	von Frey

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A) Lesão no nervo provoca o recrutamento e ativação de células do sistema imunológico no local da lesão, no gânglio da raiz dorsal e no corno ventral e dorsal da medula espinal.	20
Figura 2	Principais populações de células-tronco adultas residentes na medula óssea de ossos longos.	30
Figura 3	Características das células-tronco adultas, incluindo plasticidade, diversidade de origem e potencial em originar diferentes tecidos.	32
Figura 4	Nervo isquiático e seus ramos.	37
Figura 5	Algumas etapas do procedimento cirúrgico para ligadura parcial do nervo isquiático.	37
Figura 6	A) Apresentação do conjunto de filamentos padronizados para realização do teste de von Frey. B) Animais no período de ambientação no aparato para avaliação do limiar nociceptivo mecânico com filamentos de von Frey.	38
Figura 7	Delineamento experimental da avaliação do limiar nociceptivo mecânico com filamentos de von Frey.	46
Figura 8	Delineamento experimental da avaliação do limiar nociceptivo mecânico com filamentos de von Frey para o grupo experimental que recebeu gabapentina 100 mg/kg, b.i.d. p.o. ou veículo p.o.	47
Figura 9	Esquema demonstrando a utilização de dezesseis animais por grupo e por tempo analisado no ensaio imunoenzimático (ELISA).	48
Figura 10	Esquema demonstrando a coleta individual de material utilizado no ensaio de imunofluorescência para avaliação de células de Schwann.	48
Figura 11	Avaliação do limiar nociceptivo mecânico em animais submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático (operado) e animais falso operados (sham) e animais naive.	51
Figura 12	Avaliação do limiar nociceptivo mecânico em animais submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático e tratados com veículo, células mononucleares de medula óssea (CMMO) e gabapentina.	53
Figura 13	Avaliação da expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α no nervo isquiático 3 (D3) e 30 (D30) dias após cirurgia para indução do modelo de dor neuropática.	55

Figura 14	Avaliação da expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α em secção da medula espinal correspondente aos nervos lombares L3, L4 e L5 nos dias 3 (D3) e 30 (D30) após cirurgia para indução do modelo de dor neuropática.	56
Figura 15	Avaliação do limiar nociceptivo mecânico em animais submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático e tratados com veículo, células mononucleares de medula óssea (CMMO), lisado, células aderentes e células não-aderentes.	59
Figura 16	Avaliação do limiar nociceptivo mecânico em animais <i>knockout</i> IL-10 -/- (KO IL-10 1X10 ⁷ CMMO), selvagens tratados (selvagem 1X10 ⁷ CMMO) e selvagens que receberam apenas o veículo (Veículo IV) submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático e tratados com veículo ou células mononucleares de medula óssea.	61
Figura 17	Fotos de microscopia eletrônica com marcação para núcleos com DAPI (azul) e para células de Schwann com GFAP (vermelho).	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo geral	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	DOR NEUROPÁTICA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS	16
2.2	TERAPÊUTICA DA DOR NEUROPÁTICA	26
2.3	TERAPIA CELULAR E SUAS POTENCIALIDADES	29
2.4	MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR NEUROPÁTICA	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	ANIMAIS	36
3.2	MODELO DE DOR NEUROPÁTICA: LIGADURA PARCIAL DO NERVO ISQUIÁTICO	36
3.3	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO - FILAMENTOS DE VON FREY	38
3.4	ISOLAMENTO, OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DE CÉLULAS	39
3.5	COLETA DE MATERIAL PARA ELISA E IMUNOFLUORESCÊNCIA	41
3.6	ELISA (<i>ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>)	42
3.7	ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	42
3.8	DROGAS, MEIOS, DILUENTES E REAGENTES	43
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
3.10	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
3.10.1	Grupos experimentais	44
3.10.2	Avaliação do limiar nociceptivo mecânico	46
3.10.3	Sequência e objetivos experimentais	47
4	RESULTADOS	49
4.1	PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA	49

4.2	EFEITO DO TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA SOBRE A ALODINIA MECÂNICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA	52
4.3	EXPRESSÃO DE CITOCINAS	54
4.3.1	Expressão de citocinas no nervo isquiático	54
4.3.2	Expressão de citocinas na medula espinal	55
4.4	EFEITO DO TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA ESTRATIFICADAS SOBRE A ALODINIA MECÂNICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA	57
4.5	EFEITO DO TRATAMENTO DE ANIMAIS <i>KNOCK OUT</i> PARA A CITOCINA IL-10 COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA SOBRE A ALODINIA MECÂNICA	60
4.6	EXPRESSÃO DE CÉLULAS DE SCHWANN NO NERVO ISQUIÁTICO	62
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	
	A – CERTIFICADO 005/2007, COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	88

1 INTRODUÇÃO

A dor neuropática é causada por lesão ou disfunção do sistema nervoso e persiste de forma crônica, representando uma alteração deletéria ao indivíduo, tanto fisiológica quanto psicossocial. Cerca de 5% da população mundial é acometida desta síndrome a cada ano (AGUILERA-MUÑOZ *et al.*, 2005) e ainda não podem contar com uma terapia realmente eficaz, uma vez que apenas cerca de um terço dos pacientes submetidos à terapia vigente atingem mais de 50% do alívio da dor (JENSEN *et al.*, 2006).

Efeitos benéficos da terapia celular em modelos experimentais de dor neuropática foram recentemente demonstrados. Em modelos murinos de dor neuropática o tratamento com células mesenquimais (CORONEL *et al.*, 2006; MUSOLINO *et al.*, 2007) e mononucleares (KLASS *et al.*, 2007) da medula óssea administradas previamente ou no momento da cirurgia para indução do modelo restabelecem o limiar nociceptivo. Avaliações de parâmetros não comportamentais de neuropatia, estudos com pós-tratamento – mimetizando o que ocorre na prática clínica – e, sobretudo, investigações dos mecanismos envolvidos nesses efeitos terapêuticos ainda são escassos.

Dessa forma, o presente trabalho foi delineado para investigar a potencialidade da terapia celular na dor neuropática experimental. Utilizando técnicas comportamentais, bioquímicas e de microscopia, foram avaliadas a efetividade, persistência e possíveis mecanismos através do qual a terapia celular age na dor neuropática experimental. Nesse sentido, foram avaliadas e comparadas a magnitude e duração do efeito antinociceptivo do tratamento com células mononucleares de medula óssea com o tratamento farmacológico na alodinia induzida por neuropatia. Também foi avaliada a regulação dos níveis de citocinas e ativação de células da glia, envolvidos na manifestação da dor neuropática. Dados provenientes desse estudo podem estabelecer as bases para investigações futuras do efeito terapêutico de células-tronco em pacientes com dor neuropática.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral: Avaliar o possível efeito terapêutico de células mononucleares obtidas de medula óssea no tratamento de dor neuropática em modelo de experimentação animal.

1.1.2 Específicos:

- Avaliar o efeito antinociceptivo do tratamento com células mononucleares de medula óssea em modelo de dor neuropática em camundongos;
- Avaliar a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α nos animais submetidos ao modelo experimental de dor neuropática bem como avaliar a modulação pela terapia celular na medula espinal e nervo isquiático de animais tratados;
- Comparar o potencial analgésico do tratamento com células mononucleares de medula óssea e gabapentina, uma escolha terapêutica atual para o tratamento da dor neuropática;
- Comparar o efeito da fração total de células mononucleares de medula óssea com as seguintes estratificações: fatores solúveis obtidos da lise dessas células, células aderentes e não-aderentes a polímeros;
- Avaliar o efeito do tratamento com células mononucleares de medula óssea em animais *knock out* para o gene da citocina IL-10;
- Avaliar a expressão das células de Schwann no nervo de animais com neuropatia induzida e submetidos à terapia celular;
- Investigar a migração das células mononucleares do doador para o sítio da lesão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOR NEUROPÁTICA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS

A incidência mundial de dor neuropática é de cerca de 5% (AGUILERA-MUÑOZ *et al.*, 2005) com prevalência mundial estimada de 1,5% (TAYLOR, 2006; VADALOUCA *et al.*, 2006). Pacientes com dor neuropática possuem uma má qualidade de vida com elevado consumo de medicamentos e recursos terapêuticos e frequentemente sofrem de comorbidades tais como depressão, ansiedade, distúrbios no sono e dificuldades no trabalho e de concentração, demandando reabilitação e acompanhamento psicológico para portadores e familiares (HAYTHORNTHWAITE e BENRUD-LARSEN, 2000; NEUROPATHIC PAIN FACT SHEET). Embora seja difícil estimar com precisão esses dados devido à diversidade de doenças com origem e diagnósticos específicos que estão englobadas nesta categoria, estudos indicam que o ônus associado à dor neuropática para pacientes e sistemas de saúde é potencialmente grande. Nos Estados Unidos estima-se que entre custos com despesas médicas e redução da produtividade no trabalho sejam gastos em torno de U\$ 90 bilhões anuais com a dor neuropática (MAIZELS e MCCARBERG, 2005).

Segundo o principal fórum profissional para a ciência, prática e ensino sobre dor, a *International Association for the Study of Pain* (IASP), dor corresponde a uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugerem tal dano (MERSKEY e BOGDUK, 1994). Assim, além de subjetiva, a intensidade da dor é produto da experiência individual, sendo então considerado um estado psicológico, e não meramente físico. Ela não é processada de forma passiva durante seu trajeto ao encéfalo, mas ao contrário, está exposta a diversos tipos de modulação em diferentes níveis das vias nociceptivas no sistema nervoso. Dessa forma, a dor é uma experiência complexa, pois depende da interação de diversos sistemas fisiológicos, não apenas daqueles relacionados com a modulação nociceptiva propriamente dita, mas também de sistemas envolvidos com respostas afetivas, emoção, cognição, ativação simpática e modulação hormonal (JENSEN *et al.*, 2006).

A dor pode ser classificada em aguda ou crônica. A dor aguda possui uma função biológica protetora e alerta o organismo contra um possível dano tecidual.

Geralmente é autolimitante e restringe temporariamente certas atividades, impedindo conseqüentemente danos adicionais e agravamento da lesão. Sua sintomatologia, diagnóstico e tratamento geralmente são bem compreendidos, acessíveis e eficazes. Em contraste com a dor aguda onde a dor é um sintoma da doença, tem-se a dor crônica, com etiologia, mecanismos, fisiopatologia, sintomatologia, funções biológicas, diagnóstico e abordagem terapêutica distintos da dor aguda. Ela não tem função fisiológica clara e causa sofrimento e estresse ao indivíduo. Nos casos de dor crônica a dor deixa de ser um sintoma e passa a ser a doença em si (BONICA, 1990; WOOLF e MANNION, 1999; SÁ *et al.*, 2008).

Dentre as dores crônicas está a dor neuropática, que é a dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso central ou periférico (MERSKEY e BOGDUK, 1994). A dor neuropática pode persistir mesmo após a cura da lesão inicial e não requer estimulação dos nociceptores. Dentre as alterações sensoriais observadas na clínica médica, pacientes com dor neuropática referem dor espontânea (contínua ou intermitente) ou provocada, tais como alodinia (sensação dolorosa a um estímulo inócuo), hiperalgesia (resposta exagerada a um estímulo doloroso), além de paroxismo (dor espontânea aguda), parestesia (sensação anormal não dolorosa geralmente cutânea, como formigamento) disestesia (alteração sensorial desagradável), entre outros (JENSEN *et al.*, 2001, 2006). A dor neuropática resulta de dano físico, químico, metabólico ou doença em tecidos neurais que induzem a patologia nos nervos periféricos (neuropatia), nos gânglios autonômicos ou sensoriais (ganglionopatia) ou na raiz dorsal (radiculopatia). Dentre os eventos que podem conduzir à dor neuropática estão trauma ou compressão de nervos e plexos por tumores ou acidentes, infecções, inflamações, alterações metabólicas – como a neuropatia diabética, má-nutrição, isquemia, alterações vasculares, neurotoxinas – como agentes quimioterápicos, radiação, doenças autoimunes, bem como resultado de uma fisiopatologia secundária a uma dor aguda (HANSSON, 2002; DEVOR, 2006).

Tem sido descrito que a atividade neural mantida ou repetida induz plasticidade e leva a mudanças na expressão gênica e alterações duradouras no sistema nervoso (Goelet *et al.*, 1986). Similarmente, a ativação persistente dos nociceptores também resulta em plasticidade neural levando a modificações funcionais nas vias de condução e processamento da dor. Estas modificações melhoram a *performance* das vias nociceptivas, tanto na periferia (sensibilização

periférica) quanto no sistema nervoso central (SNC) (sensibilização central), que se refletem em estados de dor crônica (DUBNER e BENNETT, 1983; DUBNER e RUDA, 1992). Na dor neuropática também participam ambos componentes, periférico e central. De forma simplificada, a dor neuropática é um processo que envolve principalmente (1) aumento da geração de potenciais de ação na fibra aferente primária, decorrente em grande parte do aumento do número de canais iônicos nas fibras nervosas periféricas lesionadas, causando redução do limiar de ativação e produzindo descargas ectópicas; (2) redução da atividade dos sistemas descendentes inibitórios do SNC e (3) sensibilização central, de forma que a entrada sensorial é amplificada e sustentada por longo tempo (FIELDS *et al.*, 1998; DWORKIN, 2003).

Os nociceptores apresentam alto limiar de ativação, porém durante dano neuronal há redução do limiar e sensibilização a diversos estímulos (HENRY, 1989). Isso ocorre porque após a lesão no nervo inicia-se um processo de regeneração que conduz a um aumento da excitabilidade dos nociceptores com ocorrência de descargas espontâneas. Na dor neuropática, essas descargas que tem a função de promover a regeneração das fibras C representam impulsos erráticos que são transmitidos ao SNC induzindo a um estado de hipersensibilidade mecânica duradoura. Durante esse processo, há um aumento da expressão de canais iônicos nas fibras aferentes lesionadas, contribuindo diretamente para a eletrogênese presente na dor neuropática. Além disso, o desenvolvimento de hipersensibilidade aos mediadores químicos reduz o limiar nociceptivo e contribui para a estimulação de longa duração, o que promove a sensibilização das células no corno dorsal da medula espinal com facilitação da transmissão sináptica (ZIMMERMANN, 2001).

Em estados normais, o sistema espinal de transmissão do estímulo doloroso está sob constante inibição a partir de centros no tronco encefálico, tais como a matéria cinzenta periaquedutal (antes substância cinzenta periaquedutal) e o *locus coeruleus*. Além disso, outras áreas no tronco encefálico como o núcleo magno da rafe e a formação reticular possuem receptores para o sistema opióide endógeno que participam da criação da analgesia (FIELDS e BASBAUM, 1994). Nas situações em que a supressão da dor ocorre de forma apropriada, a matéria cinzenta periaquedutal projeta-se nos núcleos da rafe bulbares e em outras partes da formação reticular. Estas se projetam para a medula espinal e inibem a transmissão de informações nociceptivas provenientes dos aferentes primários para o trato

espinotalâmico. Na dor neuropática ocorre uma ineficiência desses sistemas inibitórios, resultando em ampliação da informação nociceptiva (ZIMMERMANN, 2001).

A transmissão do sinal de dor da periferia para áreas ascendentes do encéfalo é um processo dinâmico. Sinais de dor podem ser reprimidos (analgesia), seguirem inalterados ou podem ser amplificados (hiperalgesia). Assim, a modulação da dor ocorre no corno dorsal da medula espinal aonde chegam os nervos periféricos especializados retransmitindo informações sensoriais aos neurônios pós-sinápticos, que ascendem contralateralmente para o encéfalo carregando a mensagem de dor. A primeira sinapse desse circuito, onde a periferia encontra o SNC, participa ativamente da geração de analgesia ou hiperalgesia através de uma cascata intrincada de eventos envolvendo diversas citocinas, fatores neurotróficos e neurotransmissores (WATKINS e MAIER, 2000).

Na dor neuropática, a lesão do nervo periférico também provoca uma reação em células imunes e gliócitos em diferentes sítios anatômicos. Macrófagos e células de Schwann facilitam a degeneração da fibra nervosa na porção distal à lesão, enquanto no gânglio da raiz dorsal (GRD) a resposta imune é conduzida por macrófagos, linfócitos e células satélite. Em consequência, na medula espinal a micróglia é ativada como resposta à lesão periférica e em seguida se dá a ativação e proliferação dos astrócitos, conforme Figura 1 (SCHOLZ e WOOLF, 2007).

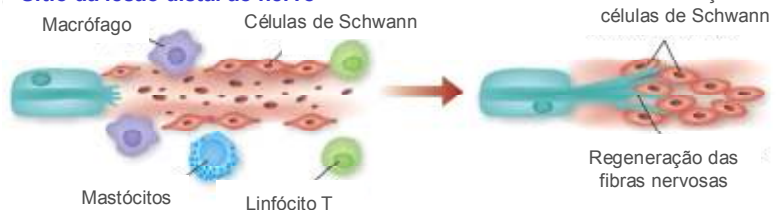
Após lesão de nervo periférico o aumento da sensibilidade nociceptiva conduz a estados patológicos e a alguns casos irreversíveis de dor devido a mecanismos neuronais como a sensibilização periférica e central. Na sensibilização periférica mediadores inflamatórios agem nas fibras sensoriais conduzindo a uma hiperatividade de moléculas transdutoras levando ao aumento da sensibilidade e excitabilidade dos nociceptores (SUTER *et al.*, 2007). Durante a sensibilização central há ativação e hipertrofia de gliócitos, com a liberação de óxido nítrico, aminoácidos excitatórios, espécies reativas de oxigênio (ROS), prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor- α*) e o fator de crescimento neural (NGF, *nerve growth factor*). A ativação de gliócitos pode criar expansões a partir do local onde a dor é percebida em decorrência da ação difusa de moduladores no corno dorsal da medula espinal, fazendo com que outras regiões do corpo recebam a informação sensorial de dor (WATKINS *et al.*, 2001a).

A Lesão no nervo periférico

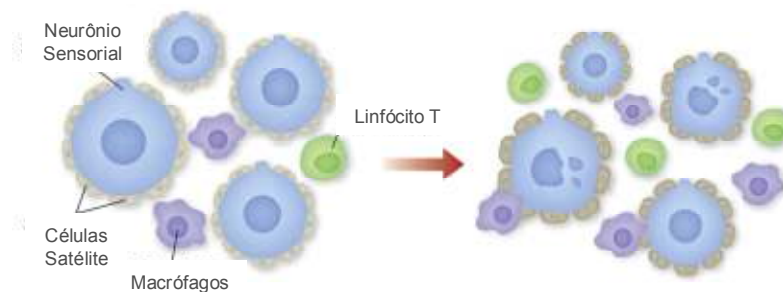


B Reações imunes e de gliócitos

Sítio da lesão distal ao nervo



GRD (Gânglio da Raiz Dorsal)



Medula Espinal

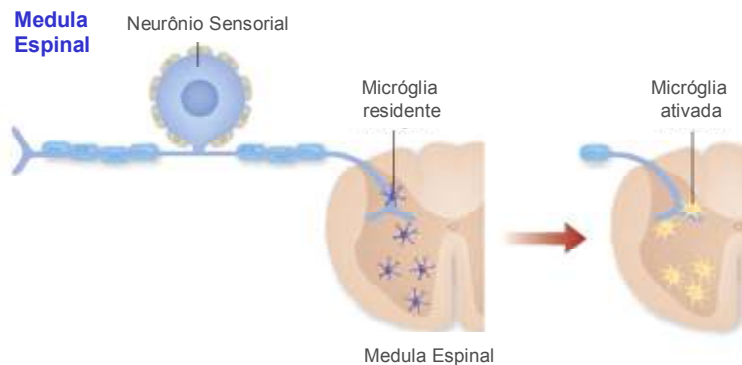


Figura 1: A) Lesão no nervo provoca o recrutamento e ativação de células do sistema imune no local da lesão, no gânglio da raiz dorsal e no corno ventral e dorsal da medula espinal. B) No topo, macrófagos, linfócitos T e mastócitos invadem o local da lesão e se espalham ao redor da fibra lesionada. As células de Schwann começam a proliferar, desdiferenciar e formar fusos de orientação para a regeneração axonal. No centro, número de macrófagos e linfócitos T aumenta no GRD após a lesão. Os macrófagos também transitam pela bainha formada por células satélite ao redor dos corpos celulares dos neurônios sensoriais primários. Células satélite proliferam e aumentam a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Abaixo, uma semana após a lesão do nervo, população de micróglia é ativada tanto no corno ventral da medula espinal, ao redor dos corpos celulares dos neurônios motores, quanto no corno dorsal, território de projeção das fibras aferentes primárias. **Fonte:** Adaptado de Scholz e Woolf (2007).

Antes denominados células gliais, neuróglias ou simplesmente glia, os gliócitos compreendem um conjunto de diferentes células que inicialmente receberam esse nome por acreditarem que sua única função era de sustentação neuronal (daí o nome glia, palavra derivada do grego que significa “cola”). Além da função primária de proteção neuronal, os gliócitos são fonte de energia e precursores neuroquímicos aos neurônios, regulam a concentração iônica extracelular e removem restos celulares. Nesse contexto, ainda têm participação na febre, alterações no sono, distúrbios de aprendizado e memória e em condições de neuroinflamação e neurodegeneração (WATKINS *et al.*, 2007). Os gliócitos correspondem a um conjunto de células distintas, morfológica e funcionalmente, podendo ser divididos em subgrupos cuja denominação está associada às suas dimensões: micróglias e macróglias.

