



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FONOAUDIOLOGIA**

**DOURIVALDO SILVA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA CELULAR NA**  
**NEUROPATIA TRIGEMINAL EXPERIMENTAL**

Salvador  
2017

**DOURIVALDO SILVA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA CELULAR NA  
NEUROPATIA TRIGEMINAL EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Fonoaudiologia da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Fonoaudiologia.

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

Salvador  
2017

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	07
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	10
2.1	Animais	10
2.2	Modelo Experimental de Neuropatia Trigeminal	11
2.3	Isolamento, Obtenção e Transplante de Células	11
2.4	Determinação de Limiar Nociceptivo Mecânico- Filamentos de von Frey	11
2.5	Determinação de Limiar Nociceptivo Térmico - Hargreaves	12
2.6	Protocolo Experimental	12
2.7	Análise Estatística	13
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	13
3.1	Caracterização do Modelo de Neuropatia Trigeminal por Ligadura do Nervo Infraorbital	13
3.2	Efeito do Tratamento com CMMO e CBZ Sobre a Neuropatia Sensorial Trigeminal Experimental	15
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	18
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	21
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	23
	<b>ANEXO 1-</b> Instruções aos Autores	29
	<b>ANEXO 2 –</b> Cópia de Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA	34

## **FOLHA DE IDENTIFICAÇÃO**

**Avaliação do efeito da terapia celular na neuropatia trigeminal experimental**

**Evaluation of the effect of cell therapy in experimental trigeminal neuropathy**

Dourivaldo Silva Santos<sup>1</sup>, Catarina Milena Monteiro da Costa<sup>2</sup>, Cristiane Flora Villarreal<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Graduando em Fonoaudiologia, Universidade Federal da Bahia –UFBA.

<sup>2</sup> Mestranda em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia – UFBA

<sup>2</sup> Prof. Adjunto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia – UFBA e Coordenadora do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental – LAFTE. Pesquisadora visitante do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia – LETI (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA).

Endereço para correspondência \*:

Nome: Cristiane Flora Villarreal

Local: Rua Barão do Jeremoabo, nº 147, Ondina - Salvador, Bahia - Brasil,

CEP: 40.170-115- Faculdade de Farmácia da UBA.

Fone: (71) 3289- 6933

E- mail: [cfv@ufba.br](mailto:cfv@ufba.br)

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A neuralgia do trigêmeo corresponde à forma mais comum de dor neuropática craniofacial. É descrita como uma condição crônica intensamente dolorosa, caracterizada pela ocorrência de ataques de dor lancinante e súbita, alodinia e hiperalgesia, o que compromete consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes. Esses sintomas muitas vezes são refratários aos métodos convencionais de tratamento, reforçando a necessidade do estabelecimento de novas abordagens terapêuticas efetivas neste tipo de dor. Recentemente, terapias celulares têm sido consideradas potencialmente úteis no tratamento de doenças e lesões do sistema nervoso. **OBJETIVOS:** Avaliar os efeitos do transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO) na neuropatia trigeminal experimental. **MÉTODOS:** CMMO foram obtidas a partir de medulas ósseas de camundongos C57Bl/6 machos, oriundos do Biotério do CPqGM (FIOCRUZ-BA). Animais da mesma linhagem foram submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo infraorbital e durante trinta dias foram avaliados os limiares nociceptivos térmico e mecânico por Hargreaves e von Frey, respectivamente. **RESULTADOS:** A ligadura do nervo infraorbital reduziu os limiares nociceptivos, caracterizando a hiperalgesia térmica e a alodinia mecânica típica da neuropatia. O tratamento com CMMO produziu efeito antinociceptivo iniciado 24-48h após o tratamento, e que se manteve durante todo o período experimental. A carbamazepina, padrão ouro no controle clínico da neuropatia trigeminal, produziu efeito antinociceptivo com duração de apenas 4 h. **CONCLUSÃO:** CMMO produzem efeito antinociceptivo consistente e duradouro, indicando o potencial da terapia celular para o controle dessa síndrome crônica.

**PALAVRAS-CHAVES:** Dor neuropática, neuralgia trigeminal, células-tronco, carbamazepina

## 1.INTRODUÇÃO

Dor neuropática (DN) é definida pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) como um tipo de dor crônica que ocorre como consequência direta de uma lesão ou disfunção do sistema nervoso. Apesar da dificuldade de diagnóstico, decorrente da variabilidade das manifestações dolorosas descritas pelos pacientes, dados estimam que a prevalência de DN varia entre 6,9 e 10% da população mundial<sup>1</sup>. Além de reduzir substancialmente a qualidade de vida dos pacientes afetados, esta síndrome gera grande ônus socioeconômico, relacionado à redução na produtividade e custos com tratamento<sup>2</sup>. As principais causas de dor neuropática são: lesões traumáticas de nervos, infecção por Herpes zoster, diabetes, radioterapia, quimioterapia, álcool, AIDS, doenças autoimunes (esclerose múltipla, mielopatias infecciosas e degenerativas), deficiência de vitamina do complexo B, lesões isquêmicas, compressão neural, tumores, degeneração distal e doença de Parkinson<sup>3</sup>. Diversos mecanismos, ainda não totalmente elucidados, estão envolvidos na origem e manutenção da dor neuropática, tanto a nível periférico quanto central.

A neuralgia do trigêmeo (NT) é a forma mais comum de dor neuropática crânio-facial. A NT é descrita como uma condição intensamente dolorosa, geralmente unilateral, caracterizada pela ocorrência de ataques de dor lancinante e súbita, paroxísticos e recorrentes, do tipo choque, que é limitada a um ou mais ramos do nervo trigêmeo<sup>4</sup>. É considerada uma das causas de dor mais severas que uma pessoa pode experimentar<sup>5</sup>. A incidência anual estimada para NT gira em torno de 4,5 para cada 100.000 indivíduos, sendo mais prevalente em idosos por volta da 6ª e 7ª décadas de vida e em mulheres. Hipertensos também representam população com maiores chances de desenvolver NT, se comparados a população em geral<sup>4,6</sup>. A dor da NT é comumente evocada por estímulos triviais como lavar o rosto, fazer a barba, falar ou escovar os dentes, mas também pode ocorrer espontaneamente. Os ataques de dor são paroxísticos, com duração de frações de segundos até dois minutos em um ou mais territórios de inervação do nervo trigêmeo, sendo que a frequência pode variar entre centenas de ataques por dia até anos de remissão entre uma crise e outra<sup>7</sup>.