A micróglias compreende cerca de 5 a 12% das células do SNC, são heterogeneamente distribuídas e têm sua origem embriológica mesodérmica na migração de monócitos perinatais derivados da medula óssea (LAWSON *et al.*, 1990; NAKAJIMA e KOHSAKA, 2001). Sua principal atividade está intimamente relacionada à sua origem monocítica especializada, sendo os macrófagos residentes e exercendo o papel de fagocitose e controle imunológico. Na ausência de estímulos, acreditava-se que a micróglias estaria no estado denominado quiescente, sendo ativada após trauma, inflamação, infecção, isquemia ou neurodegeneração (PERRY *et al.*, 1985). Estudos recentes comprovam que a micróglias não está dormente em condições normais, porém sua atividade é intensamente ampliada após lesão neural, tornando-se reativa com proliferação, expressão de receptores e alteração funcional. Sua ativação na medula espinal conduz a estados de dor crônica, possuindo um papel dual em diversas doenças neurológicas. Na presença de mediadores neurotóxicos como TNF- α , IL-1 β e espécies reativas de oxigênio tem função deletéria, enquanto que na presença de fatores de crescimento como o NGF age protegendo e restaurando o tecido. É importante ressaltar que na medula espinal todos esses mediadores promovem o estado nociceptivo (SUTER *et al.*, 2007). As modificações associadas à ativação da micróglias participam da fisiopatologia da dor neuropática, pois uma vez tendo ocorrido ativação glial, há uma facilitação da transmissão da informação nociceptiva na medula espinal em função da transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias e neurotransmissores envolvidos na manutenção da dor (WATKINS *et al.*, 2001a,b; TANGA *et al.*, 2004).

A macróglia tem seus principais representantes nas células envolvidas na regeneração axonal, sendo eles os astrócitos no SNC e células de Schwann no sistema nervoso periférico (SNP). Além de regeneração axonal, a macróglia também está envolvida na formação do estrato mielínico – antes denominado bainha de mielina – realizada pelos oligodendrócitos no SNC e células de Schwann no SNP. Embora a mais recente *nomina anatomica* tenha designado ambas as células formadoras de mielina como oligodendrócitos, este trabalho ainda referiu-se a “células de Schwann” quando se tratou da periferia, uma vez que essa nomenclatura ainda é amplamente utilizada nas principais literaturas, evitando assim erros de interpretação. Correspondendo a 90% do espaço endoneural, as células de Schwann possuem funções relacionadas ao controle da concentração iônica de K⁺ (íons de potássio), armazenamento de glicogênio, cicatrização neuronal, secreção de fatores tróficos, mediadores inflamatórios e neurotransmissores, possuindo a habilidade de migrar para perineuro e epineuro durante lesão neuronal (CHENG e ZOCHODNE, 2002). Anatomicamente, células de Schwann não-mielizantes estão associadas com fibras sensitivas de pequeno diâmetro, como a fibra nociceptiva do tipo C, e são identificadas com base na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP, *glial fibrillary acidic protein*). Já as células de Schwann mielinizantes são associadas com axônios de médio e largo diâmetro de fibras aferentes e são identificadas por outras proteínas localizadas externamente ao estrato mielínico (PETERS *et al.*, 2007). Específica de células gliais e pertencente a uma família de filamentos intermediários, a GFAP aparece em estágio tardio de desenvolvimento das células de Schwann e é infrarregulada nas células formadoras do estrato mielínico. Após o nascimento do indivíduo, apenas células de Schwann não-formadoras de mielina e aquelas que se desdiferenciam após lesão neuronal expressam a GFAP, enquanto que as células de Schwann mielinizantes expressam outra proteína, a vimentina (JESSEN *et al.*, 1990; TRIOLO *et al.*, 2006). Também expressa em astrócitos, a GFAP modula a resposta celular conduzindo à proliferação e recuperação do tecido após lesão neuronal através de sua atuação como constituinte do citoesqueleto. Falha ou interrupção na produção da GFAP pode interferir com a capacidade regenerativa do nervo em condições crônicas podendo conduzir à degeneração e perda neuronal (TRIOLO *et al.*, 2006). Em íntimo contato com neurônios sensoriais, as células de Schwann após lesão no nervo iniciam a fagocitose com remoção de restos celulares e a síntese de potentes

moléculas biológicas tais como o NGF, o TNF- α e as interleucinas 1 β e 6, dentre outros. Na dor neuropática, as células de Schwann possuem importante papel na indução dos estados de dor tanto no sítio da lesão quanto distal a este, ampliando a informação nociceptiva na fibra sensorial principalmente pela produção de TNF- α (WAGNER e MYERS, 1996; CHENG e ZOCHODNE, 2002; INOUE, 2006; THACKER *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2010).

Os astrócitos constituem 40 a 50% dos gliócitos (ALDSKOGIUS e KOZLOVA, 1998) e estão intimamente envolvidos na maioria das transmissões sinápticas no SNC. Modulando ativamente a comunicação interneuronal no que é denominada sinapse tripartite, astrócitos, neurônio pré e pós-sináptico são partes integrantes da sinalização neuronal (HAYDON e CARMIGNOTO, 2006). Em condições basais provêm os neurônios de suporte trófico, energia, precursores de neurotransmissores, regulam a sobrevivência e diferenciação neuronal (PEREA e ARAQUE, 2002; TSACOPOULOS, 2002). Também são ativados por trauma, inflamação ou infecção e nesse contexto têm importante papel na “memória sináptica”, tornando mais rápida uma resposta após segunda ativação (PASTI *et al.*, 2001) com proliferação, alteração da morfologia e produção de GFAP (ALDSKOGIUS e KOZLOVA, 1998).

A ativação inicial da micróglia conduz a uma ativação de astrócitos com consequente liberação de neurotransmissores, dentre os quais o glutamato se destaca com sua atividade sináptica excitatória na condução da dor (PEREA e ARAQUE, 2002). Portador de receptor para muitos neurotransmissores, o astrócito age na fenda sináptica amplificando e mantendo a sinalização nociceptiva, desencadeando sinalização para outros astrócitos, neurônios e demais componentes da glia (WIESELER-FRANK *et al.*, 2004; HAYDON e CARMIGNOTO, 2006). A ativação microglial precede a proliferação astrocitária após lesão no nervo, ocasião em que a produção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) pela micróglia reduz a atividade inibitória de neurônios gabaérgicos no corno dorsal da medula espinal, facilitando a transmissão nociceptiva. Adicionalmente, após lesão no nervo, a produção de citocinas pela micróglia principalmente IL-1 β , além de TNF- α e IL-6, aumentam no corno dorsal da medula espinal contribuindo para a manutenção da dor neuropática (INOUE, 2006; SCHOLZ e WOOLF, 2007).

Em adição, astrócitos e micróglia interagem e produzem citocinas, neurotransmissores e neuromoduladores, como noradrenalina, prostaglandina E₂

(PGE₂) e óxido nítrico (NO) que atuam sinergicamente na amplificação do sinal e manutenção da dor. Exemplos dessa interação na dor incluem a sinergia entre TNF- α e IL-1 β com a ATP (Adenosina Trifosfato) na liberação de PGE₂ (LOREDO e BENTON, 1998); o óxido nítrico potencializando os efeitos de IL-1 β sobre a produção espinal de PGE₂ e liberação da substância P pelos aferentes primários (MORIOKA *et al.*, 2002); e substância P potencializando os efeitos de IL-1 β sobre a liberação de IL-6 e PGE₂ por astrócitos na medula espinal (PALMA *et al.*, 1997).

A interação entre micróglia e astrócitos é consistente com os mecanismos de desenvolvimento da dor neuropática descritos na literatura, sugerindo que a micróglia é o primeiro tipo celular a ser ativado no SNC e esta ativação conduz ao recrutamento de astrócitos vizinhos (LEDEBOER *et al.*, 2005; WATKINS, 2007). As interações e funções desses dois tipos celulares representam o ponto-chave na fisiopatologia da dor neuropática e sobretudo nos eventos relacionados à sua manutenção independentemente dos sinais periféricos, e explicam em parte porque esses estados de dor podem persistir após o reparo da lesão inicial (WATKINS *et al.*, 2001a). Segundo Wieseler-Frank *et al.* (2004), a ativação glial é necessária e suficiente para desencadear as alterações relacionadas ao comportamento nociceptivo, agindo tanto na criação quanto na manutenção da dor.

Dentre as citocinas, algumas se destacam pelo seu papel fundamental na instalação e manutenção da dor crônica. A interleucina-1 β (IL-1 β) é uma das muitas citocinas pró-inflamatórias pluripotentes. Secretada por macrófagos, monócitos e micróglia, é um dos principais agentes algogênicos da dor neuropática, estando associada à criação dos estados exagerados de dor por suas ações na medula espinal (INOUE, 2006). Nesta região, age conduzindo os nociceptores a hiperexcitabilidade, além de ampliar a informação nociceptiva para outros gliócitos e neurônios (WATKINS *et al.*, 2001a,b; WIESELER-FRANK *et al.*, 2004). Na periferia, conduz à prolongada hiperalgesia e alodinia, excitando diretamente as fibras nociceptivas e desencadeando a liberação de outras citocinas e neuropeptídeos nociceptivos. Em modelos de dor neuropática, IL-1 β é uma das primeiras substâncias a serem produzidas na hierarquia dos mediadores dos estados nociceptivos e o início da sua expressão está diretamente associado com o início do estado de alodinia mecânica. Juntamente com o TNF- α , marca a instalação e manutenção dos quadros nociceptivos na dor neuropática (OKAMOTO *et al.*, 2001; MILLIGAN *et al.*, 2003). O TNF- α inicia a cascata de ativação de diversas citocinas e

fatores de crescimento a partir da lesão periférica, estando diretamente envolvido no desenvolvimento da hiperalgesia e alodinia em modelos de dor neuropática (CUI *et al.*, 2000; THACKER *et al.*, 2007). O aumento da expressão de receptores para o TNF- α na fibra lesionada torna essa citocina diretamente implicada com a fase de iniciação da dor neuropática (SCHAFERS *et al.*, 2003; THACKER *et al.*, 2007). A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional envolvida na modulação de reações inflamatórias e respostas imunes (OKAMOTO *et al.*, 2001). Pertence à superfamília das citocinas neuropoiéticas e seus níveis no sistema nervoso adulto são dificilmente detectáveis. Sua síntese está fortemente associada ao desenvolvimento, diferenciação, regeneração e degeneração neuronal, tanto no sistema nervoso central quanto periférico. Sua síntese ocorre principalmente em neurônios e gliócitos. Sua participação na instalação da alodinia mecânica por ação direta nos neurônios nociceptivos tem sido relatada (GADIANT e OTTEN, 1997; ZHONG *et al.*, 1999), bem como um efeito neuroprotetor e hipoalgésico, caracterizando seu papel dual nos estados nociceptivos (VALLIÈRES e RIVEST, 2002; FLATTERS *et al.*, 2004).

No contexto da manutenção das funções vitais e homeostase do organismo, atuam as citocinas anti-inflamatórias, tais como a interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-10 (IL-10). Essas citocinas representam um contrabalanço para os mecanismos de instalação e manutenção da dor, tendo sido descrita sua ação anti-hiperalgésica em modelo animal de dor neuropática (WAGNER *et al.*, 1998). Inicialmente denominada de fator inibitório da síntese de citocinas (CSIF, *cytokine-synthesis inhibitory factor*) devido à sua capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , a IL-10 era reconhecida por sua atividade imunossupressora, o que lhe conferia um caráter anti-inflamatório. No entanto, estudos posteriores identificaram o papel imunoestimulador da IL-10 no recrutamento de leucócitos por ampliação da quimiotaxia e expressão de moléculas de adesão, bem como ampliação da produção do fator de crescimento transformante beta (TGF- β , *transforming growth factor- β*), que atua nos efeitos supressivos das respostas inflamatórias (FUSS *et al.*, 2002; MOCELLIN *et al.*, 2004). Além do seu papel na supressão inflamatória dependente de IL-10, TGF- β participa dos efeitos neurotróficos relacionados à regeneração axonal (SULAIMAN e GORDON, 2002; WALSH e MIDHA, 2009).

2.2 TERAPÊUTICA DA DOR NEUROPÁTICA

A lesão no nervo produz mudanças moleculares e celulares com alteração da expressão gênica que resultam em plasticidade neuronal e reorganização anatômica e funcional em vários níveis das vias de condução e processamento da dor. Essas alterações, periféricas e centrais, determinam uma complexa fisiopatologia para a dor neuropática, o que se reflete em inconsistente resposta terapêutica a fármacos convencionais (WANG *et al.*, 2002). Enquanto a dor aguda, resultante de lesão ou inflamação tecidual, é eficientemente tratada com anti-inflamatórios e analgésicos, a dor neuropática é tratada com medicamentos que influenciam a excitabilidade neuronal, como antidepressivos e antiepilépticos (ou anticonvulsivantes), sendo com frequência resistente à terapêutica convencional, inclusive aos opióides (DRAY *et al.*, 1994).

Os tratamentos farmacológicos vigentes enquadram-se predominantemente em três grandes grupos: os antidepressivos, os anticonvulsivantes e os opióides. Os antidepressivos tricíclicos (TCA – *tricyclic antidepressants*) representam a primeira classe de medicamentos que provou alguma eficácia na dor neuropática em ensaios clínicos controlados (MCQUAY *et al.*, 1996; COLLINS *et al.*, 2000; SINDRUP e JENSEN, 2000), e têm como principais representantes a amitriptilina, imipramina, desipramina e a nortriptilina. Seu efeito analgésico é independente de seu efeito antidepressivo (MAIZELS e MCCARBERG, 2005), e possuem diversas ações farmacológicas, tais como bloqueio da recaptção de noradrenalina e serotonina, bloqueio dos canais de sódio e cálcio e ativação de receptores opióides. Também agem bloqueando receptores alfa-adrenérgicos, colinérgicos e muscarínicos. Dentre seus efeitos colaterais estão os tipicamente colinérgicos, como xerostomia, sudorese, tontura e sedação. Podem levar ao agravamento de doenças cardiovasculares, glaucoma, retenção urinária e neuropatia autonômica. Devem ser usados com cautela pelo alto risco de suicídio ou overdose, além de poderem bloquear os efeitos de drogas anti-hipertensivas e interagir com fármacos metabolizados pelo mesmo sistema enzimático. Em pacientes idosos podem ocorrer problemas de equilíbrio e cognição (DWORKIN, 2003; JENSEN *et al.*, 2006).

Os anticonvulsivantes, fármacos desenvolvidos para o tratamento da epilepsia, apresentam atividade analgésica reduzindo a excitabilidade neuronal e ampliando o sistema inibitório endógeno pelo bloqueio de canais de sódio e cálcio

dos receptores excitatórios glutamatérgicos. Seu principal representante de primeira geração é a carbamazepina e de segunda geração a gabapentina, pregabalina e lamotrigina (MAIZELS e MCCARBERG, 2005). A gabapentina e a pregabalina agem principalmente pela ligação à subunidade alfa-2-delta dos canais de cálcio no encéfalo e corno dorsal da medula espinal, reduzindo o influxo desse íon e a liberação de neurotransmissores excitatórios e conseqüentemente a excitabilidade periférica (JENSEN *et al.*, 2006; KROENKE *et al.*, 2009). Em ensaio controlado em pacientes com neuropatia diabética, 60% do grupo tratado com gabapentina apresentou melhora contra 33% dos pacientes que receberam placebo (BACKONJA *et al.*, 1998). Dentre seus efeitos adversos estão náusea, sonolência e confusão mental. Os efeitos adversos da gabapentina incluem também sintomas gastrintestinais e leve edema periférico, além de poder causar ou agravar problemas de locomoção e equilíbrio, bem como produzir *déficits* cognitivos em pacientes idosos. Apesar disso, possui boa tolerabilidade, segurança e não apresenta interações medicamentosas com outras drogas, distinguindo-a da maioria dos outros medicamentos usados por via oral para o tratamento de dor neuropática (DWORKIN, 2003). Apesar disso, alguns pacientes não respondem ao tratamento ou tornam-se não responsivos com o passar do tempo (TOTH, 2010), havendo expressiva variabilidade entre indivíduos (SABATOWSKI *et al.*, 2004). Nestas situações, a associação da gabapentina a outros fármacos com distintos mecanismos de ação tem sido usada na tentativa de se obter resultados complementares e efeito sinérgico (VINIK, 2005; SILVER *et al.*, 2007; HAYASHIDA e EISENACH, 2008). A eficácia parcial desse fármaco provavelmente se deve ao fato do seu mecanismo de ação ser exclusivamente pela sua ligação aos canais de cálcio voltagem dependente exercendo aí efeito antagonista. Embora esses canais estejam superexpressos na dor neuropática e sejam importantes para caracterizar os estados de alodinia mecânica, essa é apenas uma das diversas alterações moleculares envolvidas na instalação e manutenção da dor neuropática (MARAIS *et al.*, 2001).

Entre os agonistas opióides, morfina, tramadol e derivados da oxicodeona podem ser utilizados, associados ou não a outros fármacos, no controle da dor neuropática. Eles modulam a dor através de diversos mecanismos, agindo no nociceptor periférico, nos interneurônios e receptores pós-sinápticos, bem como nos sistemas descendentes inibitórios. Seus efeitos adversos mais comuns são constipação, sedação e náuseas. Em pacientes idosos pode ocorrer déficit cognitivo

e motor, o que contribui para um aumento do risco de quedas e fraturas. Analgésicos opióides devem ser usados com cautela em pacientes com histórico de abuso químico ou tentativa de suicídio em função do potencial de adicção. No tratamento com analgésicos opióides pode ocorrer o desenvolvimento de tolerância, isto é, uma redução da potência analgésica com o tratamento continuado. A combinação de terapias é uma frequente opção quando os pacientes não apresentam melhora após o uso dos medicamentos de primeira linha, porém isso inclui um aumento de risco de efeitos adversos (DWORKIN, 2003). Por outro lado, a eficácia dos opióides no controle da dor neuropática é apenas parcial, requerendo aumento constante das doses e apresentando diversos efeitos colaterais, tais como disfunções hormonais, imunológicas e algumas vezes hiperalgesia paradoxal (VADALOUCA *et al.*, 2006; HAYASHIDA *et al.*, 2007). Em uma meta-análise comparando o efeito dos opióides a outros fármacos e placebo, observou-se que no grupo que recebeu opióides houve 33% de abandono da terapia, sendo 15% devido à ineficácia no controle da dor e 21% por conta dos efeitos colaterais, tendo alguns pacientes reportado ambas as razões (FURLAN *et al.*, 2006).

Segundo Ro e Chang (2005), a terapêutica para a dor neuropática ainda permanece um desafio em virtude de ainda não haver entendimento completo dos seus mecanismos, seleção incorreta de tratamentos, diagnóstico inadequado e abordagem inapropriada por não considerar a natureza multifatorial da dor neuropática bem como as comorbidades associadas. Apesar das diferentes classes de fármacos atualmente utilizadas no controle da dor neuropática, para algumas das etiologias, independentemente do tratamento oferecido, apenas cerca de um terço dos pacientes atingem mais de 50% do alívio da dor (JENSEN *et al.*, 2006). Além disso, os fármacos atualmente disponíveis exercem um efeito paliativo sobre a doença, não atuando como tratamento capaz de modificar o padrão da neuropatia. Diante disso, uma parcela considerável da população portadora de dor neuropática aguarda um tratamento mais efetivo, que promova recuperação das funções sensoriais e restauração psicossocial do indivíduo. Neste cenário a terapia celular vem se mostrando potencialmente capaz de suprir essa lacuna, tendo nas células-tronco o seu maior expoente.

2.3 TERAPIA CELULAR E SUAS POTENCIALIDADES

Células-tronco têm sido descritas como células indiferenciadas com capacidade de proliferação e autorrenovação, ou seja, produzir células-filhas capazes de permanecerem como células-tronco. Além disso, podem produzir um amplo número de progenitores diferenciados e efetores, bem como contribuir para regeneração tecidual. Recentes evidências sugerem que células-tronco em adultos podem transitar através da circulação e possuem plasticidade que permite alterarem sua função de acordo com o microambiente (BLAU *et al.*, 2001). Elas têm sido classificadas em toti, pluri, multi, oligo ou unipotentes, de acordo com seu potencial de desenvolvimento. Assim, células-tronco totipotentes são aquelas capazes de dar origem a todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, enquanto que as pluripotentes podem dar origem a tipos celulares próprios do embrião apenas. As multipotentes originam alguns subtipos de linhagens celulares de forma mais ampla que as oligopotentes e as unipotentes são capazes de originar apenas um tipo celular maduro (RAFF, 2003; WAGERS e WEISSMAN, 2004).

As células-tronco adultas, como todas as células-tronco, também possuem a capacidade de produzir cópias idênticas de si mesmas por longo tempo, o que é denominado autorrenovação, e podem dar origem a tipos celulares maduros com características morfológicas e funções especializadas distintas. Elas são raras e sua função primária é manter a homeostase celular e, com limitações, repor células mortas por lesão ou doença. Estão dispersas no indivíduo adulto e possuem comportamento diferenciado, a depender do ambiente em que estão. Diferentemente das células-tronco embrionárias, que são assim definidas por serem conhecidamente originadas da massa interna do blastocisto, as células-tronco adultas têm origem um tanto incerta, sendo proposto um bloqueio de sua diferenciação durante o período fetal. Atualmente tem-se a descrição da sua presença em tecidos pertencentes aos três folhetos embrionários, tais como medula óssea, sangue periférico, encéfalo, medula espinal, polpa dentária, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitélio da pele e do sistema digestivo, córnea, retina, fígado e pâncreas (STEM CELL INFORMATION; WAGERS e WEISSMAN, 2004).

O uso terapêutico de células-tronco adultas pode evitar questões éticas, além de apresentar outras vantagens adicionais, tais como a possibilidade de isolamento

do paciente que requer o tratamento, evitando problemas de rejeição imunológica e reduzido risco de formação tumoral, que ocorre frequentemente quando camundongos recebem células-tronco embrionárias e/ou germinativas (MARTIN, 1981; SMITH, 2001; RAFF, 2003).

Na medula óssea há dois tipos principais de células-tronco residentes de diferentes origens: as hematopoiéticas e as mesenquimais ou estromais, conforme ilustrado na Figura 2.

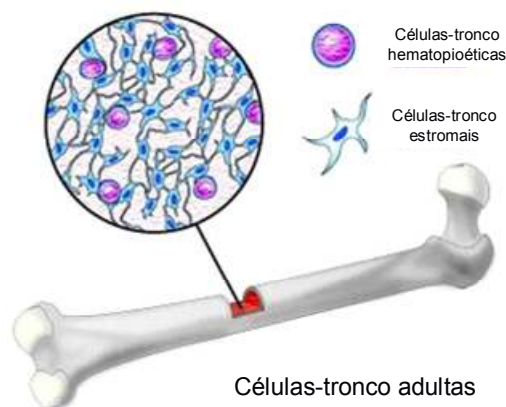


Figura 2: Principais populações de células-tronco adultas residentes na medula óssea de ossos longos. **Fonte:** Cell Imaging Core.

As células-tronco hematopoiéticas são capazes de reconstituir as células sanguíneas, tanto a linhagem mieloide quanto a linfóide (LAGASSE *et al.*, 2001), tendo sido primeiramente isolada em 1988 e representando cerca de 0,05% de todas as células da medula óssea (SPANGRUDE *et al.*, 1988). Relatos recentes apontam para a capacidade deste tipo celular em contribuir para a formação de tecidos não-hematopoiéticos (BLAU *et al.*, 2001; WAGERS e WEISSMAN, 2004). De fato, tem sido proposto que células derivadas de medula óssea participam não apenas da reposição sanguínea, mas também contribuem para a formação do músculo, cérebro, fígado, coração e endotélio vascular (BLAU *et al.*, 2001; SZILVASSY, 2003). Alguns autores têm sugerido um fluxo reverso no qual células-tronco do SNC e músculo podem dar origem a células sanguíneas. Embora muitas dessas transições tenham sido observadas após lesão tecidual, há documentação de transição entre distintos compartimentos na ausência de dano (BLAU *et al.*, 2001). Diferentemente das células-tronco hematopoiéticas circulantes, há um população estimada de 0,001 a 0,01% de células derivadas da medula óssea não circulante com notada plasticidade, as células tronco mesenquimais (CASTRO-

MALASPINA *et al.*, 1980; PITTENGER *et al.*, 1999; JONES *et al.*, 2002). Elas podem ser isoladas de indivíduos adultos e induzidas *in vitro* e *in vivo* a se diferenciar em uma variedade de células de tecidos mesenquimais, incluindo osso, cartilagem, tendão, tecido adiposo, estroma da medula óssea e músculo, além de células típicas do SNC, como neurônios e astrócitos (KOPEN *et al.*, 1999; PITTENGER *et al.*, 1999; LIECHTY *et al.*, 2000; SANCHEZ-RAMOS *et al.*, 2000; WOODBURY *et al.*, 2000).

Células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais são inicialmente separadas *in vitro* pela característica de adesividade fortemente expressa em células mesenquimais. Quando a medula óssea é dissociada e a mistura de células é colocada em recipientes para cultura, as células-tronco mesenquimais aderem à superfície, enquanto que as hematopoiéticas permanecem no sobrenadante. Além disso, em condições específicas *in vitro*, as células-tronco mesenquimais formam colônias a partir de uma única célula, que é então denominada unidade formadora de colônia, e podem se diferenciar em diversos tipos celulares a depender do estímulo do ambiente. Assim, diferentemente das células-tronco hematopoiéticas que não se dividem *in vitro*, as células-tronco mesenquimais da medula óssea podem proliferar duplicando sua população por cerca de 35 vezes (STEM CELL INFORMATION; BRUDER *et al.*, 1997).

Dados experimentais diversos, e por vezes conflitantes, sugerem que o conceito de célula-tronco se refira a um estado de trânsito contínuo, reavaliando assim a noção de que há reservas de células-tronco adultas tecido-específicas. Assim, células-tronco podem não estar agindo localmente em um tecido no qual residem, mas serem recrutadas através da circulação para diversos tecidos distais ao seu sítio, conforme Figura 3. De acordo com esta visão, muitos tipos celulares de distintos tecidos em diversos graus de diferenciação podem ser recrutados para funcionar como células-tronco de acordo com sua expressão gênica, requerendo uma expansão da visão tradicional de célula-tronco e indicando que esta não é necessariamente uma entidade celular específica, mas de certa forma uma função que pode ser assumida por diversos tipos celulares (BLAU *et al.*, 2001).

A eficácia da terapia celular no tratamento de diversas doenças tem sido amplamente documentada na literatura, principalmente em modelos animais. Com relação à lesão de tecido nervoso, o pré-tratamento com células-tronco mesenquimais tem demonstrado estimular a angiogênese e neurogênese após lesão cerebral (CHOPP e LI, 2002), restabelecer a sensibilidade plantar após lesão

medular em ratos (SYKOVÁ *et al.*, 2006) e promover melhora na atividade motora após lesão medular em ratos pela orientação das fibras nervosas (HOFSTETTER *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2003). Como a dor neuropática está diretamente relacionada à perda da integridade ou função neural é possível que as células-tronco sejam capazes de recuperar a função do sistema nervoso, reduzindo os sintomas da neuropatia. De fato, em modelos murinos de dor neuropática por lesão do nervo isquiático, o tratamento com células mesenquimais (CORONEL *et al.*, 2006; MUSOLINO *et al.*, 2007) e mononucleares (KLASS *et al.*, 2007) da medula óssea, administradas previamente ou no momento da cirurgia para indução do modelo, restabelecem o limiar nociceptivo mecânico. Porém o pré-tratamento conforme realizado nesses trabalhos não mimetiza o que ocorre na prática clínica, uma vez que o paciente necessita de uma terapia após a manifestação da doença. Além disso, o pré-tratamento também impede a comprovação de que o modelo foi realmente eficaz na indução da dor neuropática. Adicionalmente, apesar dos resultados positivos, os mecanismos envolvidos nos efeitos terapêuticos das células-tronco na neuropatia experimental não estão ainda estabelecidos.

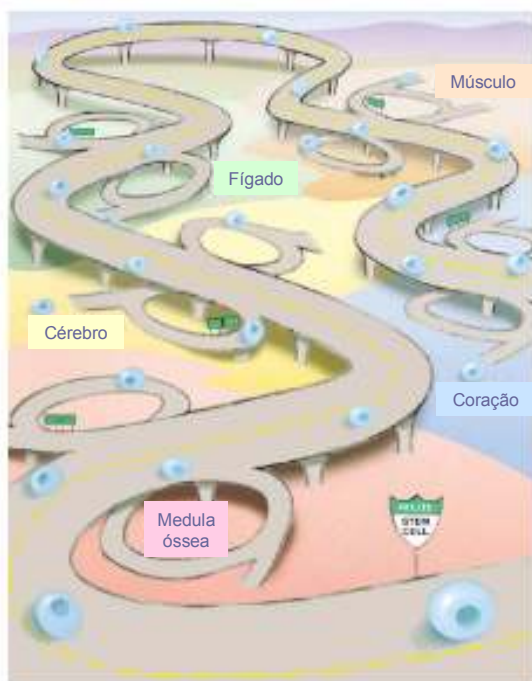


Figura 3: Características das células-tronco adultas, incluindo plasticidade, diversidade de origem e potencial em originar diferentes tecidos. As células-tronco (em azul) são capazes de acessar diversos órgãos a partir da circulação sanguínea (rodovias) e gerar tipos celulares específicos em resposta à presença de fatores de crescimento que atuam como sinalizadores. **Fonte:** Adaptado de Blau *et al.* (2001).

Fruto de experimentos com diferentes modelos, estratégias de purificação, detecção e identificação celular, diversas teorias vêm surgindo para explicar o mecanismo de ação pelo qual a terapia celular vem alcançando resultados. Transdiferenciação e fusão celular foram as primeiras hipóteses que surgiram em função do caráter regenerador e reparador desta terapia (WAGERS e WEISSMAN, 2004). A transdiferenciação compreende a conversão de células de uma linhagem específica de determinado tecido em células de uma linhagem distinta, porém embriologicamente relacionada, com perda de marcadores teciduais específicos e função da célula de origem e aquisição de marcadores e função do tipo celular transdiferenciado (WATT e HOGAN, 2000). Essa ideia abarca o conceito de plasticidade, explicando como células-tronco de determinada linhagem poderiam ser flexíveis, respondendo ao microambiente com a ativação de uma programação de diferenciação dormente, capaz de alterar a especificidade da linhagem celular (BLAU *et al.*, 2001; MORRISON, 2001; WAGERS e WEISSMAN, 2004). Outro conceito, o da desdiferenciação, sugere a conversão de uma linhagem madura tecido-específica em uma mais primitiva, multipotente e conseqüentemente rediferenciada através de reprogramação, formando um *cluster* de células progenitoras com as características potenciais atribuídas às células-tronco (BLAU *et al.*, 2001; BROCKES e KUMAR, 2002). Outra teoria, a da fusão célula-célula através da regulação de moléculas de adesão e vias de sinalização, possui muitos adeptos, havendo relatos deste fenômeno entre células derivadas de medula óssea e células neurais, cardiomiócitos e hepatócitos (ALVAREZ-DOLADO *et al.*, 2003; MEDVINSKY e SMITH, 2003; VASSILOPOULOS *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003; ALVAREZ-DOLADO *et al.*, 2007).

Atualmente, o efeito parácrino é o mais bem aceito e investigado, segundo o qual fatores liberados durante uma lesão podem induzir células-tronco a migrarem para o tecido lesado, onde liberam fatores de crescimento e promovem a ativação gênica. Os fatores moleculares envolvidos na migração e diferenciação das células-tronco dependem do tecido, grau de lesão e células-tronco envolvidas, podendo ser tecido-específicos ou genéricos com relação à lesão (BLAU *et al.*, 2001; NAKANISHI *et al.*, 2008). Além disso, há descrição de que células-tronco mesenquimais migram preferencialmente para o local da lesão e secretam fatores cuja ação parácrina possui propriedades anti-inflamatórias. Assim, essas células interagem com células do sistema imune inato exercendo efeito supressor pela produção de fatores

solúveis anti-proliferativos e anti-citotóxicos tais como TGF- β , NO, PGE₂, IL-6 e IL-10 (BERNARDO *et al.*, 2009).

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR NEUROPÁTICA

Diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos e reproduzidos com o objetivo de mimetizar, ao menos em parte, as características da dor neuropática em humanos. Neste cenário, existem modelos para estudo da dor neuropática de origem central, sendo a maioria baseado em lesão medular, e modelos de dor periférica por lesão em nervos. Os diversos métodos diferem no local e forma da lesão, incluindo transecção, ligadura parcial (transfixação) ou total, crioneurólise, esmagamento, inflamações e invasão tumoral (WANG e WANG, 2003). Também há neuropatia experimental induzida por doenças, tais como o modelo de dor neuropática diabética em animais deficientes na produção de insulina ou resistentes a esta, sendo mais comumente utilizados os modelos induzidos quimicamente, como a neuropatia diabética induzida por estreptozotocina, que destrói as células secretoras de insulina (FOX *et al.*, 1999). Além disso, mimetizando a dor crônica sofrida por pacientes com câncer submetidos à quimioterapia, há modelos de dor neuropática que incluem indução por vincristina, um agente alcalóide utilizado no tratamento da doença, além de outros agentes antineoplásicos, como o Taxol e a Cisplatina, que em geral exibem seus efeitos nociceptivos em virtude do seu caráter neurotóxico (WANG e WANG, 2003).

Os estudos laboratoriais existentes em humanos suportam a ideia de que os mecanismos fisiopatológicos descobertos em modelos animais são relevantes para o entendimento da dor neuropática em humanos (TOREBJORK, 1993; SANG *et al.*, 1996; ORSTAVIK *et al.*, 2003). Segundo Wang e Wang (2003), o estudo dos mecanismos da dor em linhagens celulares é uma área ainda em expansão, entretanto estudos em modelos animais têm demonstrado grande relevância na elucidação dos mecanismos moleculares da liberação de neurotransmissores e transdução do sinal da dor. Para Malmberg e Basbaum (1998), um grande avanço no entendimento dos mecanismos que delineiam os estados de dor neuropática tem sido obtido com o desenvolvimento de estudos em modelo animal, principalmente aqueles que envolvem a lesão parcial do nervo, conforme adotado nesse trabalho (seguindo a abordagem de Seltzer *et al.*, 1990). Isso se justifica pelo fato de que

nesse modelo há alta reprodutibilidade da síndrome em camundongos, incluindo a redução nos limiares nociceptivos e prolongada alteração na expressão dos neurotransmissores e receptores, tal como ocorre nos seres humanos. Diante disso, diversos autores reafirmam a validade e a importância dos modelos animais para o desenvolvimento de novos agentes analgésicos, para o entendimento dos mecanismos da dor neuropática e para a validação de novos alvos moleculares para o seu tratamento, oferecendo sistemas pré-clínicos cruciais para o estudo da dor de forma racional e segura para os seres humanos (KIM e CHUNG, 1992; CHAPLAN *et al.*, 1994; MALMBERG e BASBAUM, 1998; SHIELDS *et al.*, 2003; WANG e WANG, 2003; BENBOUZID *et al.*, 2008; KISO *et al.*, 2008; INOUE *et al.*, 2009).

Dada a ineficácia da terapêutica vigente para dor neuropática, em virtude de sua fisiopatologia multifatorial, e diante do passivo social que isso representa uma terapêutica com eficácia permanente ou mais duradoura se faz necessária. Nesse contexto, o potencial da terapia celular em regularizar as funções orgânicas sem efeitos adversos mostra-se promissor como tratamento para a dor neuropática, podendo representar o suprimento de uma lacuna farmacológica que atinge diversas pessoas em todo o mundo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos *in vivo* foram usados camundongos da linhagem C57BL/6, machos, pesando entre 20 e 25 gramas, com idade entre 40 e 60 dias, provenientes do Biotério do CPqGM, FIOCRUZ – Ba. Animais *knock out* (KO) para o gene da IL-10 foram machos da mesma linhagem e dentro dos mesmos padrões dos selvagens (*wild type*). Os animais doadores de medula óssea foram da mesma linhagem, porém fêmeas entre 35 e 50 dias de idade e transgênicas do tipo que expressam proteína verde fluorescente em suas células somáticas (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*), sendo detectáveis à técnica de imunofluorescência. Os camundongos foram mantidos em sala climatizada a $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclos de claro/ escuro de 12 horas cada, sem restrição hídrica ou alimentar durante todo o período experimental. Os experimentos comportamentais foram realizados entre as 7 a.m. e 6 p.m.. Em todos os experimentos foram respeitados os critérios de conduta ao uso de animais de experimentação conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do CPqGM, FIOCRUZ – BA (anexo A).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA: LIGADURA PARCIAL DO NERVO ISQUIÁTICO

O modelo de dor neuropática empregado foi o mesmo descrito por Malmberg e Basbaum (1998), adaptado de Seltzer *et al.*, (1990), com ligadura parcial (transfixação) de 1/3 a 1/2 do nervo isquiático, conforme ilustrado na Figura 4. Os animais submetidos à cirurgia receberam Pentabiótico na dose de 10 μL / 10 gramas de peso vivo i.p. 30 minutos antes da cirurgia. Em seguida, foram anestesiados com 2,2,2 Tribromoetanol intraperitonealmente na concentração de 2,5% sendo administrados 100 μL /10 gramas de peso vivo. Na ausência de reflexo conjuntival os animais sofreram epilação manual no local, seguida de limpeza com álcool etílico a 70%. Foi então realizada incisão de 0,5 centímetros na pele e a musculatura do bíceps femoral esquerdo foi exposta.

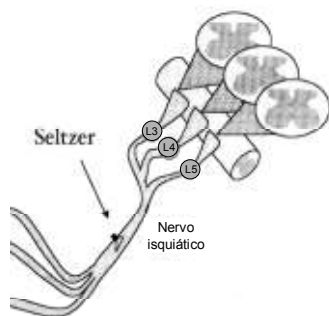


Figura 4: Nervo isquiático e seus ramos, demonstrando a manipulação realizada pelo método de Seltzer *et al.* (1990) para indução do modelo de dor neuropática, com ligadura parcial de 1/3 a 1/2 do nervo isquiático. **Fonte:** Adaptado de Shields *et al.* (2003).

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. Finalizada a cirurgia, a pele foi suturada com fio de polipropileno 5-0 e a ferida cirúrgica sofreu antissepsia com álcool iodado a 1%, conforme demonstrado na Figura 5.

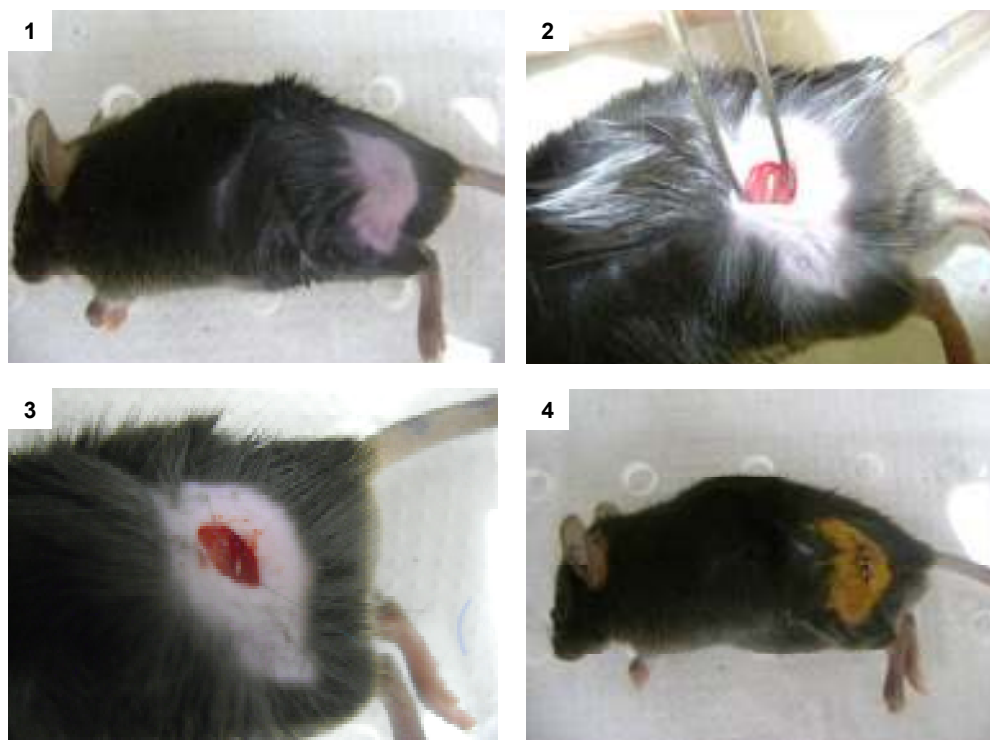


Figura 5: Algumas etapas do procedimento cirúrgico para ligadura parcial do nervo isquiático: 1) Animal anestesiado sofreu epilação manual no local da incisão e limpeza com álcool 70%; 2) Afastamento das fibras musculares do biceps femoral esquerdo com exposição sem manipulação do nervo isquiático; 3) Transfixação do nervo isquiático com fio de seda 8-0; 4) Sutura e antissepsia da ferida cirúrgica com álcool iodado 1%.

Durante e ao fim da cirurgia os animais tiveram a conjuntiva protegida, foram acomodados em caixas aquecidas, com água e ração *ad libidum* e monitorados até o restabelecimento. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado em diferentes tempos ao longo do período experimental. Nesse modelo os animais apresentam sinais de dor espontânea perceptíveis através do comportamento de guarda da pata e/ou lambedura no local da lesão (WANG e WANG, 2003), redução do limiar nociceptivo e prolongada alteração na expressão de receptores e neurotransmissores, apresentando, portanto alta correlação com a síndrome em humanos (MALMBERG e BASBAUM, 1998).

3.3 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO - FILAMENTOS DE VON FREY

Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de alodinia, o limiar de resposta ao estímulo mecânico foi medido com filamentos de von Frey, que consistem de segmentos de fio de nylon cuja rigidez à tensão é previamente determinada em gramas pelo fabricante (Stoelting). Foram utilizados sete filamentos correspondentes às seguintes forças em gramas: 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 0,6; 1; 1,4; 2 e 4, sendo o filamento de partida aquele correspondente a 0,6 gramas. Os camundongos foram postos em caixas de acrílico transparente, elevadas sobre um espelho, com fundo em tela de arame galvanizado que permite acesso à superfície plantar da pata (Figura 6B). Os animais permaneceram nas caixas para adaptação por um período de trinta minutos.