A fisiopatologia da NT envolve diversos mecanismos neurofisiológicos, tanto na periferia quanto no sistema nervoso central<sup>8,9</sup>. A lesão nervosa leva à liberação de mediadores que sensibilizam as terminações nervosas periféricas (sensibilização periférica), acarretando

em alterações neuroquímicas e fenotípicas com aumento da excitabilidade dos neurônios aferentes do gânglio trigeminal e dos núcleos do trigêmeo (sensibilização central). Em linha com essa fisiopatologia, o tratamento farmacológico de primeira escolha para a NT é baseado no uso de medicamentos de ação central ou que reduzem a excitabilidade neural, como anticonvulsivantes e antidepressivos (carbamazepina, oxicarbazepina, baclofen, lamotrigina e pimizida)<sup>10,11</sup>. Atualmente, a carbamazepina é o fármaco de primeira escolha na NT, embora o tratamento requeira acompanhamento constante, considerando o elevado risco de efeitos colaterais graves, como agranulocitose e anemia aplásica<sup>10, 12,13</sup>. Tem se usado também a gabapentina como uma alternativa terapêutica útil em casos de NT resistentes à terapia tradicional, porém apenas 27% dos pacientes apresentam uma redução significativa da percepção dolorosa<sup>10,14</sup>. Diante destes dados, fica evidente que a terapia farmacológica não tem tido sucesso no controle da NT, pois além do modesto controle analgésico, esses medicamentos provocam efeitos colaterais que comprometem a adesão do paciente ao tratamento, além de reduzir consideravelmente sua qualidade de vida<sup>15</sup>.

Em decorrência da limitada capacidade regenerativa do sistema nervoso, a restauração da função após lesão neuronal requer métodos que permitam a reconstrução, ou reorganização funcional, dos elementos do tecido nervoso. Uma emergente estratégia para substituição e regeneração de tecidos lesionados ou restabelecimento de função é o uso de células-tronco<sup>16, 17,18</sup>. As células-tronco (CT) são células indiferenciadas, capazes de se proliferar originando outras células-tronco ou se diferenciar, originando uma variedade de diferentes tipos teciduais. As CT podem ser de origem embrionária ou adulta<sup>19,20</sup>. As CT adultas estão presentes em diversos tecidos, sendo as provenientes da medula óssea as mais estudadas. As células mononucleares de medula óssea (CMMO) consistem de várias linhagens, incluindo as células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas, células precursoras endoteliais, células mieloides (granulócitos e macrófagos), além de linfócitos B, T, células NK e megacariócitos. Dentre estas, as células mesenquimais de medula óssea representam a fração de células com maior potencial de se diferenciar em diversos tecidos mantendo o estado de homeostase do organismo, através da reposição de células destruídas por lesões ou doenças<sup>21</sup>.

Diversos estudos têm apontado o potencial de células-tronco para o tratamento de doenças e lesões do sistema nervoso. Kim, et al (2003) observaram melhora dos sintomas

parkinsonianos em ratos que receberam células-tronco embrionárias, com a geração de neurônios dopaminérgicos que detinham propriedades eletrofisiológicas e bioquímicas semelhantes às células mesencefálicas não-transplantadas<sup>22</sup>. Em 2005, Wei e colaboradores usando modelo experimental de isquemia cerebral em camundongos concluíram que o transplante com CT foi capaz de formar novas conexões com melhora da função motora e redução dos déficits comportamentais dos animais. Este estudo sugere que o tecido cerebral isquêmico favorece a expressão de fatores quimiotáticos, que induzem a migração das células da corrente sanguínea para a área lesionada, de forma a reduzir o volume do infarto, recuperando a lesão isquêmica<sup>23</sup>. Em vista do grande potencial de diferenciação das células-tronco sob determinadas condições, tem despertado grande interesse para o seu uso terapêutico em lesões de nervo periférico. Dezawa e colaboradores (2001) demonstraram que 3 semanas após o transplante com células-tronco foi possível observar a regeneração em nervos ciáticos de ratos submetidos após terem sido submetidos a lesão<sup>24</sup>. Além disso, outros estudos apontam os benefícios de utilização de CT em doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer e Huntington<sup>25</sup>. Mendonça e colaboradores (2014) investigaram os efeitos do transplante autólogo de células-tronco de medula óssea em pacientes com trauma raquimedular. Chegaram à conclusão de que após o tratamento com as CMMO os pacientes evoluíram clinicamente, sendo observado melhora na sensibilidade tátil, melhora no desempenho funcional, melhora da função urológica e da lesão medular. Dessa forma, demonstrou ser um procedimento seguro, bem tolerado e eficaz<sup>26</sup>. Todos esses estudos indicaram que as células-tronco são neuroprotetoras e estimulam o reparo do tecido nervoso danificado.

Do mesmo modo, efeitos terapêuticos de células-tronco na dor neuropática experimental têm sido demonstrados<sup>27,28</sup>. Dados do nosso laboratório indicam que células mononucleares de medula óssea<sup>29</sup> e células-tronco mesenquimais<sup>30, 31, 32</sup> reduzem parâmetros comportamentais, bioquímicos e morfológicos de neuropatia em diferentes modelos experimentais. As evidências científicas apresentadas nestes estudos indicam que a terapia celular pode ser usada como uma ferramenta terapêutica em vários distúrbios do sistema nervoso. Entretanto, o efeito da terapia celular na neuralgia do trigêmeo não foi ainda avaliado. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do transplante de CMMO na neuropatia trigeminal experimental.



## **2. MATERIAL E METÓDOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL6, machos, provenientes do Biotério do CPqGM, FIOCRUZ – BA pesando de 20 a 25 gramas. Os doadores de medula óssea foram da mesma linhagem, entre 35 e 50 dias de idade. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em sala climatizada sem restrição hídrica ou alimentar. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA 25/2011) e estão de acordo com o protocolo estabelecido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor para animais de laboratório<sup>33</sup>. Todos os testes comportamentais foram realizados entre 07:00 e 17:00 horas.

### **2.2 Modelo Experimental de Neuropatia Trigeminal**

Foi utilizado o modelo descrito por Xu *et al* (2008)<sup>34</sup>. Resumidamente, a ligadura parcial unilateral do nervo infraorbital direito foi realizada sob controle visual direto utilizando uma lupa cirúrgica (Leica EZ4). Os animais receberam pentabiótico (10 µL/ 10 gramas de peso vivo) por via intraperitoneal 30 minutos antes da cirurgia. Em seguida, foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol 2,5% (100 µL/10 gramas de peso vivo). Após epilação manual no local, seguida de limpeza com álcool etílico a 70%, foi realizada incisão na linha média da face para expor o osso maxilar e nasal. O nervo infraorbital direito foi exposto 1-2 mm ventral ao forame infraorbitário. Em seguida foi realizada a ligadura parcial para transfixação de 1/3 a 1/2 do diâmetro do nervo, com fio de seda 7-0 (*SurgicalSpecialties Corporation, Reading, PA*). Finalizada a ligadura, a pele foi suturada com fio de polipropileno 6-0 (*TechSuture*). Ao fim da cirurgia os animais foram acomodados em caixas aquecidas, com água e ração *ad libitum* monitorados até o completo restabelecimento.

### **2.3 Isolamento, Obtenção e Transplante de Células**

As células totais da medula óssea foram isoladas dos ossos longos das patas traseiras de camundongos eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub>. Usando técnicas estéreis, a pata foi amputada na altura da articulação coxofemoral 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 (figura). 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. As células em uma densidade de  $1 \times 10^6$  foram administradas em cada animal por via endovenosa pela veia lateral da cauda, em solução fisiológica estéril com 10% de heparina.

#### **2.4 Determinação de Limiar Nociceptivo Mecânico - Filamentos de Von Frey**

Para avaliação do limiar nociceptivo mecânico os camundongos foram testados quatro dias antes da cirurgia e diariamente durante todo o período experimental. Uma série graduada de filamentos de von Frey, que consistem de segmentos de fio de nylon cuja rigidez à tensão é previamente determinada em gramas pelo fabricante (*Stoelting*), foi utilizado para estimulação mecânica da região facial direita, ipsilateral à cirurgia de ligadura. Antes da realização dos testes os camundongos foram habituados ao equipamento por um período de 20-30 minutos.

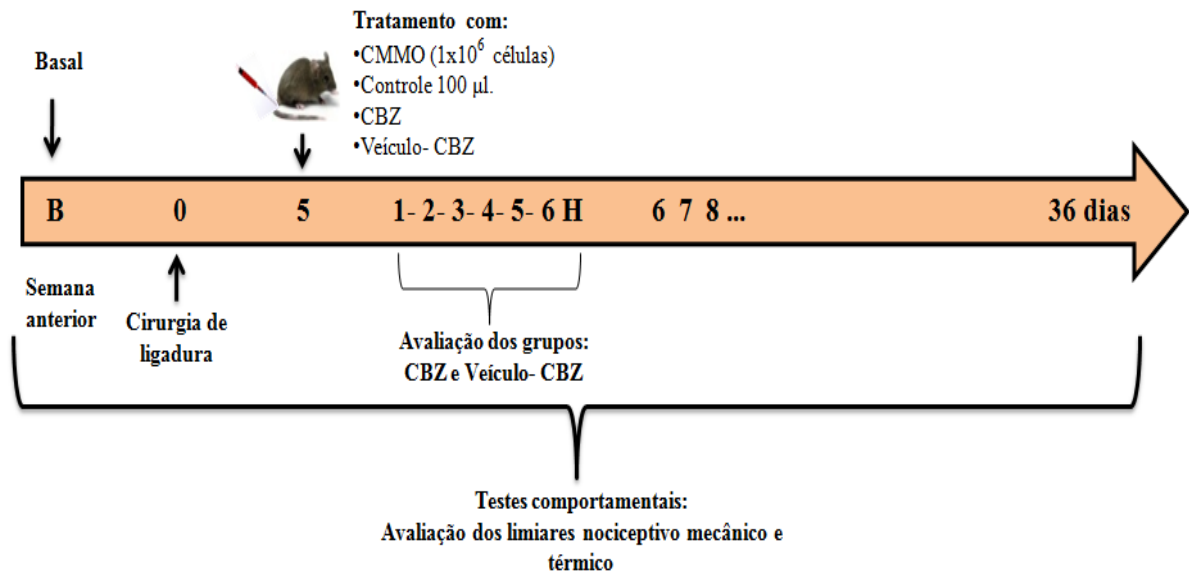
O teste foi feito conforme modelo descrito por Chaplan (1994)<sup>35</sup>, sendo adaptado e padronizado para a região facial. O período de tempo entre cada estímulo de filamento foi cerca de 2-3 minutos.

## **2.5 Determinação de Limiar Nociceptivo Térmico – Hargreaves**

O limiar de resposta ao estímulo térmico foi medido quatro dias antes da cirurgia e diariamente durante todo o período experimental em aparelho Hargreaves (*Ugo Basile*). O equipamento consiste de uma fonte móvel de luz infravermelha. Os animais foram gentilmente contidos na mão do avaliador, de forma que permitisse livre movimento da cabeça. Os camundongos foram mantidos a uma distância de aproximadamente 2 centímetros do aparelho de Hargreaves e o feixe de luz infravermelha incidiu sobre a região facial (direita) ipsilateral à cirurgia de ligadura do nervo. O feixe foi automaticamente interrompido pelo movimento brusco de retirada de cabeça, considerado o comportamento nociceptivo. O tempo em segundos transcorrido entre a ativação do feixe de luz até a resposta nociceptiva foi registrado. Cada triagem consistiu da aplicação de três estímulos, com intervalo de 3 minutos entre eles, sendo a média das três respostas considerada como o limiar nociceptivo térmico<sup>36</sup> adaptado para a região facial.