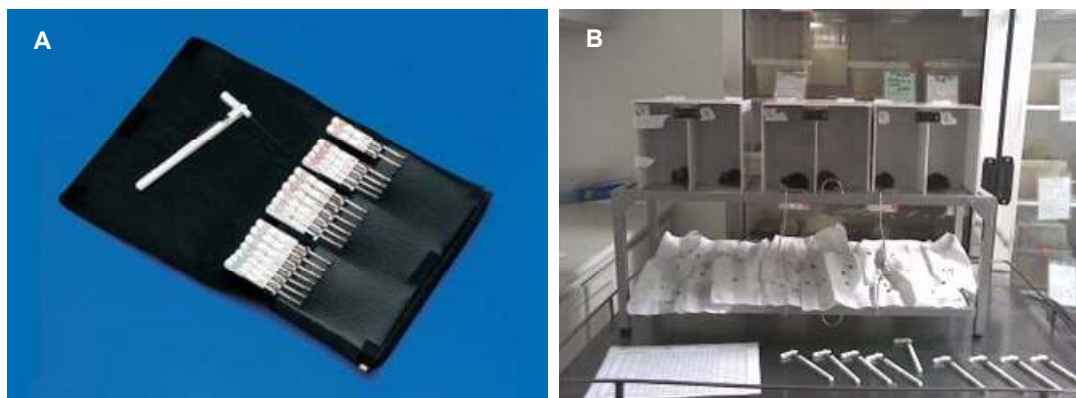


Figura 6: A) Apresentação do conjunto de filamentos padronizados para realização do teste de von Frey. **Fonte:** Stoelting; B) Animais no período de ambientação no aparato para avaliação do limiar nociceptivo mecânico com filamentos de von Frey.

O método de leitura por filamentos de von Frey foi feito conforme previamente descrito por Chaplan *et al.* (1994). Esse método é denominado *up-and-down*, por considerar um total de seis respostas consecutivas iniciando após o filamento em que o animal muda do comportamento não responsivo, interpretado como não nociceptivo, ao comportamento responsivo, detectado pelo movimento de retirada da pata ou *flinch*. Nessa técnica, cada filamento é utilizado por seis segundos e apenas quando o animal está ativo (acordado), com as quatro patas sobre a superfície e o peso do corpo igualmente distribuído (não deitado ou em pé). O animal não é estimulado durante defecação, micção ou *grooming* (lambadura e limpeza do pelo), nem tampouco durante comportamento exploratório da caixa.

O resultado obtido considera o valor logaritmo da força proporcionada pelo último filamento (X_f), o valor obtido de acordo com cada padrão de respostas positivas e negativas (k) e a média da diferença entre os estímulos em unidades logarítmicas (δ), sendo expresso como 50% do limiar nociceptivo em gramas, ou seja, a força do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações, conforme fórmula a seguir:

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

Nos gráficos apresentados neste trabalho optou-se pela unidade de medida mais corrente na literatura, o miliNewton (mN), e para tanto considerou-se $g=10m/s^2$.

3.4 ISOLAMENTO, OBTENÇÃO E TRANSPLANTE DE CÉLULAS

Células totais de medula óssea foram isoladas de fêmur e tíbia de camundongos EGFP, com os animais doadores eutanasiados por inalação de CO₂. Para obtenção e cultivo das células o meio com substrato e antibiótico utilizado foi o DMEM suplementado com gentamicina quando incompleto e adicionado de soro fetal bovino a 10% quando completo. 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 óssea lavada usando-se seringas com agulhas hipodérmicas descartáveis (25 mm X

0,8 mm para fêmur e 13 mm X 0,45 mm para tibia) contendo meio DMEM a fim de coletar as células totais da medula óssea em um tubo com capacidade para 15 mL. Os tubos contendo as células obtidas da medula óssea foram centrifugados a 1500 RPM (806 g) por 5 minutos com freio a temperatura ambiente. Em seguida, todo o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 2 mL de meio DMEM completo. Ao meio contendo 500 µL de Histopaque® 1119 acrescido de 500 µL de Histopaque® 1077 por tubo foi adicionado cuidadosamente o meio contendo as células. Essa combinação de diferentes densidades de Histopaque® permite a obtenção de uma fração enriquecida em células mononucleares. Após isso, os tubos foram cuidadosamente centrifugados a 2500 RPM (2240 g) por 15 minutos sem freio à temperatura ambiente. O anel de células mononucleares formado foi coletado, sendo descartado o restante do material contendo principalmente eritrócitos e granulócitos. Em seguida a fração enriquecida com células mononucleares foi novamente diluída em meio DMEM completo, centrifugada a 1500 RPM (806 g) por 10 minutos com freio à temperatura ambiente, descartado o sobrenadante, ressuscitada em solução fisiológica e procedida a contagem em câmara de Neubauer. Para a contagem na câmara foi coletado 10 µL do meio enriquecido com as células e diluído seriadamente em 80 µL de solução fisiológica adicionada de 10 µL de Azul de Trypan com a finalidade de avaliar a viabilidade das células. Uma amostra da diluição de 1:1000 foi colocada na câmara de Neubauer e foi procedida a contagem nos quatro quadrantes, em todos os campos. O resultado obtido foi dividido por quatro e multiplicado por 10^7 , sendo 10^3 o fator de diluição utilizado (1:1000) e 10^4 o fator da câmara.

Em outra série de experimentos o efeito do lisado de células mononucleares de medula óssea foi avaliado. O procedimento para obtenção desse lisado foi realizado conforme descrito por Yeghiazarians *et al.* (2009) e consistiu de três ciclos de congelamento e descongelamento, onde o congelamento das células em meio DMEM se deu por 10 minutos em recipiente isotérmico com gelo seco e 5 minutos de descongelamento em banho-maria a 37° C. Após esse processo o material foi submetido à centrifugação a 1500 RPM (806 g) durante 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante, contendo os fatores solúveis provenientes das células, foi utilizado para o tratamento dos animais. Neste mesmo tubo houve a formação de um *pellet*, correspondendo às membranas e restos celulares, que foi devidamente descartado.

Em seguida, o efeito terapêutico de células aderentes e não-aderentes, separadas a partir das células mononucleares de medula óssea foi avaliado. Para selecionar células aderentes e não-aderentes, a fração enriquecida de células mononucleares obtidas após processamento por gradiente Histopaque® foi contada e colocada em garrafas de cultura de células, estéreis, de poliestireno, com tampa de rosca com filtro e gargalo inclinado, própria para cultura de células em suspensão. As células foram mantidas nessas garrafas com meio DMEM completo por duas horas em estufa a 37°C, com teor de CO₂ a 5%. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e a garrafa lavada com solução fisiológica para coleta das células não-aderentes. Esse sobrenadante foi separado em tubo plástico, centrifugado, contado e preparado para administração aos animais. As células aderentes foram removidas com auxílio de um “rodo” apropriado, o *Corning Cell Scrapers* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por três ciclos com observação ao microscópio invertido (Olympus, EUA), separadas em tubo plástico, centrifugadas, contadas e preparadas para administração aos animais. O número de células mononucleares administrado a cada animal foi de 1×10^7 no grupo que recebeu células mononucleares de medula óssea. No grupo que recebeu o lisado, este foi obtido de 1×10^7 células por animal. Para o grupo que recebeu células aderentes e não-aderentes essas células foram obtidas do processamento de cerca de 1×10^7 células por animal, tendo recebido 1×10^7 de células não-aderentes ou 8×10^5 de células aderentes cada animal. Todos os tratamentos foram administrados em um volume final de 100 µL por animal com solução fisiológica estéril via plexo retro-orbital com animais anestesiados por isoflurano inalatório dissolvido em oxigênio na concentração 1:2.

3.5 COLETA DE MATERIAL PARA ELISA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para realização do ensaio imunoenzimático, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e imediatamente tiveram coletadas secções de 1 centímetro do nervo isquiático *ipsilateral* ao sítio da lesão e da medula espinal na porção correspondente aos nervos lombares L3, L4 e L5, tomando como base a crista ilíaca e as demais referências anatômicas conforme descrito por Rigaud *et al.* (2008). O material foi retirado, pesado e refrigerado juntamente com tampão para extração de citocinas, considerando-se a proporção de 160 mg de medula espinal/

mL de tampão e 40 mg de nervo/ mL de tampão. O material foi acondicionado em criotubos plásticos a -70°C para posterior utilização.

Para utilização na técnica de imunofluorescência, depois da retirada de secções do nervo isquiático conforme protocolo descrito acima o material foi emblocado em resina O.C.T. e armazenados a -70°C .

3.6 ELISA (*ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram quantificadas 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 3X com PBS 0,05% Tween® 20 em seguida foram adicionados 100 μL da solução de PBS-BSA 1% e deixadas por 2 horas à 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 12 horas à 4°C . Após a lavagem das placas, foi adicionado o anticorpo anti-citocina biotilado e as placas foram incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após as lavagens, foram adicionados 50 μL /poço de estreptoavidina diluída 1:200 por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagens, 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 feito 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, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 450nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices).

3.7 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Segmentos do nervo isquiático criopreservados em *tissue-tek* O.C.T. foram submetidos a cortes transversais de 30 μm utilizando criostato LEICA LM-1800 (Alemanha). As secções foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos e

lavadas duas vezes com PBS. Em seguida foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas (*Protein Block Serum-free*) por 10 minutos e aplicaram-se os seguintes anticorpos primários: *rabbit* anti-GFAP (1:100) e *chicken* anti-GFP (1:400) diluídos em PBS/BSA 1%. Os anticorpos foram incubados *overnight* a 4°C. Posteriormente as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween® 20 a 0,05% e mais duas vezes com PBS. Em seguida foram aplicados os anticorpos secundários: anti-*rabbit* conjugado com Alexa Fluor 568 e anti-*chicken* conjugado com Alexa Fluor 488 todos diluídos a 1:200 em PBS e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Após incubação as lâminas foram lavadas como descrito acima e montadas com Vectashield contendo 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) para que fosse corado o DNA nuclear. Para amostras do nervo isquiático utilizou-se a marcação para GFAP com o objetivo de identificar a expressão de células de Schwann não-mielinizantes. Nos animais tratados com células mononucleares provenientes de doadores EGFP buscou-se identificar a presença dessas células nos materiais. As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio confocal FluoView 1000 (Olympus, Tokyo, Japão).

3.8 DROGAS, MEIOS, DILUENTES E REAGENTES

Durante a cirurgia foi utilizado Pentabiótico Reforçado FortDodge (Overland Park, Kansas, USA) diluído em solução fisiológica e 2,2,2 Tribromoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 2,5% diluído em água destilada como agente anestésico.

Durante a obtenção das células mononucleares da medula óssea foi utilizado Histopaque® de densidade 1077 e 1119 e Azul de Trypan (*Trypan blue solution*) a 0,4%, da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O sulfato de gentamicina (Garamicina®) foi da Mantecorp (São Paulo, Brasil) e utilizado na dose de 50 µg/ml de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO®) da Invitrogen (Califórnia, USA), podendo este ter ou não o soro fetal bovino da Cultilab (São Paulo, Brasil).

A gabapentina foi obtida através de cápsulas do medicamento Neurontin (Pfizer®, NY, USA), diluído em solução fisiológica. A solução fisiológica utilizada neste e em outros procedimentos tratou-se de solução salina com NaCl a 0,9%.

Em outros procedimentos utilizou-se também tampão fosfato salina (PBS, *phosphate buffered saline*), paraformaldeído (PFA, *paraformaldehyde*) e pastilhas de TMB (tetrametilbenzidina) todos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tween 20, um detergente não-iônico, foi da USB Corporation (*United States Biochemical*, Ohio, EUA). Nos ensaios de imunofluorescência o *tissue-tek* O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature*) foi da Sakura (Finetek, Europe) e o bloqueio foi feito com *Protein Block Serum-free* (Dako, Denmark). Anticorpos primários *rabbit* anti-GFAP (Neomarkers, Fremont, CA, USA) e *chicken* anti-GFP (Aves Labs, Tigard, Oregon, USA) e secundários anti-*rabbit* conjugado com Alexa Fluor 568 e anti-*chicken* conjugado com Alexa Fluor 488 da Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA), além do Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) contendo 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) também foram utilizados.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para escolha do tamanho da amostra os dados foram calculados através do teste denominado *2-Sample t-Test*, considerando-se: $\alpha=0,05$, desvio padrão=2, poder=0,8, obtendo-se um $n=9$ animais por grupo (MICROLABS, Henk van Wilgenburg, Amsterdã). Nos experimentos comportamentais os resultados foram representados como média \pm EPM de 9 animais por grupo e expressos como força em miliNewton. Os grupos experimentais foram comparados pelo teste não paramétrico de Friedman com pós-teste de Dunn's. Para os ensaios de ELISA os resultados foram expressos como média \pm EPM e analisadas por *one-way* ANOVA com pós-teste *Student Newman Kells* (GraphPad Prism 4.0, Califórnia, EUA). Os níveis de significância foram de $p<0,05$; $p<0,01$ e $p<0,001$.

3.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.10.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais avaliados neste trabalho foram assim designados:

→ Sham: refere-se ao grupo de animais submetidos à anestesia, incisão da pele, manipulação da musculatura, síntese e todos os procedimentos aos quais foram submetidos os animais dos outros grupos – exceto o naive – à parte a

interferência no nervo isquiático. O objetivo deste grupo foi avaliar em qual medida as respostas obtidas nos testes realizados foram em decorrência do procedimento cirúrgico *per si*.

→ Naive: os animais desse grupo não sofreram nenhum tipo de manipulação no que concerne à submissão à cirurgia, anestesia ou manipulação do nervo isquiático ou região adjacente. A participação desse grupo nos testes objetivou avaliar a resposta do animal não-estimulado, em situação de homeostase.

→ Veículo: grupo dos animais submetidos à cirurgia para ligadura do nervo isquiático e que receberam no momento do tratamento apenas o veículo – solução fisiológica – em um volume de 100 µl via plexo retro-orbital. O veículo foi administrado no terceiro dia após a cirurgia, conforme ocorreu nos outros animais do grupo tratado, sob indução anestésica com isoflurano inalatório. Como grupo controle do grupo gabapentina foi conduzido um experimento com o grupo veículo p.o., ou seja, aquele que recebeu o veículo por via oral nos mesmos momentos em que ocorreu o tratamento com a gabapentina.

→ Tratado: podendo referir-se a quatro grupos distintos – aqueles que receberam a fração enriquecida com células mononucleares de medula óssea (CMMO); aqueles que receberam o lisado da fração enriquecida com células mononucleares de medula óssea (lisado); os que receberam a fração enriquecida com células mononucleares aderentes da medula óssea (aderente) e por fim aquele grupo que recebeu a fração enriquecida com células mononucleares não-aderentes da medula óssea (não-aderente). O grupo CMMO, lisado e aderente receberam 1×10^7 células (ou o lisado) em um volume de 100 µl via plexo retro-orbital por animal. O grupo não-aderente recebeu 8×10^5 células em um volume de 100 µl via plexo retro-orbital por animal. Todos foram tratados no terceiro dia após cirurgia para indução do modelo.

→ Gabapentina: animais submetidos à cirurgia para ligadura do nervo isquiático e que receberam 100 mg/kg de gabapentina a cada 12 horas diluídos em um volume final de 150 µl de solução fisiológica por animal via oral (*gavage*). O tratamento iniciou-se no terceiro dia após a cirurgia para ligadura do nervo isquiático e durou sete dias, totalizando 14 doses do tratamento por animal. Esse grupo representou um controle positivo para comparar a eficácia de uma das terapias farmacológicas vigentes para o controle da dor neuropática em humanos.

→ KO IL-10: animais *knock out* para a citocina IL-10 que foram operados e tratados da mesma forma que os animais do grupo tratado CMMO, ou seja, com 1×10^7 células mononucleares de medula óssea por animal.

Todos os grupos foram compostos por 9 (nove) animais cada. Os animais utilizados nos experimentos foram mantidos no biotério em caixas apropriadas contendo 4 a 5 animais cada, e receberam marcações periódicas e exclusivas na cauda com canetas hidrográficas. A escolha do tratamento foi feita de forma randômica contemplando-se nove animais por grupo e o código relacionando número, caixa do animal e tratamento recebido só foi conhecido no momento do tratamento e ao fim do período experimental. Assim, em uma mesma caixa poderia haver animais com diferentes tratamentos e durante a realização do teste nociceptivo sabia-se apenas o número do animal e a caixa à qual o mesmo pertencia, porém não o tratamento ao qual o mesmo estava submetido.

3.10.2 Avaliação do limiar nociceptivo mecânico

A avaliação do limiar nociceptivo mecânico foi realizada conforme esquema demonstrado na Figura 7, iniciando um dia antes da realização da cirurgia (*baseline*), seguindo diariamente até o 5º dia, no dia 7 e daí em diante a cada quatro dias até o 55º dia após cirurgia. Esses intervalos foram escolhidos em função do perfil de hipernocicepção determinado pelo experimento de padronização do modelo (Figura 11).

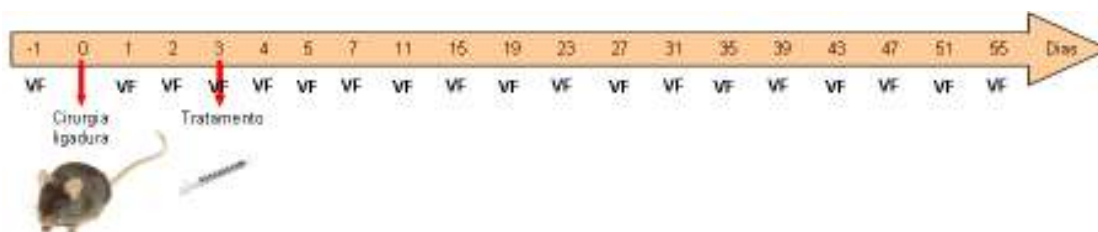


Figura 7: Delineamento experimental da avaliação do limiar nociceptivo mecânico com filamentos de von Frey (VF) pelo método *up-and-down* (Chaplan *et al.*, 1994) após padronização. Cirurgia de ligadura do nervo isquiático pelo método adaptado de Seltzer *et al.*, (1990) no dia 0 (zero) e tratamento no dia 3 (três) após cirurgia para indução do modelo de acordo com o grupo experimental.

O grupo gabapentina e veículo p.o. tiveram o limiar nociceptivo avaliado 30 minutos antes e duas horas após o primeiro tratamento de cada dia. A gabapentina (100 mg/kg) foi administrada por via oral durante sete dias consecutivos a partir do terceiro dia após cirurgia para indução do modelo, conforme Figura 8:

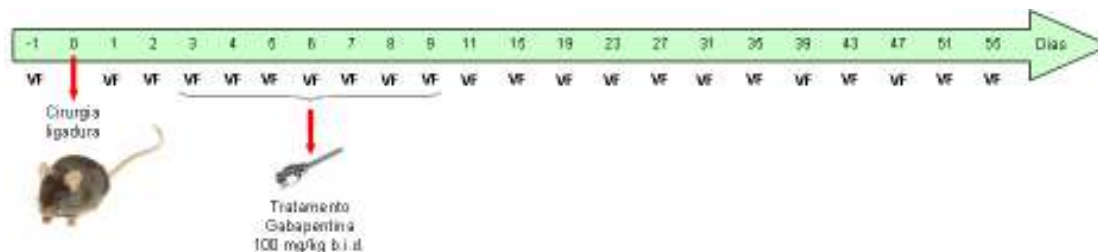


Figura 8: Delineamento experimental da avaliação do limiar nociceptivo mecânico com filamentos de von Frey (VF) para o grupo experimental que recebeu gabapentina 100 mg/kg, b.i.d. p.o. ou veículo p.o., iniciando no dia 3 (três) após cirurgia para indução do modelo e durando até o dia 9 (nove). A avaliação do limiar foi realizada duas vezes ao dia durante os sete dias de tratamento, sendo a primeira avaliação 30 minutos antes do recebimento da primeira dose do dia e a segunda duas horas após o tratamento.

3.10.3 Sequência e objetivos experimentais

O perfil de desenvolvimento de hipernocicepção mecânica após a cirurgia para indução do modelo foi estabelecido inicialmente no que se denominou padronização do modelo. Nesse experimento o limiar nociceptivo mecânico de animais dos grupos naive, sham e operado foram comparados entre si. A avaliação foi tomada em ambas as patas em dias alternados com o objetivo de se estabelecer o perfil nociceptivo do modelo adotado. A partir daí, todas as avaliações foram realizadas conforme figura 7.

O próximo experimento teve o objetivo de avaliar a eficácia da terapia celular e compará-la, em termos de eficácia e duração de efeito, com a terapia farmacológica vigente. Os grupos comparados foram: tratado CMMO, veículo e gabapentina. Foram avaliadas ambas as patas.

Após isso, os níveis de citocinas foram avaliados na medula espinal e nervo isquiático em dois momentos distintos: no dia 3 (D3) - antes do tratamento, e no dia 30 (D30) - após o tratamento e durante o platô analgésico. Cada amostra foi formada por quatro animais e cada grupo possuiu quatro amostras, totalizando 16 animais por grupo, conforme esquema da Figura 9. Foram avaliados três grupos no tempo D3 (sham, naive, veículo) e quatro grupos no tempo D30 (sham, naive, veículo,

tratado CMMO), ou seja, sete grupos, totalizando o uso de 112 animais para todo o ensaio.