## **2.6 Protocolo Experimental**

O período experimental teve duração de 36 dias, a partir da indução do modelo (figura 1). Antes do início dos experimentos os animais foram submetidos à adaptação aos procedimentos, sendo realizadas as leituras basais (Basal; B) de limiar nociceptivo térmico e mecânico. Após a indução do modelo, os limiares nociceptivos foram avaliados diariamente até o final do experimento. Os grupos CBZ e Veículo-CBZ tiveram os limiares nociceptivos avaliados nas primeiras 6 horas após o tratamento, realizado no quinto dia, e depois seguiram avaliados uma única vez por dia até o término do experimento.



**Figura 1.** Delineamento experimental. O período experimental foi de 36 dias. Antes da cirurgia de ligadura para indução do modelo experimental (tempo zero) foram realizadas leituras dos limiares nociceptivos basais. Os limiares nociceptivos mecânico e térmico foram avaliados diariamente durante todo o período experimental, sendo os animais divididos nos seguintes grupos: naïve, sham, operado, controle, CMMO, CBZ e veículo- CBZ. Os tratamentos, realizados no dia 5 após a indução do modelo, foram por via endovenosa (veia lateral da cauda) para os grupos CMMO e seu veículo; e por via intraperitoneal para os grupos CBZ e veículo-CBZ. Os grupos naïve, sham e operado não receberam tratamentos, sendo utilizados para a verificação do sucesso na indução da neuropatia sensorial.

## 2.7 Análise Estatística

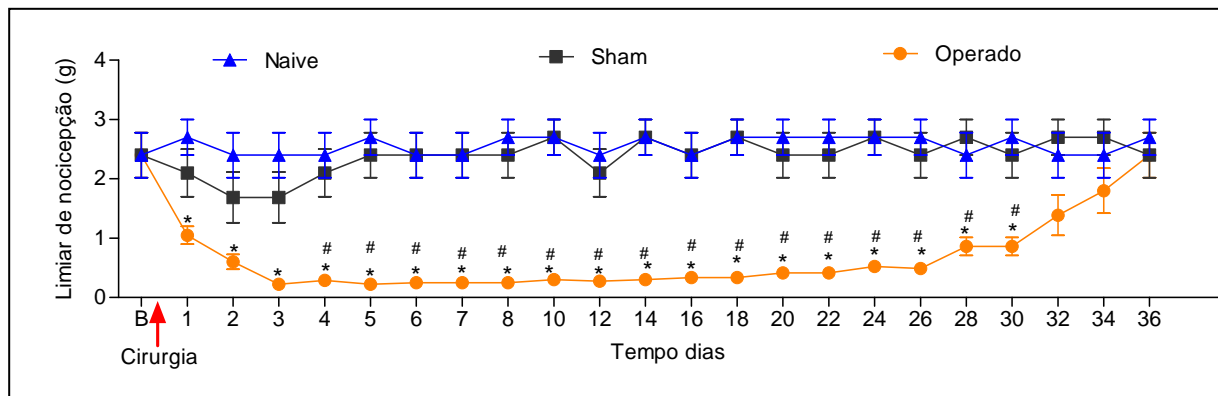
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. Dados dos testes de von Frey e Hargreaves foram comparados pelo teste 2-way ANOVA e diferenças entre grupos analisadas por Bonferroni. Os dados foram analisados no programa GraphPadPrism 5.0 (Califórnia, EUA) com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

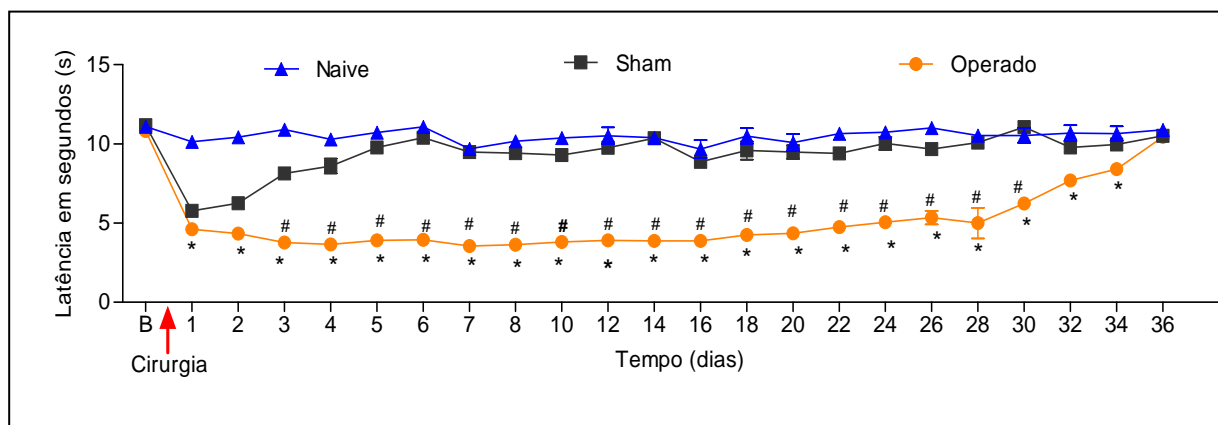
### 3.1 Caracterização do perfil nociceptivo no modelo de neuropatia trigeminal por ligadura do nervo infra- orbital

Um dia após a realização de cirurgia de ligadura parcial do nervo infraorbital os limiares nociceptivos mecânico (figura 2) e térmico (figura 3) reduziram de modo estatisticamente significante ( $p < 0,001$ ) em comparação aos animais do grupo sham (falso

operado) e naïve. A redução dos limiares nociceptivos foi mantida durante todo o período experimental indicando o estabelecimento da alodinia mecânica e hiperalgesia térmica que caracterizam a neuropatia.