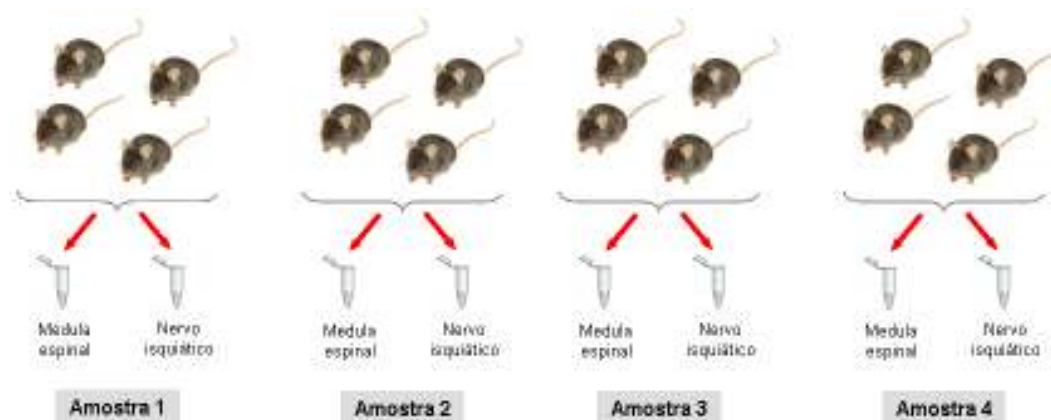


Figura 9: Esquema demonstrando a utilização de dezesseis animais por grupo e por tempo analisado no ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado para avaliação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α .

Uma nova bateria de testes foi realizada, desta vez avaliando e comparando os efeitos de diferentes populações de células extraídas a partir das CMMO. Os grupos foram veículo, tratado CMMO, tratado lisado, tratado aderente e tratado não-aderente. Com o objetivo de avaliar os mecanismos envolvidos nos efeitos terapêuticos das CMMO na dor neuropática experimental, seu efeito em animais *knock out* para IL-10 foi avaliado. Os grupos experimentais incluíram animais selvagens tratados com CMMO e animais KO IL-10 tratados com CMMO, além dos animais selvagens que receberam apenas o veículo.

Ao fim desses experimentos, a expressão de células de Schwann, bem como a identificação de células dos animais doadores de medula óssea, foram avaliadas em secções do nervo isquiático de animais naive, veículo e tratado CMMO através da técnica de imunofluorescência. Para essa avaliação, o material foi coletado após eutanásia dos animais no dia 10 (D10) após a cirurgia para indução do modelo – ou seja, sete dias após o tratamento. Foram coletados materiais de 4 (quatro) animais dos grupos naive, veículo e CMMO, totalizando 12 animais.



Figura 10: Esquema demonstrando a coleta individual de material utilizado no ensaio de imunofluorescência para avaliação da expressão de células de Schwann positivas para GFAP.

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

O perfil do comportamento nociceptivo no modelo de dor neuropática utilizado foi determinado com o teste de filamentos de von Frey, conforme descrito em “Material e Métodos”. Foram conduzidos experimentos com três grupos de 9 (nove) animais cada: sham, naive e operado. O grupo operado não recebeu nenhum tratamento. O objetivo deste experimento foi mapear o comportamento nociceptivo, identificando seu início, término e duração, além da interferência que o procedimento cirúrgico *per si* exercia sobre a nocicepção. Para a análise desta interferência e do efeito da ligadura parcial do nervo isquiático no limiar nociceptivo, os grupos foram comparados entre si. Além disso, objetivou-se também com esse experimento avaliar se o animal tinha seu limiar alterado de forma significativa ao longo do tempo por variáveis externas ao experimento. Para tal fim, os resultados obtidos do grupo naive antes da cirurgia e ao fim do experimento foram comparados entre si. O limiar nociceptivo foi avaliado na pata *ipsilateral* (Figura 11A) e na pata contralateral (Figura 11B) à ligadura parcial do nervo isquiático.

Os resultados do grupo operado permitem observar que o limiar nociceptivo é consideravelmente reduzido já no primeiro dia após a cirurgia, caracterizando o desenvolvimento de alodinia mecânica. A redução do limiar permanece significativa até o dia 45, mas a partir do dia 35 começa a se aproximar progressivamente do limiar dos grupos sham e naive (Figura 11A). Durante o período citado, a significância estatística dos resultados obtidos foi de $P < 0,05$ para os dias 1, 3, 11, 13, 15, 21, 27, 45; $P < 0,01$ para os dias 2, 5, 7, 23, 25, 29, 31, 33, 35, 39, 43 e de $P < 0,001$ para os dias 4, 9, 17, 19. Os animais do grupo sham não tiveram alteração estatisticamente significativa quando comparados ao grupo naive, indicando que a redução do limiar nociceptivo se deve apenas à indução do modelo por ligadura parcial do nervo isquiático, e não à intervenção cirúrgica *per si*.

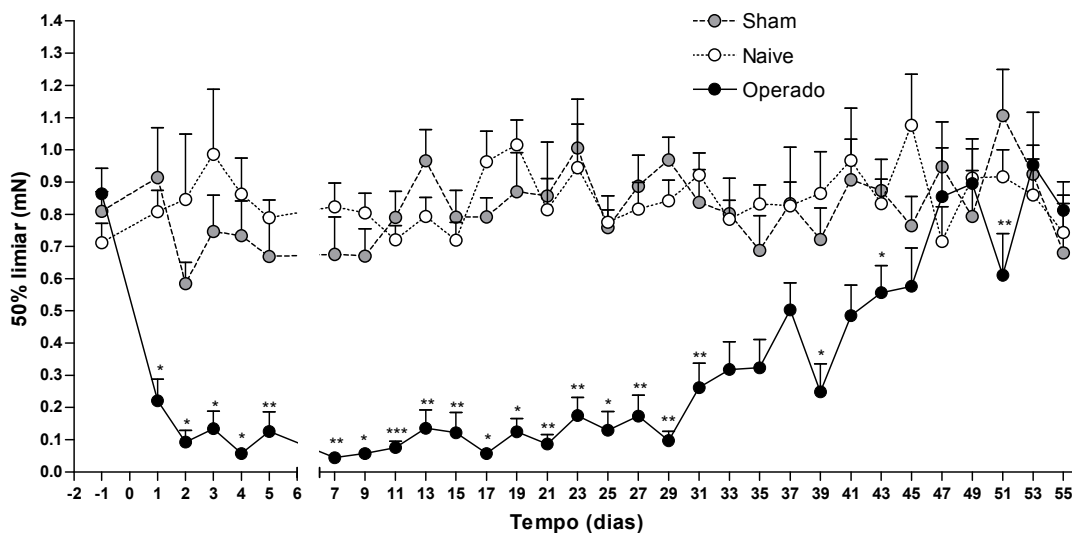
As avaliações de limiar nociceptivo ao longo do tempo devem considerar a possibilidade da resposta ser alterada em função de variáveis alheias ao experimento, tais como ganho de peso do animal, reduzindo a relação entre força aplicada e peso corpóreo. Além disso, era importante verificar se havia habituação ao procedimento, tornando os animais não-responsivos ou respondendo

aleatoriamente. Para investigar a influências dessas variáveis foi comparada a resposta do grupo naive antes da cirurgia (dia -1) e ao fim do experimento (dia 55) e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

A manutenção do comportamento nociceptivo por mais de um mês permitiu a adoção do protocolo de avaliação em intervalo de tempo maior – a cada quatro dias. Para escolha do momento adequado para a realização do tratamento, estabeleceu-se a necessidade de acompanhar o limiar diariamente nos primeiros cinco dias, o que permitiu identificar os animais que apresentaram limiar reduzido por três dias consecutivos. No terceiro dia, todos os animais submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático apresentaram redução do limiar em todas as avaliações anteriores, não tendo sido descartado nenhum animal por não ter atendido a esse critério. Assim, julgou-se que a partir do dia 3 estava instalada a alodinia mecânica nesses animais, havendo uma manutenção por um mês, período satisfatório para avaliação da persistência e efetividade do efeito dos tratamentos propostos. Os limiares referentes ao dia 3 foram avaliados sempre antes dos tratamentos serem realizados. O experimento foi interrompido dez dias após não haver mais diferença entre os grupos avaliados e este período foi adotado para todos os experimentos seguintes.

Quando avaliada a pata contralateral ao nervo submetido à ligadura (Figura 11B), observou-se redução do limiar em comparação com o grupo naive nos tempos 1 ($P < 0,01$), 3, 5 ($P < 0,05$), 31 ($P < 0,01$), 37 e 39 ($P < 0,05$). Essa ocorrência indica a presença da sensibilização central, que é frequentemente observada nos pacientes, indicando a boa equivalência clínica do modelo de dor neuropática utilizado.

A



B

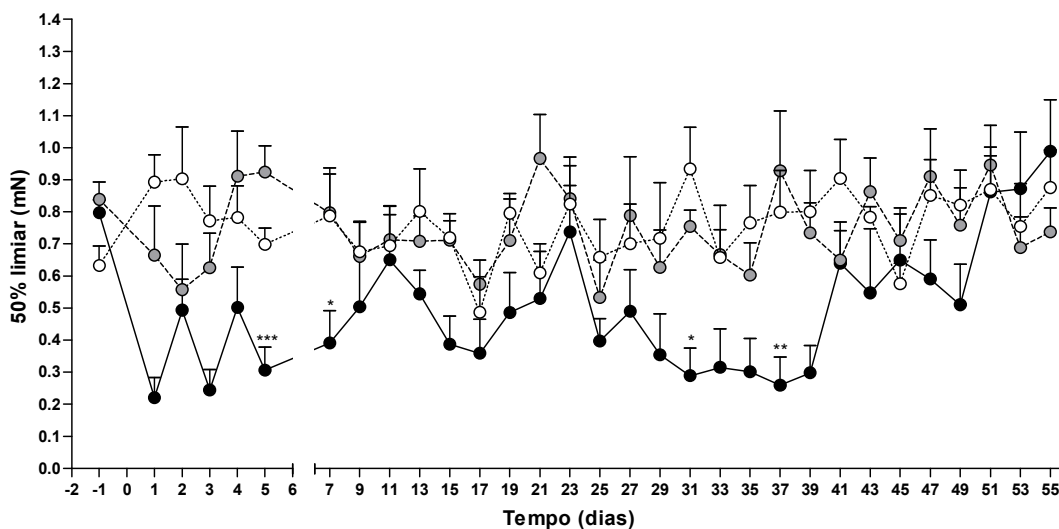


Figura 11: Avaliação do limiar nociceptivo mecânico em animais submetidos à cirurgia para ligadura parcial do nervo isquiático (operado), animais falso operados (sham) e animais naive. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo o dia -1 aquele anterior à cirurgia e o dia 0 (zero) o dia em que ocorreu a cirurgia. O eixo das ordenadas representa 50% do limiar nociceptivo em miliNewton (mN), ou seja, a força do filamento em mN no qual o animal responde em 50% das apresentações. A avaliação do limiar foi feita antes da cirurgia, diariamente até o dia 5 e daí em diante em dias alternados até recuperação e estabilização do limiar nos níveis basais. A) avaliação na pata *ipsilateral*, indicando início e duração do comportamento nociceptivo nos animais do grupo operado. B) avaliação na pata *contralateral*, indicando redução do limiar nociceptivo nos animais do grupo operado. Valores representados como a média de 9 (nove) animais por grupo \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo sham; comparados pelo teste de Friedman seguido de Dunn.

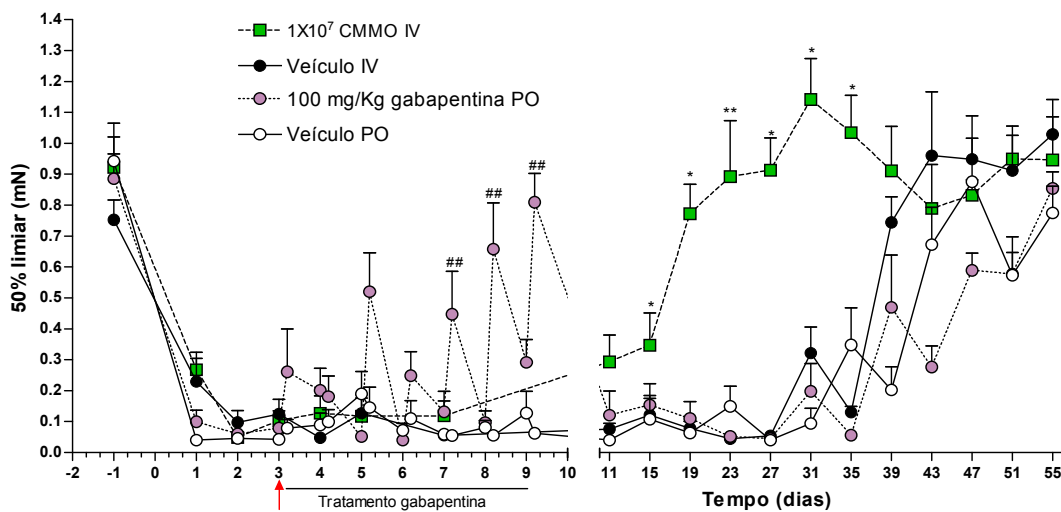
4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA SOBRE A ALODINIA MECÂNICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA

Com o objetivo de avaliar e comparar a magnitude e duração do efeito do tratamento com células mononucleares de medula óssea com o tratamento farmacológico na alodinia mecânica, os grupos tratado CMMO e gabapentina foram comparados ao grupo veículo i.v. e p.o., respectivamente (Figura 12).

A administração i.v. de 1×10^7 células mononucleares de medula óssea mostrou-se eficaz na reversão da alodinia mecânica *ipsilateral* em modelo experimental de dor neuropática. Os animais tratados apresentaram aumento do limiar nociceptivo quando comparados ao grupo veículo a partir do dia 15 permanecendo até o dia 35, não havendo recidiva, uma vez que após esse período, o modelo experimental iniciou sua reversão. Para os dias 15, 19, 27 e 31 $P < 0,05$ e no dia 23 $P < 0,01$. A análise dos resultados permite observar que o tratamento inicia seus efeitos após 12 dias, restabelecendo o limiar nociceptivo de forma permanente, ou pelo menos durante todo o período em que há redução do limiar nociceptivo no modelo experimental utilizado. Na pata contralateral a alodinia não foi tão acentuada, não tendo sido observadas diferenças significativas entre nenhum dos tratamentos.

Com relação aos resultados obtidos após tratamento contínuo por sete dias com a gabapentina, observou-se efeito antinociceptivo quando avaliada a pata *ipsilateral* apenas em 3 dias durante o tratamento. Essa recuperação do limiar foi observada apenas duas horas após o tratamento nos dias 7, 8 e 9 após a cirurgia (ou 4, 5 e 6 após o início do tratamento), não tendo sido sustentada por mais de 12 horas, quando se administrou nova dose. Quando avaliada a pata contralateral, o efeito da gabapentina só foi observado no último dia de tratamento, 2 horas após a administração do fármaco.

A



B

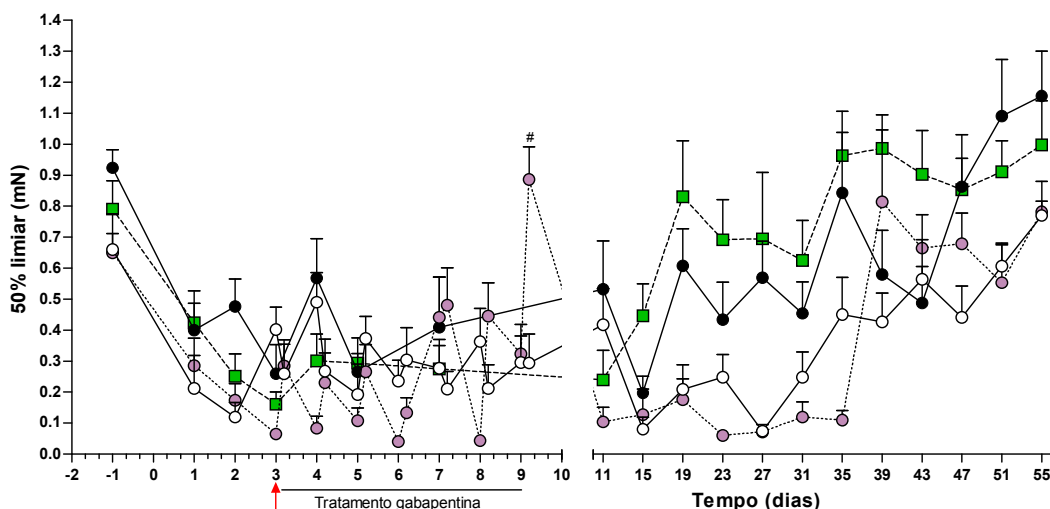


Figura 12: Avaliação do limiar nociceptivo mecânico em animais submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático e tratados com veículo, células mononucleares de medula óssea (CMMO) e gabapentina. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo o dia -1 aquele anterior à cirurgia e o dia 0 (zero) o dia em que ocorreu a cirurgia para a ligadura parcial do nervo isquiático. O eixo das ordenadas representa 50% do limiar nociceptivo em miliNewton (mN), ou seja, a força do filamento em mN no qual o animal responde em 50% das apresentações. O tratamento com CMMO foi realizado uma única vez no dia 3. O tratamento com gabapentina (100 mg/Kg p.o.) iniciou-se no dia 3 e durou até o dia 9 (sete dias), tendo sido realizado duas vezes ao dia. Para este grupo e seu controle as avaliações do limiar foram feitas 30 minutos antes e duas horas após o primeiro tratamento do dia. A) avaliação na pata *ipsilateral*, indicando reversão da alodinia mecânica nos animais tratados com CMMO a partir do dia 15, efeito que se manteve significativo por cerca de duas semanas. O tratamento com gabapentina induziu antinocicepção apenas durante o período do tratamento. B) avaliação do limiar nociceptivo na pata contralateral, indicando a sensibilização nociceptiva contralateral e ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto pelo grupo gabapentina que apresentou reversão da alodinia mecânica no dia 9, 2 horas após o tratamento. Valores apresentados como a média de 9 (nove) animais por grupo \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado com o grupo veículo IV e # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ comparado com o grupo veículo PO, analisados pelo teste de Friedman seguido de Dunn.

4.3 EXPRESSÃO DE CITOCINAS

Considerando que citocinas pró-inflamatórias, notadamente IL-1 β e TNF- α , estão intimamente relacionadas com a fisiopatologia da dor neuropática, foram avaliadas a expressão dessas citocinas no tecido lesionado, o nervo isquiático, e na primeira conexão que a fibra nociceptiva realiza com o SNC, a medula espinal. Além disso, buscando identificar possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo das CMMO, foi investigada também a expressão da citocina IL-10, pelo seu reconhecido papel anti-inflamatório e a citocina IL-6, com papel dual e sugerida participação na regeneração de nervos periféricos. A expressão das citocinas mencionadas foi avaliada em dois tempos distintos: no dia 3, antes da realização do tratamento e no qual os animais já estavam com alodinia mecânica instalada, e no dia 30, 27 dias após o tratamento e durante o platô de antinocicepção.

4.3.1 Expressão de citocinas no nervo isquiático

Secções do nervo isquiático de animais naive, sham, veículo e tratado CMMO (quando a avaliação foi realizada no dia 30) foram coletadas e os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram avaliados por ELISA. Os resultados obtidos estão representados na Figura 13. Tanto IL-1 β ($P < 0,001$) quanto TNF- α ($P < 0,01$) mostraram-se aumentadas no nervo isquiático 3 dias após a cirurgia de indução do modelo, corroborando dados da literatura que sugerem sua participação na instalação da dor neuropática. O procedimento cirúrgico em si não causou elevação nos níveis dessas citocinas (grupo sham). A expressão de TNF- α continuou aumentada no dia 30 após a cirurgia ($P < 0,01$), sendo significativamente menor no grupo tratado com CMMO em relação ao grupo veículo ($P < 0,05$), demonstrando que seus níveis sofreram modulação pela terapia celular. Com relação a IL-10, no dia 3 após a cirurgia seus níveis foram discretos e não diferiram entre os grupos. Por outro lado, 30 dias após a cirurgia essa citocina teve sua expressão notadamente aumentada no grupo tratado com CMMO quando comparada aos demais grupos ($P < 0,001$). Quanto à citocina IL-6, sua expressão esteve aumentada em animais neuropáticos nos dias 3 e 30 após a cirurgia ($P < 0,001$), mas não houve diferença significativa entre os grupos tratado e veículo.