**Figura 2. Redução do limiar nociceptivo mecânico após a ligadura parcial do nervo infraorbital em camundongos.** O limiar nociceptivo foi avaliado na região facial ipsilateral à cirurgia de ligadura parcial do nervo infraorbital, antes e depois da cirurgia. O eixo das ordenadas representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50 % das apresentações. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio dos animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia (realizada no tempo zero). O grupo naïve não foi submetido a nenhum procedimento experimental, o grupo sham refere-se a animais submetidos à todos os procedimentos cirúrgicos porém sem ligadura do nervo e o grupo operado refere-se aos animais que foram submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$ ; comparado com o grupo naïve; #  $p < 0,001$  comparado ao grupo sham pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

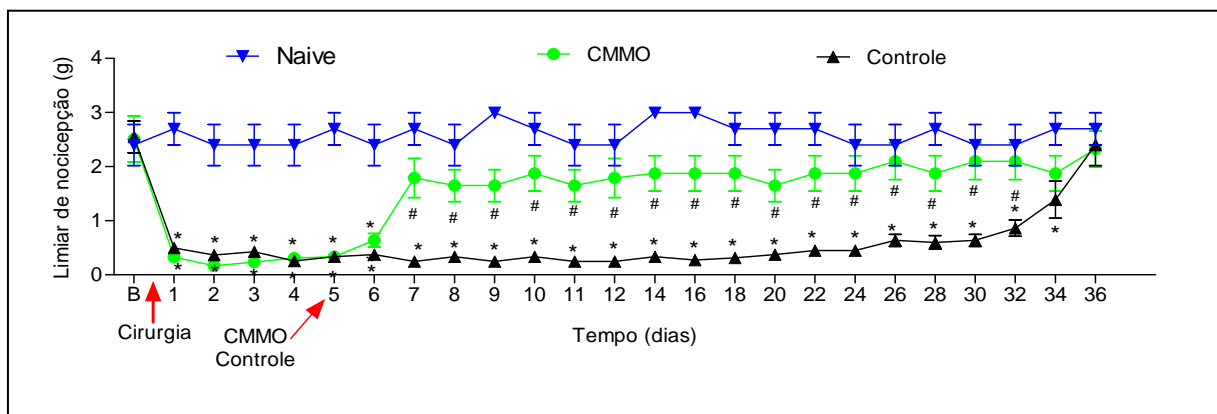


**Figura 3. Redução do limiar nociceptivo térmico após a ligadura parcial do nervo infraorbital em camundongos.** O limiar nociceptivo térmico foi avaliado na região facial ipsilateral à cirurgia de ligadura parcial do nervo infraorbital, antes e depois da cirurgia. O eixo das ordenadas representa a resposta nociceptiva em segundos (s), ou seja, o tempo que o animal leva para retirar a cabeça, após o início do estímulo térmico. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio dos animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia (realizada no tempo zero). O grupo naïve não foi submetido a nenhum procedimento experimental, o grupo sham refere-se a animais submetidos à todos os procedimentos cirúrgicos porém sem ligadura do nervo e o grupo operado refere-se aos animais que foram submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ ; comparado com o grupo naïve; #  $p < 0,001$  comparado ao grupo sham pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

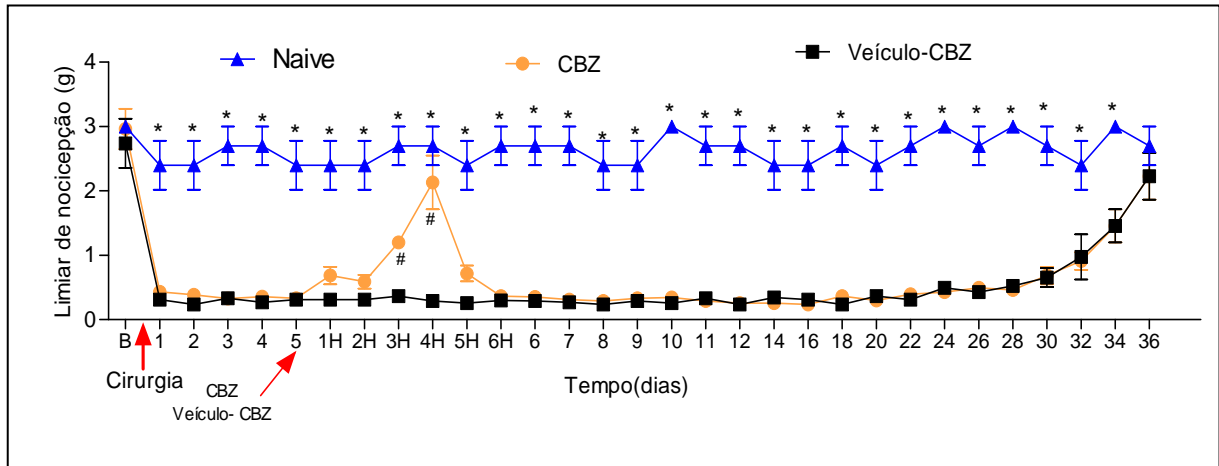
### 3.2 Efeito dos tratamentos com CMMO e carbamazepina sobre as alterações nociceptivas na neuropatia trigeminal experimental

A figura 4 mostra o efeito do tratamento com CMMO sobre o limiar nociceptivo mecânico. Um dia após a indução do modelo os animais operados reduziram o limiar nociceptivo mecânico ( $p < 0.001$ ), indicando o desenvolvimento de alodinia mecânica. A administração endovenosa de CMMO ( $1 \times 10^6$ ), no quinto dia após a cirurgia de indução, aumentou o limiar nociceptivo mecânico dos camundongos a partir do segundo dia após sua administração ( $p < 0.01$ ). Esse efeito antinociceptivo se manteve até o final do período experimental ( $p < 0.01$ ).

A administração de carbamazepina (30 mg/kg; i.p) (figura 5), fármaco de referência para controle clínico da NT, realizada no quinto dia após a cirurgia, induziu efeito antinociceptivo estatisticamente significativo apenas 3 e 4 horas após sua administração ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ , respectivamente). Vinte e quatro horas após a administração de carbamazepina a alodinia mecânica foi plenamente restabelecida, não diferindo do grupo tratado com veículo.



**Figura 4. Efeito de células mononucleares da medula óssea (CMMO) sobre o limiar nociceptivo mecânico em camundongos com neuropatia trigeminal por ligadura parcial do nervo infraorbital.** O limiar nociceptivo foi avaliado na região facial ipsilateral à cirurgia de ligadura parcial do nervo infraorbital, antes, depois da cirurgia e após o transplante. O eixo das ordenadas representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50 % das apresentações. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio dos animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia e 5o dia do transplante. O grupo Naive não foi submetido à nenhum procedimento experimental, e o grupo CMMO refere-se a animais que receberam o tratamento com as células e controle refere-se aos animais que receberam solução fisiológica. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$  comparado com o grupo Naive; # $p < 0,01$  comparado com o grupo controle pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

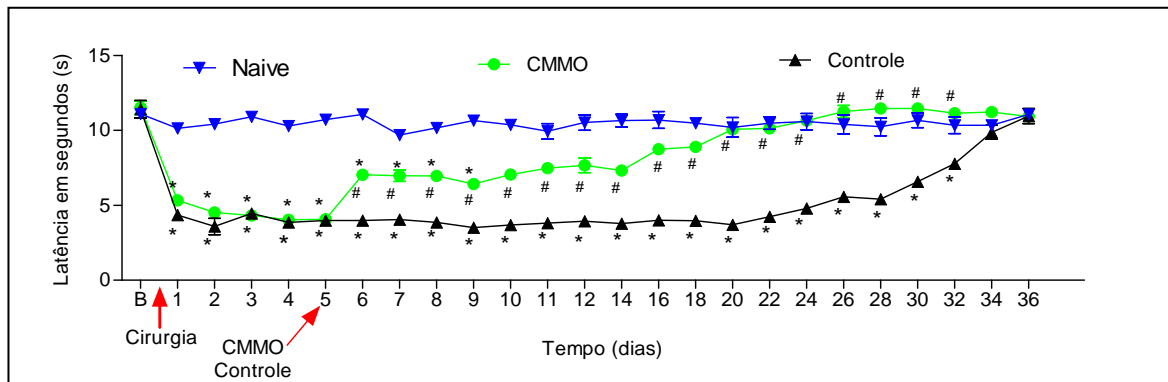


**Figura 5. Efeito da carbamazepina sobre o limiar nociceptivo mecânico em camundongos com neuropatia trigeminal por ligadura parcial do nervo infraorbital.** O limiar nociceptivo foi avaliado na região facial ipsilateral à cirurgia de ligadura parcial do nervo infraorbital, antes, depois da cirurgia e após o tratamento. O eixo das ordenadas representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50 % das apresentações. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio dos animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia e 5o dia do tratamento farmacológico (avaliados de 1-6 horas). O grupo naive não foi submetido à nenhum procedimento experimental, o grupo CBZ refere-se a animais que receberam o tratamento com carbamazepina e veículo- CBZ refere-se aos animais que receberam solução fisiológica. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$  comparado com o grupo naive; #  $p < 0,05$  comparado com o grupo veículo- CBZ pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.

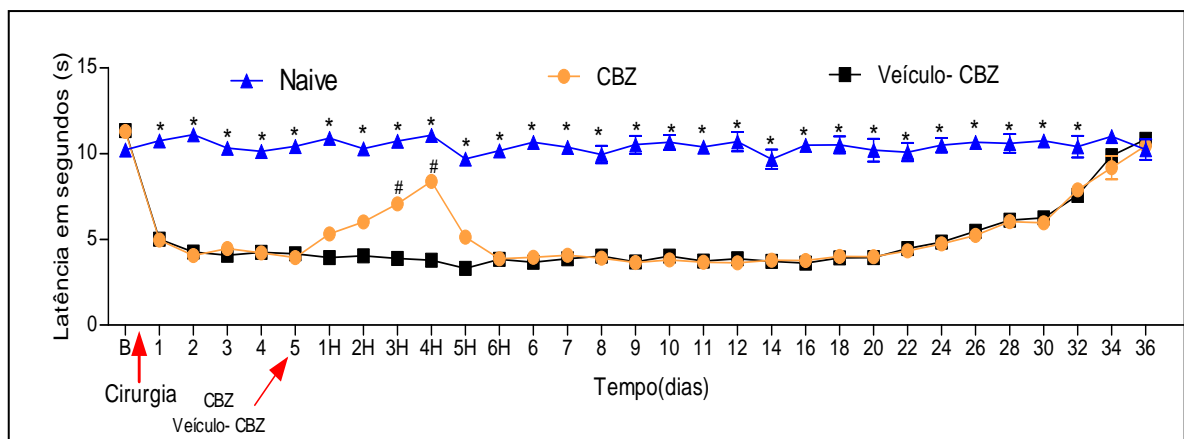
A figura 6 mostra o efeito do tratamento com CMMO sobre o limiar nociceptivo térmico. Um dia após a indução do modelo os animais operados reduziram o limiar nociceptivo térmico ( $p < 0,001$ ), indicando o desenvolvimento da hiperalgesia térmica. A administração endovenosa de CMMO ( $1 \times 10^6$ ), no quinto dia após a cirurgia de indução, aumentou o limiar nociceptivo térmico dos camundongos a partir do primeiro dia após sua administração ( $p < 0,01$ ). Esse efeito antinociceptivo se manteve até o final do período experimental ( $p < 0,05$ ).

A administração de carbamazepina (30 mg/kg; i.p) (figura 7), fármaco de referência para controle clínico da NT, realizada no quinto dia após a cirurgia, induziu efeito antinociceptivo estatisticamente significativo apenas 3 e 4 horas após sua administração ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Vinte e quatro horas após a administração de carbamazepina a hiperalgesia térmica foi plenamente restabelecida, não diferindo do grupo tratado com veículo.