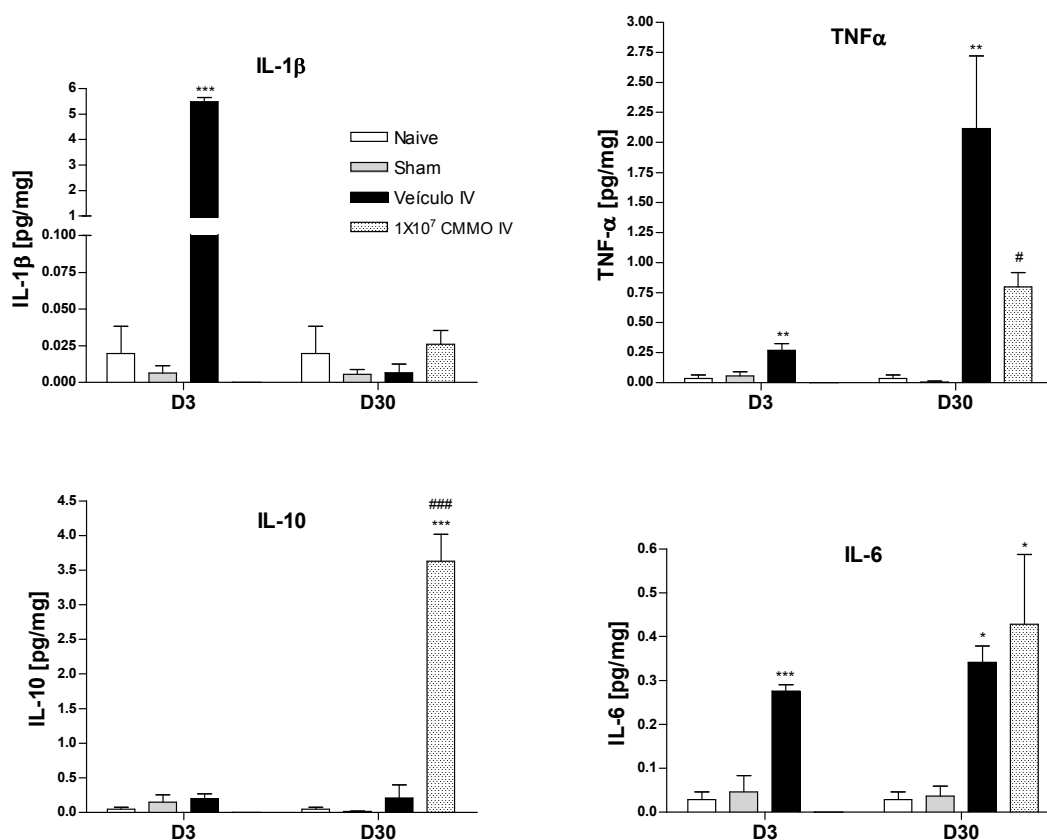


Figura 13: Avaliação da expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α no nervo isquiático em D3 (antes da administração de CMMO ou veículo) e D30 (após a administração de CMMO ou veículo). As quantificações foram feitas por ELISA, para tecidos extraídos de animais dos grupos naive, sham, veículo i.v. e 1X10⁷ CMMO i.v.. Valores apresentados como a média de 4 (quatro) amostras por grupo \pm EPM, sendo cada amostra composta por 4 (quatro) animais cada. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 em relação ao grupo sham. #P<0,05; ##P<0,01; ###P<0,001 em relação ao grupo veículo.

4.3.2 Expressão de citocinas na medula espinal

Para investigar se as alterações identificadas na periferia se refletiam no SNC, foi avaliada a expressão das mesmas citocinas em secções da medula espinal correspondente aos nervos lombares que irão compor o nervo isquiático: L3, L4 e L5. (Rigaud *et al.*, 2008). Os resultados obtidos estão descritos na Figura 14. As citocinas IL-1 β e TNF- α tiveram sua expressão aumentada na medula espinal dos animais veículo tanto no dia 3 após a cirurgia (P<0,001) quanto no dia 30 (P<0,01), quando comparados ao grupo sham. O tratamento com CMMO não reduziu a expressão de IL-1 β na medula espinal. Já com relação ao TNF- α , 30 dias após a indução do modelo, sua expressão foi reduzida no grupo tratado com CMMO em

comparação com o grupo veículo ($P < 0,001$). Em contrapartida, a expressão de IL-10 na medula espinal foi expressa de forma robusta apenas no grupo tratado com CMMO, 30 dias após a indução do modelo ($P < 0,001$). A citocina IL-6, apesar de uma tendência de aumento nos animais neuropáticos 30 dias após a indução, não apresentou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos e tempos avaliados.

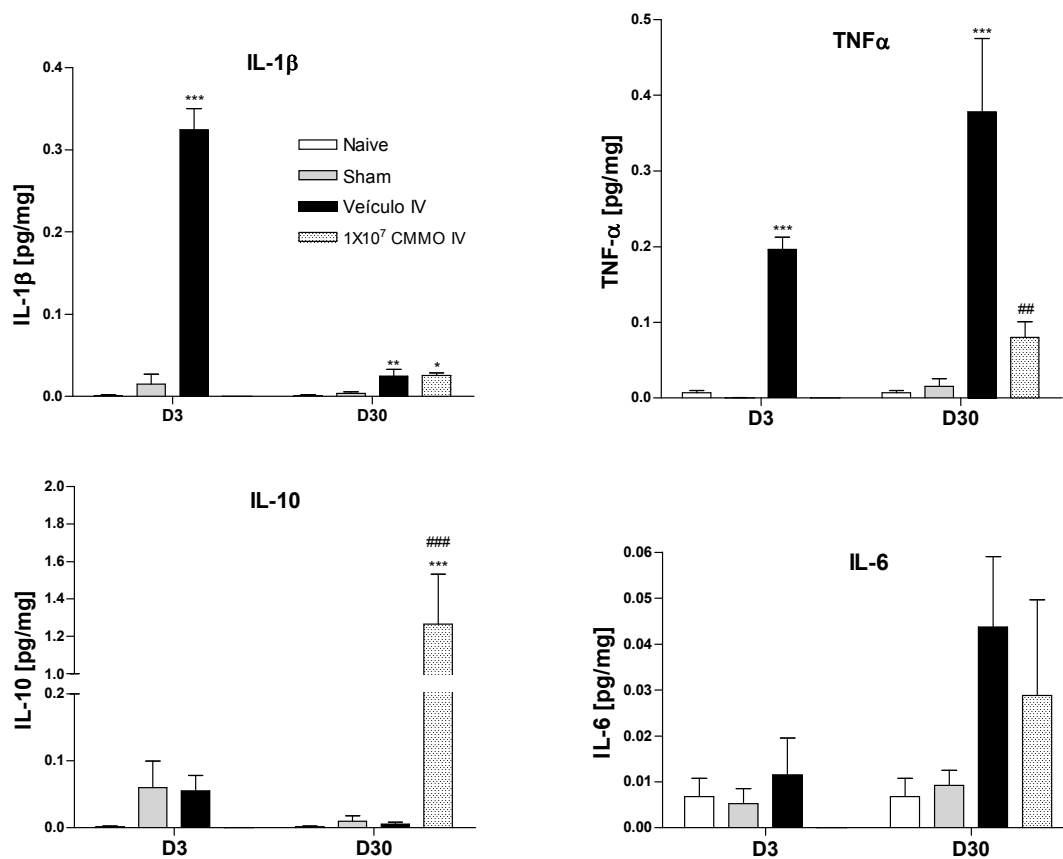


Figura 14: Avaliação da expressão das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α em secção da medula espinal correspondente aos nervos lombares L3, L4 e L5 nos dias 3 (D3, antes da administração de CMMO ou veículo) e 30 (D30, após a administração de CMMO ou veículo) após cirurgia para indução do modelo de dor neuropática. As quantificações foram feitas por ELISA, para tecidos extraídos de animais dos grupos naive, sham, veículo i.v. e 1X10⁷ CMMO i.v.. Valores apresentados como a média de 4 (quatro) amostras por grupo ± EPM, sendo cada amostra composta por 4 (quatro) animais cada. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ em relação ao grupo sham. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ em relação ao grupo veículo.

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA ESTRATIFICADAS SOBRE A ALODINIA MECÂNICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA

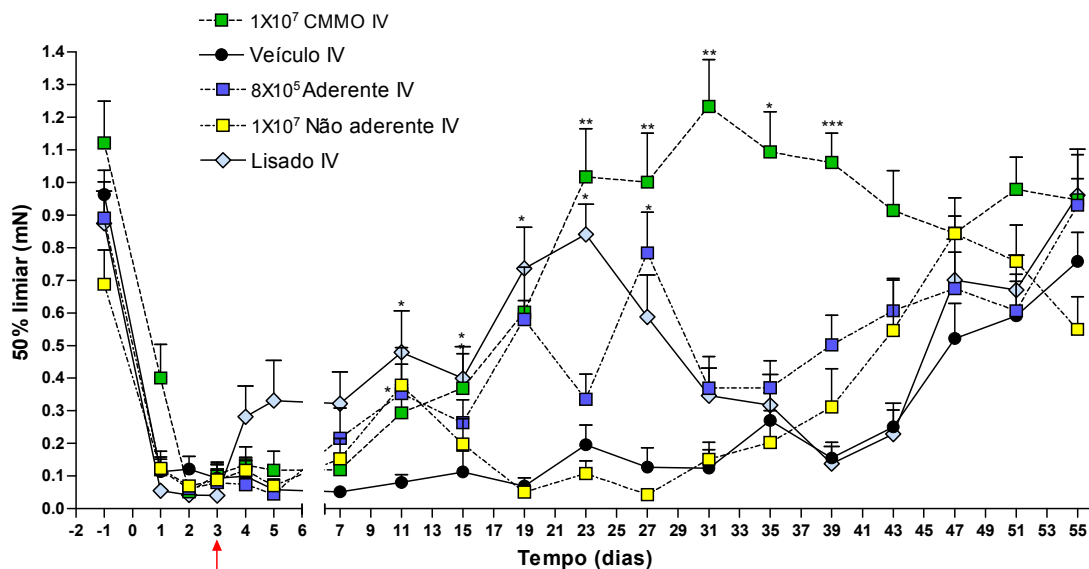
Com o objetivo de melhor compreender o resultado obtido com a administração de células mononucleares de medula óssea, essas células foram estratificadas para observação e avaliação dos prováveis tipos celulares responsáveis pelo efeito terapêutico observado. Foi avaliado se apenas a célula viável era capaz de produzir os efeitos terapêuticos ou se os fatores solúveis por elas liberados – como as citocinas que já haviam sido apontadas no ensaio de ELISA – seriam capazes de produzir os mesmos efeitos. Para tal, foram lisadas 1×10^7 células mononucleares de medula óssea por animal através de choque térmico, conforme descrito em “Material e Métodos”, e após centrifugação, foi administrado o sobrenadante ao grupo lisado. Reconhecendo que os principais tipos celulares presentes na fração enriquecida com células mononucleares de medula óssea após submissão à centrifugação e gradiente Histopaque® 1117 e 1119 são células hematopoiéticas em sua maioria e uma pequena percentagem de células mesenquimais, foi utilizada uma propriedade que as diferencia para separá-las, a aderência aos polímeros. Entendendo que essa característica por si só não é capaz de identificar as células, esse recurso foi utilizado como uma forma simples e sugestiva de investigação. Nesse estudo, foi avaliado se as populações de células aderentes e não-aderentes exerciam os mesmos efeitos sobre o limiar nociceptivo, e se há efeito aditivo ou sinérgico entre elas.

Os resultados, demonstrados na Figura 15A, indicam que o tratamento para o grupo lisado apresentou efeito antinociceptivo na pata *ipsilateral* mais precoce em relação aos demais grupos, que foi estatisticamente significativo a partir do dia 11, e permaneceu apenas até o dia 23 ($P < 0,05$). Por outro lado, o efeito antinociceptivo observado com o tratamento do grupo CMMO, tratado com a fração enriquecida com células mononucleares de medula óssea, foi mais tardio (dia 15, $P < 0,05$) e mais duradouro, permanecendo significativo até o dia 43 ($P < 0,05$), quando então o modelo iniciou sua reversão. É possível observar ainda que o grupo não-aderente não produziu antinocicepção, enquanto o grupo tratado com células aderentes produziu efeito antinociceptivo significativo a partir do dia 11, mas com menor duração em relação ao grupo CMMO (até o dia 27, $P < 0,05$). Com relação à pata

contralateral, os grupos aderente e não-aderente não foram avaliados (Figura 15B). Dos grupos avaliados observou-se efeito antinociceptivo no grupo CMMO nos dias 31 e 39 ($P<0,01$) e no dia 35 ($P<0,05$), enquanto no grupo lisado apenas no dia 7 ($P<0,05$).

A demonstração do efeito antinociceptivo do tratamento recebido pelo grupo lisado, assim como a observação da precocidade desse efeito, aliado aos resultados obtidos com a dosagem de citocinas sugerem que parte do efeito antinociceptivo do grupo CMMO pode ser atribuído à presença de fatores solúveis estocados nas células. Assim, o fato da antinocicepção observada no grupo lisado ser menos duradoura quando comparada à do grupo CMMO, permite inferir que a célula viável no organismo do animal, na presença de estímulo, é capaz de continuar produzindo e secretando fatores que contribuem para a recuperação funcional e/ou têm atividade antiálgica.

A



B

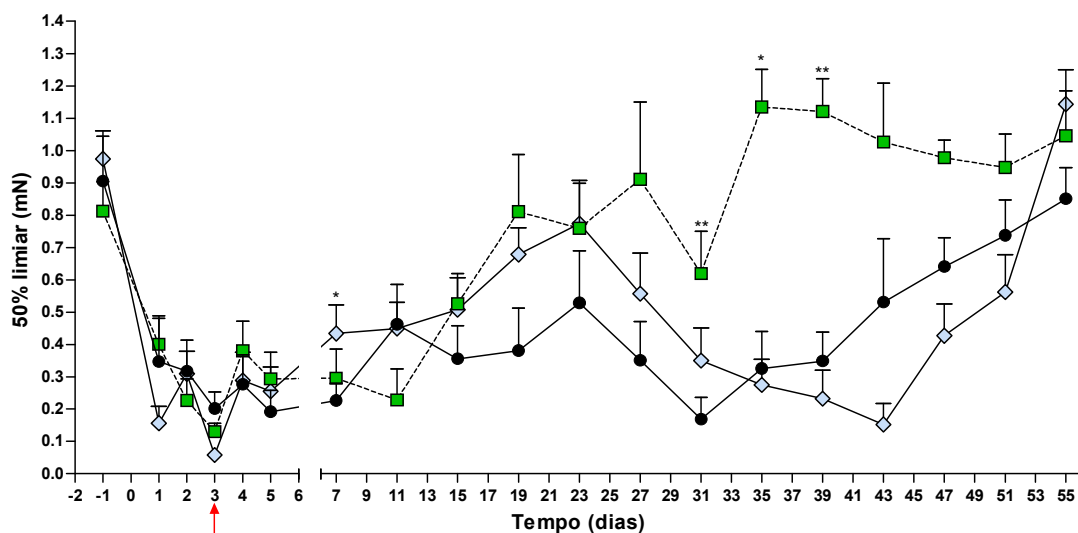


Figura 15: Avaliação do limiar nociceptivo mecânico em animais submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático e tratados com veículo, células mononucleares de medula óssea (CMMO), lisado, células aderentes e células não-aderentes. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo o dia -1 aquele anterior à cirurgia e o dia 0 (zero) o dia em que ocorreu a cirurgia para a ligadura parcial do nervo isquiático. O eixo das ordenadas representa 50% do limiar nociceptivo em miliNewton (mN). Todos os tratamentos foram realizados i.v. uma única vez no dia 3. A) avaliação do limiar nociceptivo na pata *ipsilateral*, indicando efeito antinociceptivo significativo para os grupos CMMO, aderente e lisado. O tratamento com células não-aderentes não se mostrou eficaz em nenhum dos momentos avaliados. B) avaliação do limiar nociceptivo na pata *contralateral*, indicando a sensibilização nociceptiva contralateral e o efeito antinociceptivo discreto nos grupos CMMO e lisado. Valores apresentados como a média de 9 (nove) animais por grupo \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado com o grupo veículo, analisado pelo teste de Friedman seguido de Dunn.

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO DE ANIMAIS *KNOCK OUT* PARA A CITOCINA IL-10 COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA SOBRE A ALODINIA MECÂNICA

Em função do aumento da expressão da citocina IL-10 em amostras de tecido periférico e medula espinal de animais tratados com CMMO, foi avaliado se em animais *knock out* para IL-10 (KO IL-10) essas células seriam capazes de produzir efeito antinociceptivo similar ao observado em animais selvagens (*wild type*). Similarmente aos experimentos anteriores, animais KO IL-10 ou selvagens receberam administração i.v. de 1×10^7 células mononucleares de medula óssea ou veículo 3 dias após a indução do modelo. O limiar nociceptivo foi avaliado, nas patas *ipsi* e contralateral, e estão expressos na Figura 16. A comparação dos efeitos do tratamento com CMMO entre animais selvagens e KO IL-10 revelou que enquanto o animal selvagem apresentou efeito antinociceptivo *ipsilateral* evidente e duradouro a partir do dia 15 ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$), o tratamento não apresentou efeito antinociceptivo nos animais *knock out* para IL-10. Esse dado aponta para o papel central desta citocina nos mecanismos antinociceptivos do tratamento com células mononucleares de medula óssea.

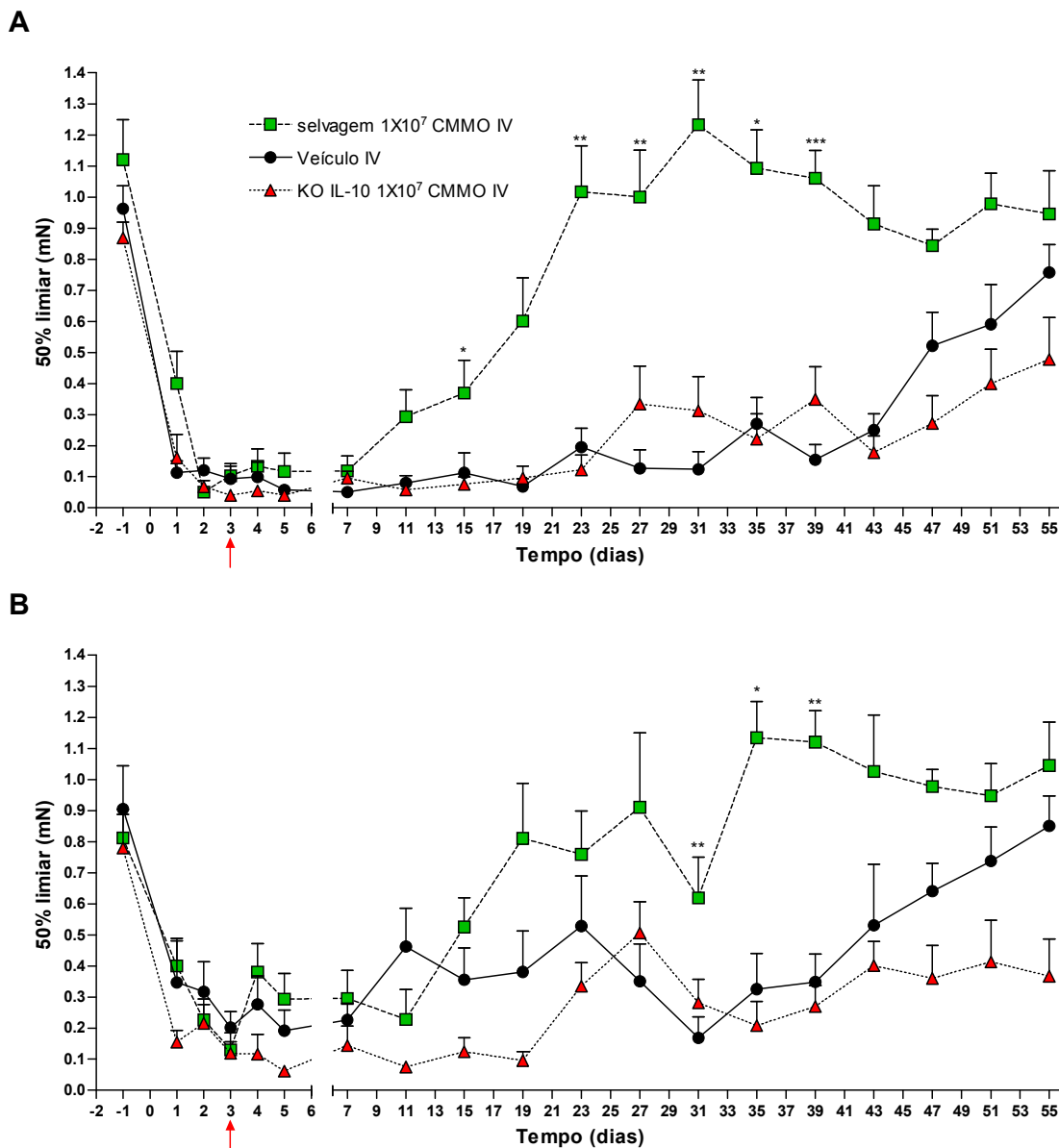


Figura 16: Avaliação do limiar nociceptivo mecânico em animais *knockout* IL-10 $-/-$ (KO IL-10) ou selvagens submetidos à ligadura parcial do nervo isquiático e tratados com células mononucleares de medula óssea (CMMO 1×10^7) ou animais selvagens que receberam o veículo. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo o dia -1 aquele anterior à cirurgia e o dia 0 (zero) o dia em que ocorreu a cirurgia para a ligadura parcial do nervo isquiático. O eixo das ordenadas representa 50% do limiar nociceptivo em miliNewton (mN). Os tratamentos foram realizados uma única vez no dia 3 após a indução do modelo. A) limiar nociceptivo da pata *ipsilateral*, demonstrando que o tratamento com CMMO produz efeito antinociceptivo nos animais selvagens, mas não nos KO IL-10. B) limiar nociceptivo da pata *contralateral* indicando discreto efeito antinociceptivo do tratamento com CMMO nos animais selvagens. Valores apresentados como a média de 9 (nove) animais por grupo \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado com o grupo veículo i.v., analisado pelo teste de Friedman seguido de Dunn.

4.6 EXPRESSÃO DE CÉLULAS DE SCHWANN NO NERVO ISQUIÁTICO

Com o objetivo de relacionar as alterações moleculares às celulares ocorridas no nervo isquiático dos animais, foi avaliado por imunofluorescência o padrão de células de Schwann, evidenciado pela marcação com GFAP. Os grupos analisados foram: naïve, veículo e tratado. Nos animais tratados, foi avaliada também a presença de células EGFP, provenientes dos animais doadores de medula óssea. As avaliações foram realizadas com animais eutanasiados no dia 10 (7 dias após o tratamento). A Figura 17 mostra resultados de um animal, representativos de cada grupo experimental.