Em ambos os testes o grupo controle e veículo se manteve com baixo limiar de resposta aos estímulos mecânico e térmico um dia após a cirurgia e teve significância estatística até o dia 32 após a realização da cirurgia. Depois desse período reverteu o estado de alodinia e hiperalgesia.



**Figura 7. Efeito de células mononucleares da medula óssea (CMMO) sobre o limiar nociceptivo térmico em camundongos com neuropatia trigeminal por ligadura parcial do nervo infraorbital.** O limiar nociceptivo foi avaliado na região facial ipsilateral à cirurgia de ligadura parcial do nervo infraorbital, antes, depois da cirurgia e após o transplante. O eixo das ordenadas representa a resposta nociceptiva em segundos (s), ou seja, o tempo que o animal leva para retirar a cabeça, após o início do estímulo térmico. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio dos animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia e 5o dia do transplante. O grupo naive não foi submetido à nenhum procedimento experimental, e o grupo CMMO refere-se a animais que receberam o tratamento com as células e controle refere-se aos animais que receberam solução fisiológica. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$  comparado com o grupo naive; #  $p < 0,01$  comparado com o grupo controle pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.



**Figura 8. Efeito da carbamazepina sobre o limiar nociceptivo térmico em camundongos com neuropatia trigeminal por ligadura parcial do nervo infraorbital.** O limiar nociceptivo foi avaliado na região facial ipsilateral à cirurgia de ligadura parcial do nervo infraorbital, antes, depois da cirurgia e após o tratamento. O eixo das ordenadas representa a resposta nociceptiva em segundos (s), ou seja, o tempo que o animal leva para retirar a cabeça, após o início do estímulo térmico. O eixo das abscissas representa o tempo em dias, sendo B (basal) o limiar médio dos animais antes da cirurgia e 1 o limiar do primeiro dia depois da cirurgia e 5o dia do tratamento farmacológico (avaliado de 1-6 horas). O grupo naive não foi submetido à nenhum procedimento experimental, o grupo CBZ refere-se a animais que receberam o tratamento com carbamazepina e veículo- CBZ refere-se aos animais que receberam solução fisiológica. Valores representados como a média de 6 (seis) animais por grupo  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$  comparado com o grupo naive; #  $p < 0,01$  comparado com o grupo veículo- CBZ pelo teste 2-way ANOVA seguido de Bonferroni.



#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos o potencial terapêutico do transplante de células mononucleares da medula óssea em modelo experimental de neuropatia trigeminal em camundongos. O transplante das células foi capaz de reverter as alterações de sensibilidade térmica e mecânica características da neuropatia. A carbamazepina, padrão ouro no controle clínico de neuropatia trigeminal, produziu efeito antinociceptivo transitório, que foi totalmente revertido 24h após sua administração. Esses resultados indicam que a terapia celular pode ser uma opção promissora para o controle da neuropatia trigeminal refratária ao tratamento farmacológico atualmente disponível.

Após a indução do modelo, o desenvolvimento da neuropatia trigeminal foi evidenciado pela redução do limiar nociceptivo térmico e mecânico. A neuropatia sensorial se estabeleceu um dia após a ligadura do nervo infraorbital, permanecendo até o fim do período experimental. Dentre os diversos sintomas da NT clínica se destacam a dor espontânea (dor na ausência de qualquer estímulo), a hiperalgesia (aumento da resposta dolorosa a um estímulo nocivo), e a alodinia (dor a um estímulo inócuo, ou seja, que em condições normais não causa dor)<sup>37, 38</sup>. No presente estudo, utilizando métodos bem validados e aceitos internacionalmente para quantificação de limiar nociceptivo em camundongos<sup>35,36</sup>, demonstramos que o modelo de neuropatia trigeminal utilizado no presente estudo apresenta boa equivalência com a clínica. Dessa forma, os efeitos da terapia celular foram a seguir avaliados nesse modelo de neuropatia sensorial.

Já é descrito na literatura que o transplante de células mononucleares da medula óssea reduz alterações nociceptivas em animais neuropáticos, evidenciando o seu potencial terapêutico nessa síndrome. Em estudo desse potencial Klass e colaboradores (2007) utilizando modelo de DN por ligadura de nervo isquiático demonstram que o transplante com CMMO foi capaz de reverter parâmetros comportamentais de nociceção<sup>39</sup>. Em linha com estas investigações, estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa usando modelo de DN por ligadura parcial do nervo isquiático demonstrou que as células mononucleares de medula óssea foram capazes de melhorar a alodinia mecânica e favorecer redução da expressão da citocina TNF- $\alpha$ , bem como a liberação de fatores solúveis, observadas no nervo isquiático e na medula espinal<sup>29</sup>. Em linha com os dados da literatura, no presente trabalho uma única

administração de CMMO foi capaz de reverter a alodinia e a hiperalgesia até o fim do período experimental, indicando que essas células têm efeito terapêutico também na neuropatia trigeminal. Esse efeito antinociceptivo pode ser mediado pelas células mesenquimais constituintes de CMMO.