As imagens do ensaio de imunofluorescência indicam que nos animais naïve (A) a marcação para GFAP é praticamente nula no endoneuro. Em animais neuropáticos (B), há aumento da expressão das células GFAP positivas no espaço endoneural. No animal tratado (C) há menor expressão dessa proteína quando comparado ao grupo veículo, sugerindo uma redução ou impedimento da proliferação das células de Schwann. Em quatro animais tratados avaliados não foi detectada a presença de células EGFP positivas.

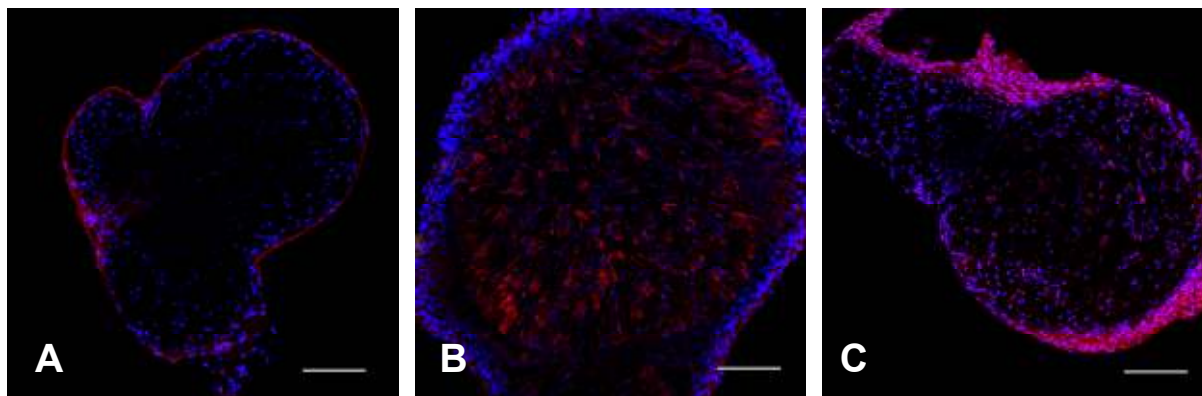


Figura 17: Imagem de microscopia ótica com marcação para núcleos com DAPI (azul) e para células de Schwann com GFAP (vermelho). A) animal naïve; B) animal veículo com aumento da marcação próximo às fibras nervosas; C) animal tratado apresentando menor expressão para marcadores de células de Schwann ao redor das fibras nervosas. Barra: 100 μ m.

5 DISCUSSÃO

A adoção do pós-tratamento, após instalação da alodinia mecânica, bem como a avaliação de parâmetros bioquímicos tornaram consistentes os resultados obtidos neste trabalho, qualificando a terapia celular como uma alternativa de grande potencial para o tratamento da dor neuropática.

Uma única administração sistêmica de células mononucleares de medula óssea mostrou-se eficiente na normalização do limiar nociceptivo dos animais com ligadura parcial do nervo isquiático. O efeito desse tratamento foi robusto e duradouro, permanecendo até o fim do período experimental. Por outro lado, a administração diária de gabapentina, um dos fármacos mais empregados na clínica médica para o controle de dor neuropática, induziu efeito antinociceptivo variável durante o tratamento, que não durou mais que 12 horas. Esses dados indicam que embora o tratamento com células mononucleares só tenha apresentado efeito após 12 dias, esse foi duradouro e robusto, e ocorreu após uma única administração. Uma vez que a eficácia do tratamento foi inicialmente avaliada a partir do perfil de alodinia mecânica nos animais e sua quantificação depende de uma resposta comportamental motora, a integridade da função motora é fundamental para evitar viés na análise dos dados. A possibilidade de *déficits* motores induzidos pelo tratamento foi afastada com base no estudo de Siniscalco *et al.* (2010). Esses autores demonstraram que em animais neuropáticos, no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático, a administração sistêmica de CMMO não afeta a *performance* motora no aparelho de rota-rod. Dessa forma, o presente trabalho conclui-se que a redução do comportamento nociceptivo observada após a administração de CMMO de fato decorreu de uma ação antinociceptiva.

Os resultados obtidos nesse trabalho são similares aos encontrados por Klass *et al.* (2007) que observaram redução da alodinia mecânica em animais tratados com 1×10^7 células mononucleares de medula óssea. No entanto, os autores realizaram o tratamento no momento da cirurgia, impossibilitando verificar se o resultado observado deveu-se ao efeito do tratamento ou falha na indução do modelo. Além disso, a terapia celular pode ter funcionado apenas como agente anti-inflamatório, impedindo a instalação da dor neuropática. Esse trabalho também se propôs a avaliar alteração de celularidade em secções de nervo isquiático de animais tratado e veículo, não tendo encontrado alterações entre ou diferentes

grupos. No mesmo ano, Musolino *et al.* (2007) publicaram trabalho similar desta vez administrando células mesenquimais de medula óssea por via intraganglionar também durante a cirurgia para indução do modelo. Além disso, administraram células mononucleares não-aderentes de medula óssea após três dias de cultivo. Realizando avaliação da alodinia mecânica e hiperalgesia térmica ao frio, encontraram que apenas o pré-tratamento com as células mesenquimais foi capaz de restabelecer os limiares nociceptivos. Esse grupo não publicou outros parâmetros para avaliação da efetividade da terapia adotada.

Além da neuropatia comportamental, no presente trabalho foram avaliados os efeitos da terapia celular sobre a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , tanto no sítio da lesão – nervo isquiático – quanto na medula espinal. As citocinas IL-1 β e TNF- α têm sido amplamente associadas com a fisiopatologia da dor neuropática (WATKINS *et al.*, 2001a). De fato, foi observado que ambas citocinas têm expressão aumentada, tanto no nervo quanto na medula espinal, de animais neuropáticos. Esses dados estão de acordo com dados da literatura e reforçam o papel dessas duas citocinas na instalação da dor neuropática (CUI *et al.*, 2000; OKAMOTO *et al.*, 2001; MILLIGAN *et al.*, 2003; SCHAFERS, *et al.*, 2003; THACKER *et al.*, 2007). É importante salientar que o aumento da expressão de IL-1 β , tanto na medula quanto no nervo, ocorreu apenas em D3, ou seja, três dias após a cirurgia. Por outro lado, TNF- α teve sua expressão aumentada nos tecidos em D3, e de modo ainda mais proeminente em D30. Esses dados podem indicar que IL-1 β participa dos eventos iniciais de indução da neuropatia, enquanto TNF- α participar tanto da indução quanto da manutenção da neuropatia. Esses resultados são similares aos obtidos por Okamoto *et al.* (2001), que avaliou a expressão dessas citocinas nos dias 3, 7, 15 e 45 em modelo de dor neuropática e encontrou o pico de expressão de IL-1 β no dia 7 e o do TNF- α uma semana após quando avaliado o sítio da lesão. Com relação à citocina IL-6, foi encontrada elevação da sua expressão apenas no nervo, onde poderia ter papel pró-inflamatório, contribuindo para a fase inicial de indução da neuropatia. Essa idéia está em consonância com o descrito por Hanisch (2002), que considera a IL-6 uma citocina pró-inflamatória cujo perfil de expressão é determinado pela presença de outros fatores, como por exemplo de IL-1 β .

Quando avaliado o efeito do tratamento com CMMO sobre a expressão de citocinas, observou-se que animais tratados apresentaram redução significativa da expressão de TNF- α tanto no nervo, quanto na medula espinal. Essa citocina é uma

das primeiras a serem produzidas após lesão periférica e dá início à produção de diversos mediadores nociceptivos. Conforme descrito na literatura, também está diretamente envolvida no desenvolvimento da hiperalgesia e alodinia em modelos de dor neuropática (CUI *et al.*, 2000; THACKER *et al.*, 2007). Esses resultados demonstrando a redução de TNF- α mediada pela terapia celular condiz com o descrito na literatura através da observação de ensaios de imunomodulação *in vitro* com inibição da produção de TNF- α mediada pelas células-tronco (AGGARWAL e PITTENGER, 2005; YOO *et al.*, 2009). Em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho e os dados da literatura permitem sugerir que a modulação da produção de TNF- α por CMMO contribui para seu potente efeito antinociceptivo na neuropatia experimental.

Por outro lado, foi observado que o tratamento com CMMO não modificou o padrão de expressão de IL-1 β e IL-6 no nervo e medula espinal. Em contraste, Siniscalco *et al.* (2010) demonstraram que células mesenquimais de medula óssea administradas via intracerebroventricular reduzem a alodinia mecânica e os níveis de RNAm para IL-1 β no córtex cerebral. Essa diferença pode ser em função do tipo de célula utilizado ou, mais provavelmente, do tecido onde a expressão do RNAm para a citocina foi quantificada.

Em estados de dor neuropática, uma importante fonte produtora de citocinas são as células da glia. Entre elas, as células de Schwann tem papel proeminente. Em íntimo contato com neurônios sensoriais, após lesão no nervo iniciam a fagocitose com remoção de restos celulares e síntese de TNF- α e interleucinas, dentre outros. Além disso, essas células possuem importante papel na indução dos estados de dor tanto no sítio de lesão quanto distal a este, ampliando a informação nociceptiva na fibra sensorial (WAGNER e MYERS, 1996; CHENG e ZOCHODNE, 2002; INOUE, 2006; THACKER *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2010). No presente trabalho foi observado que no nervo isquiático de animais neuropáticos houve um aumento da expressão das células de Schwann ao redor das fibras nervosas, evidenciado pelo aumento no número de células GFAP positivas. Esse padrão está de acordo com os eventos fisiopatológicos da neuropatia, que incluem infiltração macrófagica, hipertrofia e proliferação das células de Schwann com produção de citocinas e fagocitose no local da lesão (WAGNER *et al.* 1998; WATKINS e MAIER, 2002; WALSH e MIDHA 2009). Conforme descrito na literatura, após lesão no nervo as células de Schwann iniciam a síntese de potentes moléculas biológicas que

contribuem para a alodinia e hiperalgesia associadas à dor neuropática (WAGNER e MYERS, 1996; CHENG e ZOCHODNE, 2002; INOUE, 2006; THACKER *et al.*, 2007). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, após lesão no nervo as células de Schwann proliferam no endoneuro, onde, possivelmente, sintetizam mediadores como o TNF- α . Dessa forma, a maior expressão de células de Schwann pode estar associada ao aumento dos níveis de TNF- α e à redução do limiar nociceptivo, que se manifesta como alodinia mecânica. Em contraste, o tratamento com CMMO foi capaz de prevenir o aumento ou reduzir a expressão de células de Schwann no espaço endoneural, assim como de reduzir a expressão de TNF- α no nervo e na medula espinal.

Siniscalco *et al.* (2010) sugeriram recentemente que, na neuropatia experimental, as células-tronco atuam promovendo a regeneração das interações entre o tecido neural e a glia via citocinas, o que limita as reações inflamatórias bem como a proliferação microglial. Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, demonstrando aumento nos níveis de IL-10 em animais tratados com células mononucleares, e dos relatos da literatura sugerindo importante papel de IL-10 nos efeitos da terapia celular (NEMETH *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010), foi investigada a contribuição de IL-10 para o efeito antinociceptivo observado no modelo de dor neuropática adotado nesse trabalho através de animais geneticamente modificados, incapazes de produzir a citocina IL-10 (*knock out* IL-10). Apesar da bem documentada ativação de mecanismos de compensação em animais *knock out*, no presente trabalho foi demonstrado que nesses animais o tratamento com células mononucleares não foi efetivo em reduzir a alodinia comportamental associada à neuropatia. Esses dados, em associação aos resultados de ELISA, que evidenciaram a alta expressão de IL-10 no nervo e medula espinal dos animais durante o platô do efeito antinociceptivo, permitem propor que essa citocina tem papel central nos mecanismos antinociceptivos ativados pela terapia celular. Siniscalco *et al.* (2010) propuseram que, durante a neuropatia, as células-tronco sejam capazes de permitir a normalização parcial da atividade neural do córtex pré-frontal. Com isso em vista, pesquisaram os níveis de RNAm das citocinas IL-1 β e IL-10 no tecido encefálico e não encontraram alterações nos níveis de IL-10 dos animais tratados. Esses dados diferem em parte com o encontrado nesse trabalho, de que a modulação da produção de IL-10 pela terapia celular é importante para os efeitos terapêuticos observados na neuropatia experimental. Entretanto, embora a

dor seja de fato percebida no córtex cerebral, a origem desta mensagem, assim como a maioria dos mecanismos de amplificação e manutenção da dor neuropática associada à lesão de nervos periféricos, está concentrada na periferia e na medula espinal. Dessa forma, é possível que expressão de IL-10 nestes tecidos tenha impacto mais relevante sobre a neuropatia comportamental. Em adição, e em linha com os resultados obtidos nesse trabalho, outros trabalhos estabelecem uma relação entre os efeitos da terapia celular e IL-10 (NEMETH *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010). Segundo MOCELLIN *et al.* (2004), IL-10 induz aumento de TGF- β e, além de exercer efeito supressor no cenário pró-inflamatório, é capaz de estimular a regeneração axonal (WALSH e MIDHA, 2009). Segundo Wagner *et al.* (1998), na dor neuropática IL-10 contribui para a redução da hiperalgesia, recrutamento de macrófagos e expressão de TNF- α no endoneuro. Segundo Hanisch (2002), IL-10 exerce ação neuroprotetora, interagindo com a glia e provocando uma redução dos níveis de IL-1 β e TNF- α e/ou atenuando seus efeitos. Por outro lado, os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo aqui descrito são provavelmente multifatoriais, ou seja, abrangem uma cascata de eventos envolvendo diversas moléculas de sinalização bem como expressão de receptores e comunicação integrada de células. Novos estudos, visando maior compreensão desses eventos, necessitam ainda ser realizados.

O fato de ter sido demonstrado que as células mononucleares de medula óssea produzem efeitos terapêuticos consistentes, mesmo sem a detecção de células do doador de medula óssea, reforça a hipótese da ação parácrina em detrimento das hipóteses de transdiferenciação ou fusão. De fato, a importância de fatores solúveis para os efeitos terapêuticos das células mononucleares foi também reforçada quando avaliados os efeitos de células mononucleares de medula óssea lisadas sobre a alodinia mecânica. Após tratamento com o lisado das células obteve-se efeito antinociceptivo mais precoce e de menor duração quando comparado àquele obtido com as mesmas células íntegras. Esses resultados apontam para a atuação de fatores solúveis prontamente disponibilizados no citoplasma. Isso não equivale a dizer que apenas e exclusivamente os fatores solúveis produzidos pelas células-tronco da fração mononuclear são responsáveis pelos efeitos, mas que há uma participação importante e expressiva deles na cascata de eventos relacionados à antinocicepção produzida.

Com o objetivo de compreender melhor qual tipo celular dentre as células mononucleares está mais intimamente associado ao efeito terapêutico, foi avaliado o efeito de células mononucleares de medula óssea estratificadas sobre a alodinia mecânica. Os principais tipos celulares com potencial capacidade de autorrenovação e autorregeneração presentes na medula óssea são as células-tronco mesenquimais e as hematopoiéticas. Para que fosse possível separar essas populações, foi utilizada uma das principais características funcionais que as distingue: a capacidade de aderir a polímeros, fortemente expressa nas células-tronco mesenquimais (CHOPP e LI, 2002; GROVE *et al.*, 2004; CORONEL *et al.*, 2006; SYKOVÁ *et al.*, 2006; MUSOLINO *et al.*, 2007). Segundo Freshney (1987), diferentes tipos celulares têm diferentes afinidades para o substrato da cultura e irão aderir em diferentes taxas, sendo as células-tronco hematopoiéticas as de menor capacidade de adesão. Ele exemplifica que se uma suspensão de células primárias for semeada em uma garrafa e transferida para outra a cada 30 minutos, a mais adesiva das células será encontrada na primeira garrafa e a menos adesiva na última. No exemplo citado, macrófagos tenderão a permanecer na primeira, fibroblastos na segunda e então células epiteliais e finalmente células-tronco hematopoiéticas na última das garrafas semeadas. Diante desta afirmação, células-tronco hematopoiéticas têm baixa capacidade adesiva, enquanto que os macrófagos revelam grande capacidade adesiva. Um fator que corrobora para a validade do experimento proposto, sugerindo a separação das células pela característica adotada, foi o percentual encontrado de cada uma: do total de células obtidas após 2 horas de cultivo apenas 7% era aderente. A literatura refere que as células hematopoiéticas representam cerca de 0,05% de todas as células da medula óssea (SPANGRUDE *et al.*, 1988), enquanto que as mesenquimais representam 0,001 a 0,01% dessa população (CASTRO-MALASPINA *et al.*, 1980; PITTENGER *et al.*, 1999; JONES *et al.*, 2002). Assim, o valor médio de células-tronco mesenquimais presentes na medula óssea conforme descrito na literatura representa cerca 10% das hematopoiéticas.

A partir desses estudos de estratificação, foi observado que as células aderentes (supostamente mesenquimais) produziram efeito antinociceptivo, enquanto as células não aderentes (supostamente hematopoiéticas) por si só não o fizeram. Apesar disso as células não aderentes parecem contribuir para o efeito terapêutico, uma vez que o efeito da fração total, onde estão presentes células

aderentes e não aderentes, foi mais eficaz e duradouro, sugerindo que ambas atuam em sinergia na fração total. Isso corrobora com a hipótese de que o efeito terapêutico decorra de fatores parácrinos, onde as duas populações atuariam de formas distintas e integrativas. Um dos aspectos relacionados ao envolvimento das células-tronco hematopoiéticas na eficácia da terapia celular é a sua alta capacidade de circulação e “facilidade” de entrega aos diversos órgãos (LAGASSE *et al.*, 2001). Na verdade, a ideia de que células-tronco hematopoiéticas adultas funcionam unicamente para manter a linhagem de células hematopoiéticas já tem sido descartada, podendo ser vista sua contribuição mesmo que em baixos níveis para múltiplos tecidos não-hematopoiéticos (MORRISON, 2001; WAGERS e WEISSMAN, 2004). De fato, os primeiros estudos com células-tronco de medula óssea foram realizados com a fração total, mas logo se buscou investigar qual tipo celular era responsável pelo efeito terapêutico, tendo as células-tronco mesenquimais levado a maior parte deste mérito nos últimos tempos (PROCKOP, 1997; MINGUELL e ERICES, 2006; PARR *et al.*, 2007; YOO *et al.*, 2009; SINISCALCO *et al.*, 2010). Por outro lado, os dados deste trabalho são apenas sugestivos, uma vez que a adoção de um método preciso para identificação das populações celulares utilizadas é fundamental para evitar erros por conta de inferências equivocadas. Essa preocupação tem sido amplamente discutida no meio científico e fica bem expressa no título desse trabalho: “*Mesenchymal stem cell preparations: comparing apples and oranges*” (Preparações para obtenção de células-tronco mesenquimais: comparando maçãs com laranjas) (WAGNER e HO, 2007).

Os resultados obtidos com o presente trabalho indicam o potencial antinociceptivo da terapia celular em estados de dor neuropática e lançam forte evidência para o envolvimento de mediadores solúveis, principalmente IL-10, nesses efeitos. Embora IL-10 pareça ter papel chave, acredita-se que assim como a dor neuropática é multifatorial, as células-tronco representam uma terapêutica potencialmente eficiente por também agirem de forma sistêmica e integrada com todo o sistema imune. Durante a atuação da terapia celular, outras substâncias envolvidas na cascata de eventos da qual faz parte a IL-10 são importantes. Além disso, receptores expressos nos tecidos em circunstâncias específicas durante o desenvolvimento da doença são também importantes para a atuação das células-tronco. Justamente por causa desse fato, esse trabalho não encerra a questão da terapia celular na dor neuropática, mas ao contrário, amplia os horizontes em busca

do entendimento mais amplo do mecanismo de ação, identificando os fatores cruciais para a eficácia do tratamento, bem como a melhor forma de torná-lo um procedimento terapêutico acessível.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o presente trabalho permitem concluir que:

A terapia celular através da fração enriquecida com células mononucleares obtidas de medula óssea murina é eficaz na redução da alodinia mecânica na dor neuropática experimental.

A terapia celular é capaz de reduzir os níveis da citocina TNF- α envolvida com a instalação e manutenção da dor neuropática bem como ampliar os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 tanto na periferia quanto na medula espinal.

Animais *knock out* para IL-10 submetidos à terapia celular não apresentam melhora da alodinia mecânica.

O tratamento com as células mononucleares de medula óssea está relacionado à menor expressão das células de Schwann, produtoras de citocinas tais como o TNF- α e associadas com a instalação da dor neuropática.

O tratamento com o lisado de células mononucleares oferece resultado mais precoce, porém não tão duradouro quanto a terapia com as células mononucleares de medula óssea murina propriamente ditas, ou seja, íntegras e viáveis.

A fração de células mononucleares não-aderentes de medula óssea murina, na qual possivelmente estão presentes as células-tronco hematopoiéticas, não exerce efeito na dor neuropática experimental. Já a fração de células mononucleares aderentes de medula óssea, que deve conter células-tronco mesenquimais, apresenta efeito antiálgico no modelo experimental de dor neuropática, porém de menor intensidade e duração que a fração completa, demonstrando que há uma sinergia entre as populações permitindo maior eficácia do que o tratamento com apenas um tipo de células.

Nos materiais analisados não foi identificada a presença de células do doador, reforçando a hipótese de ação por mecanismos parácrinos em detrimento das hipóteses de ação por fusão ou transdiferenciação.

Assim, considerando-se o objetivo deste trabalho em avaliar a efetividade, persistência e possíveis mecanismos através do qual a terapia celular age na dor neuropática experimental, acredita-se que o mesmo cumpriu seus objetivos, lançando bases para futuras pesquisas nessa área. Acredita-se que após investigações a respeito dos mecanismos de ação e realização de ensaios clínicos conforme já vem ocorrendo para outras doenças, a terapia celular será capaz de

preencher a lacuna presente na terapêutica da dor neuropática e que representa tanto sofrimento e má-qualidade de vida para diversas pessoas portadoras da doença.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.

AGUILERA-MUÑOZ, J.; ARIZAGA-CUESTA, E.; CARPIO-RODAS, A. et al. Guidelines for the clinical management of neuropathic pain (II). *Revista de Neurologia*, v. 40, n. 5, p. 303-316, 2005.

ALDSKOGIUS, H.; KOZLOVA, E.N. Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury. *Progress in Neurobiology*, v. 55, n. 1, p. 1-26, 1998.

ALVAREZ-DOLADO, M.; PARDAL, R.; GARCIA-VERDUGO, J.M. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature**, v. 425, n. 6961, p. 968-973, 2003.

ALVAREZ-DOLADO, M. Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine, **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1-12, 2007.

BACKONJA, M.; BEYDOUN, A.; EDWARDS, K.R. et al. Gabapentin for the Symptomatic Treatment of Painful Neuropathy in Patients With Diabetes Mellitus: A Randomized Controlled Trial. **JAMA**, v. 280, n. 21, p. 1831-1836, 1998.

BENBOUZID, M.; PALLAGE, V.; RAJALU, M. et al. Sciatic nerve cuffing in mice: a model of sustained neuropathic pain. *European Journal of Pain*, v. 12, n. 5, p. 591-599, 2008.

BERNARDO, M.E.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W.E. Mesenchymal stromal. **Ann NY Acad Sci**, v. 1176, p. 101-117, 2009.

BLAU, H.M.; BRAZELTON, T.R.; WEIMANN, J.M. The Evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? **Cell**, v. 105, n. 7, p. 829-841, 2001.

BONICA, J.J. Definitions and taxonomy of pain. In: BONICA, J.J. **The management of pain**, v. 1, ed. 2, Philadelphia: Lea and Febiger, 1990.

BROCKES, J.P.; KUMAR, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 8, p. 566-574, 2002.

BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 278-294, 1997.

CASTRO-MALASPINA, H.; GAY, R.E.; RESNICK, G. et al Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. **Blood**, v. 56, n. 2, p. 289-301, 1980.

CELL IMAGING CORE, disponível em <<http://cic.btk.fi/>>. Acesso em 12/11/2009.

CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

CHENG, C.; ZOCHODNE, D.W. In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. **Neuroscience**, v. 115, n. 1, p. 321-329, 2002.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurology**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2002.

COLLINS, S.L.; MOORE, R.A.; MCQUAY, H.J.; WIFFEN, P. Antidepressants and anticonvulsants for diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: a quantitative systematic review. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 20, n. 6, p. 449-45, 2000.

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. **Neuroscience Letters**, v. 405, n. 1-2, p. 5-9, 2006.

- CUI, J.G.; HOLMIN, S.; MATHIESEN, T. *et al.* Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain**, v. 88, n. 3, p. 239-248, 2000.
- DEVOR, M. Pathophysiology of nerve injury. In: CERVERO, F.; JENSEN, T.S. Handbook of Clinical Neurology, **Pain**, v. 81, n. 3, cap. 19, 2006.
- DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 6, p. 190-197, 1994.
- DUBNER, R.; BENNETT, G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience**, v. 6, p. 381-418, 1983.
- DUBNER, R.; RUDA, M.A. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. **Trends in Neurosciences**, v. 15, n. 3, p. 96-103, 1992.
- DWORKIN, R.H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M.C. *et al.* Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.
- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of Pain**. ed. 3, New York: Churchill Livingstone, 1994.
- FIELDS, H.L.; ROWBOTHAM, M.C.; BARON, R. Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. **Neurobiology of Disease**, v. 5, n. 4, p. 209-227, 1998.
- FLATTERS, S.J.; FOX, A.J.; DICKENSON, A.H. Nerve injury alters the effects of interleukin-6 on nociceptive transmission in peripheral afferents. **European Journal of Pharmacology**, v. 484, n. 2-3, p. 183-191, 2004.
- FOX, A.; EASTWOOD, C.; GENTRY, C. *et al.* Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. **Pain**, v. 81, n. 3, p. 307-316, 1999.

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: A Manual of Basic Technique (Hardcover). In: _____. **Cloning and selection of specific cell types**. cap. 11, p. 151, ed. Wiley Liss, ed. 2, 1987.

FURLAN, A.D.; SANDOVAL, J.A.; MAILIS-GAGNON, A.; TUNKS, E. Opioids for chronic noncancer pain: a meta-analysis of effectiveness and side effects. **CMAJ**, v. 174, n. 11, p. 1589-1594, 2006.

FUSS, I.J.; BOIRIVANT, M.; LACY, B.; STROBER, W. The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 2, p. 900-908, 2002.

GADIENT, R.A.; OTTEN, U.H. Interleukin-6 (IL-6): a molecule with both beneficial and destructive potentials. **Progress in Neurobiology**, v. 52, n. 5, p. 379-90, 1997.

GOELET, P.; CASTELLUCCI, V.F.; SCHACHER, S.; KANDEL, E.R. The long and the short of long-term memory: a molecular framework. **Nature**, v. 322, n. 6078, p. 419-422, 1986.

GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 4, p. 487-500, 2004.

HANISCH, U.K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 140-155, 2002.

HANSSON, P. Neuropathic pain: clinical characteristics and diagnostic workup. **European Journal of Pain**, v. 6, suppl. A, p. 47-50, 2002.

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

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

HAYDON, P.G.; CARMIGNOTO, G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 1009-1031, 2006.

HAYTHORNTHWAITE, J.A.; BENRUD-LARSEN, L.M. Psychological aspects of neuropathic pain. **The Clinical Journal of Pain**, v. 16, n. 2, p. S101-S105, 2000.

HENRY, J.L. Concepts of pain sensation and its modulation. **The Journal of Rheumatology**, v. 19, p. 104-112, 1989.

HOFSTETTER, C. P.; SCHWARZ, E. J.; HESS, D. *et al.* Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n. 4, p. 2199-2204, 2002.

INOUE, K. The function of microglia through purinergic receptors: Neuropathic pain and cytokine release. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 1-2, p. 210-226, 2006.

INOUE, N.; ITO, S.; TAJIMA, K. *et al.* Etodolac Attenuates Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 109, n. 4, p. 600-605, 2009.

JENSEN, T. S.; GOTTRUP, H. SINDRUP, S. H.; BACH, F. W. The clinical picture of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1, p. 1-11, 2001.

JENSEN, T.S.; BACKONJA, M.M.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, S. *et al.* New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 3, n. 2, p. 108-119, 2006.

JESSEN, K.R.; MORGAN, L.; STEWART, H.J.; MIRSKY, R. Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. **Development**, v. 109, n. 1, p. 91-103, 1990.

JONES, E.A.; KINSEY, S.E.; ENGLISH, A. *et al.* Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. **Arthritis and Rheumatology**, v. 46, n. 12, p. 3349-3360, 2002.

- KIM, S.H; CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-63, 1992.
- KISO, T.; WATABIKI, T.; TSUKAMOTO, M. *et al.* Pharmacological characterization and gene expression profiling of an L5/L6 spinal nerve ligation model for neuropathic pain in mice. **Neuroscience**, v. 153, n. 2, p. 492-500, 2008.
- KLASS, M.; GAVRIKOV, V.; DRURY, D. *et al.* Intravenous mononuclear marrow cells reverse neuropathic pain from experimental mononeuropathy. **Anesthesia & Analgesia**, v. 104, n. 4, p. 944-948, 2007.
- KOPEN, G.C.; PROCKOP, D.J.; PHINNEY, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, n. 19, p. 10711-6, 1999.
- KROENKE, K.; KREBS, E.E.; BAIR, M.J. Pharmacotherapy of chronic pain: a synthesis of recommendations from systematic reviews. **General Hospital Psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 206-219, 2009.
- LAGASSE, E.; SHIZURU, J.A.; UCHIDA, N. *et al.* Toward Regenerative Medicine. **Immunity**, v. 14, n. 4, p. 425-436, 2001.
- LAWSON, L.J.; PERRY, V.H.; DRI, P.; GORDON, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151-170, 1990.
- LEDEBOER, A.; SLOANE, E.M.; MILLIGAN, E.D. *et al.* Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 115, n. 1-2, p. 71-83, 2005.
- LI, J.; ZHU, H.; LIU, Y. *et al.* Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in Macaca Fascicularis. **Brain Research**, epub ahead of print, 2010.

LIECHTY, K.W.; MACKENZIE, T.C.; SHAABAN, A.F. *et al.* Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. **Nature Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1282-1286, 2000.

LIU, N.; CHEN, R.; DU, H. *et al.* Expression of IL-10 and TNF-alpha in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells. **Cell Molecular Immunology**, v. 6, n. 3, p. 207-213, 2009.

LOREDO, G.A.; BENTON, H.P. ATP and UTP activate calcium-mobilizing P2U-like receptors and act synergistically with interleukin-1 to stimulate prostaglandin E2 release from human rheumatoid synovial cells. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 2, p. 246-255, 1998.

MAIZELS, M.; MCCARBERG, B. Antidepressants and Antiepileptic Drugs for Chronic Non-Cancer Pain. **American Family Physician**, v. 71, n. 3, 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. 1-2, p. 215-222, 1998.

MARAIS, E.; KLUGBAUER, N.; HOFMANN, F. Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 1243-1248, 2001.

MARTIN, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MCQUAY, H.J.; TRAMER, M.; NYE, B.A. *et al.* A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. **Pain**, v. 68, n. 2-3, p. 217-227, 1996.

MEDVINSKY, A.; SMITH, A. Fusion brings down barriers. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 823-825, 2003.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms prepared by the International Association for the Study of Pain. 2 ed, Seattle: **IASP Press**, 1994.

MILLIGAN, E.D.; TWINING, C.; CHACUR, M. *et al.* Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 1026-1040, 2003.

MINGUELL, J.J.; ERICES, A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 1, p. 39-49, 2006.

MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F.; ROSSI, C.R. *et al.* The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 1, p.61-76, 2004.

MORIOKA, N.; INOUE, A.; HANADA, T. *et al.* Nitric oxide synergistically potentiates interleukin-1 beta-induced increase of cyclooxygenase-2 mRNA levels, resulting in the facilitation of substance P release from primary afferent neurons: involvement of cGMP-independent mechanisms. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 5, p. 868-876, 2002.

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

MUSOLINO, P. L.; CORONEL, M. F.; HÖKFELT, T.; VILLAR, M. J. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. **Neuroscience Letters**, v. 418, n. 1, p. 97-101, 2007.

NAKAJIMA, K.; KOHSAKA, S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. **Journal of Biochemistry**, v. 130, n. 2, p. 169-175, 2001.

NAKANISHI, C.; YAMAGISHI, M.; YAMAHARA, K. *et al.* Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, n. 1, p. 11-16, 2008.

NEMETH, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P.S.T. *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature Medicine**, v. 15, n. 1, p. 42-49, 2009.

NEUROPATHIC PAIN FACT SHEET, disponível em
<http://www.neuropathicpainnetwork.org/english/members/pdf/Neuropathic_Pain_Fact_Sheet.pdf>. Acesso em 13/08/2008.

OKAMOTO, K.; MARTIN, D.P.; SCHMELZER, J.D. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Experimental Neurology**, v. 169, n. 2, p. 386-391, 2001.

ORSTAVIK, K.; WEIDNER, C.; SCHMIDT, R. *et al.* Pathological C-fibres in patients with a chronic painful condition. **Brain**, v. 126, n. 3, p. 567-578, 2003.

PALMA, C.; MINGHETTI, L.; ATOLW, M. *et al.* Functional characterization of substance P receptors on cultured human spinal cord astrocytes: synergism of substance P with cytokines in inducing interleukin-6 and prostaglandin E2 production. **Glia**, v. 21, n. 2, p. 183-193, 1997.

PARR, A.M.; TATOR, C.H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. **Bone Marrow Transplantation**, v. 40, n. 7, p. 609-619, 2007.

PASTI, L.; ZONATA, M.; POZZAN, T. *et al.* Cytosolic calcium oscillations in astrocytes may regulate exocytotic release of glutamate. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 477-484, 2001.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Communication between astrocytes and neurons: a complex language. **Journal of Physiology, Paris**, v. 96, n. 3-4, p. 199-207, 2002.

PERRY, V.H.; HUME, D.A.; GORDON, S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. **Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 313-326, 1985.

PETERS, C.M.; JIMENEZ-ANDRADE, J.M.; KUSKOWSKI, M.A. *et al.* An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. **Brain Research**, v. 1168, p. 46-59, 2007.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal. **Stem cells**, 143-147, 1999.

PROCKOP, D.J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

RAFF, M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 19, p. 1-22, 2003.

RIGAUD, M.; GEMES, G.; BARABAS, M.E. *et al.* Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: implications for studies of neuropathic pain. **Pain**, v. 136, n. 1-2, p. 188-201, 2008.

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

SÁ, K.N.; BAPTISTA, A.F.; MATOS, M.A.; LESSA, I. Chronic pain and gender in Salvador population, Brazil. **Pain**, v. 139, n. 3, p. 498-506, 2008.

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

SANCHEZ-RAMOS, J.; SONG, S.; CARDOZO-PELAEZ, F. *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Experimental Neurology**, v. 164, n. 2, p. 247-56, 2000.

SANG, C.N.; GRACEY, R.H.; MAX, M.B.; BENNETT, G.J. Capsaicin-evoked mechanical allodynia and hyperalgesia cross nerve territories. Evidence for a central mechanism. **Anesthesiology**, v. 85, n. 3, p. 491-496, 1996.

SCHAFERS, M.; SVENSSON, C.I.; SOMMER, C.; SORKIN, L.S. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. **Jornal of Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2517-2521, 2003.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 1361-1368, 2007.

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, n. 2, p. 205-218, 1990.

SHIELDS, S.D.; ECKERT, W.A.; BASBAUM, A.I. Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. **The Journal of Pain**, v. 4, n. 8, p. 465-470, 2003.

SILVER, M.; BLUM, D.; GRAINGER, J. *et al.* Double-blind, placebo-controlled trial of Lamotrigine in combination with other medications for neuropathic pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 34, n. 4, p. 446-454, 2007.

SINDRUP, S.H.; JENSEN, T.S. Pharmacologic treatment of pain in polyneuropathy. **Neurology**, v. 55, n. 7, p. 915-920, 2000.

SINISCALCO, D.; GIORDANO, C.; GALDERISI, U. *et al.* Intra-brain microinjection of human mesenchymal stem cells decreases allodynia in neuropathic mice. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 4, p. 655-669, 2010.

SMITH, A.G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 435-62, 2001.

SPANGRUDE, G.J.; HEIMFELD, S.Y.; WEISSMAN, I.L. Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 58-62, 1988.

STEM CELL INFORMATION. In: The Adult Stem Cell. Bethesda, MD: **National Institutes of Health**, U.S. Department of Health and Human Services, 2009, disponível em <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter4>>. Acesso em 01/03/2010.

STOELTING, disponível em <<http://www.stoeltingco.com>>. Acesso em 15/11/2009.

SULAIMAN, O.A.; GORDON, T. Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. **Glia**, v. 37, n. 3, p. 206-218, 2002.

SUTER, M.R.; WEN, Y.R.; DECOSTERD, I.; JI, R.R. Do glial cells control pain? **Neuron Glia Biology**, v. 3, n. 3, p. 255-268, 2007.

SYKOVÁ, E.; JENDELOVÁ, P.; URDŽÍKOVÁ, L. *et al.* Bone marrow stem cells and polymer hydrogels: two strategies for spinal cord injury repair. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 7-8, p. 1113-1129, 2006.

SZILVASSY, S.J. The Biology of Hematopoietic Stem Cells. **Archives of Medical Research**, v. 34, n. 6, p. 446-460, 2003.

TANGA, F.Y.; RAGHAVENDRA, V.; DELEO, J.A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 2-3, p. 397-407, 2004.

TAYLOR, R.S. Epidemiology of refractory neuropathic pain. **Pain Practice**, v. 6, n. 1, p. 22-26, 2006.

THACKER, M.A.; PHYS, D.; CLARK, A.K. *et al.* Pathophysiology of Peripheral Neuropathic Pain: Immune Cells and Molecules. **Anesthesia and Analgesia**, v. 105, n. 3, p. 838-847, 2007.

TOREBJORK, E. Human microneurography and intraneural microstimulation in the study of neuropathic pain. **Muscle & Nerve**, v. 16, n. 10, p. 1063-1065, 1993.

TOTH, C. Substitution of gabapentin therapy with pregabalin therapy in neuropathic pain due to peripheral neuropathy. **Pain Medicine**, epub ahead of print, 2010.

TRIOLO, D.; DINA, G.; LORENZETTI, I. *et al.* Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 19, p. 3981-3993, 2006.

TSACOPOULOS, M. Metabolic signaling between neurons and glial cells: a short review. **Journal of Physiology, Paris**, v. 96, n. 3-4, p. 283-288, 2002.

VADALOUCA, A.; SIAFAKA, I.; ARGYRA, E. *et al.* Therapeutic management of chronic neuropathic pain: an examination of pharmacologic treatment. **Ann NY Acad Sci**, v. 1088, p. 164-186, 2006.

VALLIÈRES, L.; RIVEST, S. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1 β . **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 4, p. 1668-1683, 2002.

VASSILOPOULOS, G.; WANG, P.R.; RUSSELL, D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 901-904, 2003.

VINIK, A. Clinical review: use of antiepileptic drugs in the treatment of chronic painful diabetic neuropathy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 8, p. 4936-4945, 2005.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WAGNER, R.; MYERS, R.R. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. **Neuroscience**, v. 73, n. 3, p. 625-629, 1996.

WAGNER, R.; JANJIGIAN, M.; MYERS, R.R. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. **Pain**, v. 74, n. 1, p. 35-42, 1998.

WAGNER, W.; HO, A.D. Mesenchymal stem cell preparations: comparing apples and oranges. **Stem Cell Reviews**, v. 3, n. 4, p. 239-248, 2007.

WALSH, S.; MIDHA, R. Use of stem cells to augment nerve injury repair. **Neurosurgery**, v. 65, n. 4, p. A80-86, 2009.

WANG, H.; SUN, H.; DELLA PENNA, K. *et al.* Chronic neuropathic pain is accompanied by global changes in gene expression and shares pathobiology with neurodegenerative diseases. **Neuroscience**, v. 114, n. 3, p. 529-546, 2002.

WANG, L.X.; WANG, Z.J. Animal and cellular models of chronic pain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 8, p. 949-965, 2003.

WANG, X.; WILLENBRING, H.; AKKARI, Y. *et al.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 897-900, 2003.

WANG, J.; ZHANG, P.; WANG, Y. *et al.* The Observation of Phenotypic Changes of Schwann Cells after Rat Sciatic Nerve Injury. **Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology**, v. 38, n.1, p. 24-28, 2010.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. The pain of being sick: implications of immune-to-brain communication for understanding pain. **Annual Review of Psychology**, v. 51, p. 29-57, 2000.

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **TRENDS in Neurosciences**, v. 24, n. 8, p. 450-454, 2001a.

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. Spinal cord glia: new players in pain. **Pain**, v. 93, n. 3, p. 201-205, 2001b.

WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 4, p. 981-1011, 2002.

WATKINS, L.R.; HUTCHINSON, M.R.; LEDEBOER, A. *et al.* Norman Cousins Lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 21, n. 2, p. 131-146, 2007.

WATT, F.M.; HOGAN, B.L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427-1430, 2000.

WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Glial activation and pathological pain. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 2-3, p. 389-395, 2004.

WOODBURY, D.; SCHWARZ, E.J.; PROCKOP, D.J.; BLACK, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 61, n. 4, p. 364-370, 2000.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1959-1964, 1999.

WU, S.; SUZUKI, Y.; EJIRI, Y. *et al.* Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. **Journal of Neuroscience Research**, v. 72, n. 3, p. 343-351, 2003.

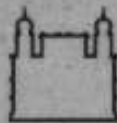
YEGHIAZARIANS, Y.; ZHANG, Y.; PRASAD, M. *et al.* Injection of bone marrow cell extract into infarcted hearts results in functional improvement comparable to intact cell therapy. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 7, p. 1250-1256, 2009.

YOO, K.H.; JANG, I.K.; LEE, M.W. *et al.* Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. **Cell Immunology**, v. 259, n. 2, p. 150-156, 2009.

ZHONG, J.; DIETZEL, I.D.; WAHLE, P. *et al.* Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 4305-4313, 1999.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 23-37, 2001.

ANEXO A



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Comitê de Ética no Uso de Animais – CPqGM/FIOCRUZ

CERTIFICADO

005/2007

Certificamos que o **Protocolo nº 004** para uso de animais em experimentação, sobre o projeto intitulado **“Terapia de células tronco de doenças crônico-degenerativas”** sob a responsabilidade do **Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em reunião de **22/03/2007**. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até **22/03/2009**.

(We certify that the protocol n° 094 about the project entitled **“Terapia de células tronco de doenças crônico-degenerativas”** agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM, FIOCRUZ in **22/03/2007** meeting. In the present version, this project is licensed and valid until **22/03/2009**).

Salvador, 22 de março de 2007.

Drª Fabienne Pettinga de Paiva
Coordenadora da CEUA
CPqGM - FIOCRUZ