De fato, estudos têm demonstrado que a administração de células-tronco mesenquimais reduz a dor neuropática comportamental em modelo experimental de ligadura do nervo isquiático<sup>27,28,40-44</sup> reforçando o seu efeito antinociceptivo. Guimarães *et al.* (2013) usando células tronco mesenquimais obtidas de polpa dentaria de camundongos, evidenciou que essas células favoreceram um efeito antinociceptivo duradouro na neuropatia diabética experimental<sup>30</sup>. Em concordância Evangelista (2014), utilizando uma única administração de CMMO observou melhora comportamental da alodinia e hiperalgesia em animais com neuropatia diabética, além de melhora morfológica observada no nervo isquiático<sup>31</sup>. Tem se evidenciado também os efeitos das células tronco em outros modelos experimentais. Em 2002, Chop e Li (2002), demonstraram que células- tronco mesenquimais produzem efeito terapêutico em modelos de lesão neural, sugerindo que a melhora observado seria em decorrência de mediadores químicos como, fatores de crescimento e produção de citocinas antiinflamatórias, que favoreceriam a neuro e angiogênese, levando à uma melhora e restauração do tecido lesionado e com conseqüente melhora de sua função<sup>45</sup>. Dezawa (2001) demonstrou que as células- tronco transplantadas em ratos com lesão de nervo isquiático foram capazes de restabelecer regeneração do nervo lesionado e se diferenciarem em progenitores celulares com características de células de Schwann, justificando o seu efeito regenerador no nervo<sup>24</sup>. Em outro estudo, onde o nervo isquiático foi seccionado e os animais tratados com células-tronco os pesquisadores notaram um aumento significativo na velocidade de condução nervosa<sup>46</sup>. Do mesmo modo, Baes *et al* (2005) utilizando esse mesmo modelo evidenciaram que o uso de células- tronco promove uma regeneração axonal, através da detecção de condução nervosa pelo potencial de ação<sup>47</sup>.

Estudos têm apoiado que o mecanismo de ação das células- tronco evidenciado nos tratamentos decorre devido ao seu potencial imunomodulatório, propriedades antiinflamatórias e pelo seu efeito trófico<sup>48-50</sup>. O que as coloca como uma alternativa promissora para o reestabelecimento funcional e estrutural de tecidos lesionados. Acredita se

atualmente, que os efeitos se baseiam na ação parácrina. Segundo essa teoria, as células-tronco são capazes de produzir e secretar vários fatores de crescimento e citocinas favorecendo um efeito modulador que ajudam a fornecer restabelecimento estrutural e funcional, suprimir a inflamação e interagir com células do sistema imune através da liberação de diversos fatores solúveis anti-proliferativos e anti-citotóxicos que atuarão sobre as células do sistema imunológico (linfócitos e células dendríticas)<sup>51</sup>. Dentre esses fatores, estão as prostaglandinas (PGE2), as interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), o fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ), o fator de crescimento hepatoide (HGF) e a enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)<sup>49,50</sup>, além, de promover a angiogênese<sup>18</sup>. A liberação de TGF- $\beta$  e HGF suprime a proliferação dos linfócitos T e B<sup>52</sup>, já liberação de PGE2 inibe a produção dos linfócitos T citotóxicos e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-6). Além disso, a liberação de PGE2 pelas células inibe a produção e secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e estimula a produção de citocina antiinflamatória IL-10<sup>49,53</sup>.

A fisiopatologia da neuropatia envolvendo nervos periféricos como, o nervo trigêmeo, é marcada por um processo inflamatório que leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, enzimas hidrolíticas e óxido nítrico (NO), com conseqüente diminuição do limiar de ativação dos nociceptores e aumento da excitabilidade da fibra nervosa<sup>54,55</sup>. Além da inflamação e da liberação de mediadores inflamatórios, neuropeptídeos e fatores neurotróficos, alterações degenerativas das fibras nervosas decorrentes do dano direto, como lesão axonal e desmиеnilização, também são mecanismos periféricos relevantes. As citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e 6 (IL-6) têm sido implicadas tanto na sensibilização central quanto periférica<sup>56</sup>. A infiltração de monócitos / macrófagos juntamente com o estresse oxidativo e ativação do TRPA1 (receptores de potencial transitório presentes nos nociceptores) também contribuem para a manutenção da sensibilidade dolorosa<sup>57</sup>.

Em comparação com o tratamento farmacológico, o uso da terapia celular na NT representa interessante alternativa, por se tratar de um procedimento único, com boa eficácia e que pode produzir efeito analgésico permanente. Por outro lado, os antidepressivos tricíclicos e os anticonvulsivantes, principais representantes no controle farmacológico deste tipo de dor, apresentam baixa eficácia e vários efeitos colaterais que limitam as doses utilizadas<sup>58, 59</sup>. Em

nosso estudo o tratamento com carbamazepina contribuiu apenas de forma transitória e discreta para a normalização dos limiares nociceptivos dos animais neuropáticos. É atualmente considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento da NT, porém se observa uma modesta eficácia no alívio da dor e ação dose-dependente, responsável por produzir efeitos colaterais como tonturas, sonolência, cefaléia, fadiga, zumbido, vertigem, náuseas e ganho de peso, os quais dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento <sup>60</sup>. Por outro lado a nossa experiência prática nos mostra que a utilização de CMMO para procedimentos terapêuticos apresenta uma série de vantagens, dentre elas a facilidade de obtenção, possibilidade de utilizar o próprio paciente como doador e o menor risco de contaminações com culturas, o que favorece suas aplicações clínicas.

Porém, os mecanismos envolvidos nos efeitos destas células, que levam a indução de uma ação antinociceptiva na NT são desconhecidos. De acordo com esses resultados, é possível que o efeito antinociceptivo de CMMO na NT, seja o resultado de uma melhora da função do nervo, pela ação neurotrófica e angiogênica das células-tronco. Além do seu efeito modulador como, a liberação de citocinas antiinflamatória. Estudo do nosso laboratório utilizando modelo experimental de ligadura parcial de nervo isquiático demonstrou que o transplante com células- tronco mesenquimais além de promover melhora comportamental, reduziu os níveis de citocinas pró- inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) e aumentou os níveis de citocinas antiinflamatória (IL-10) na medula e no nervo isquiático <sup>61</sup>. Reforçando ainda mais o efeito modulador das células- tronco. Em outro estudo nosso, usando modelo de neuropatia periférica induzida por quimioterapia foi observado que o uso de células- tronco promove melhora de sensibilidade térmica e mecânica, além reduzir alterações morfométricas em fibras C no nervo isquiático e contribuir para melhora no ambiente homeostático oxidativo no nervo periférico, observado pela redução das atipias mitocondriais e produtos do estresse oxidativo, como óxido nítrico e malondialdeído<sup>32</sup>.

Considerando a cronicidade dessa síndrome e a ausência de procedimentos terapêuticos eficazes para seu controle, os nossos dados demonstram uma enorme relevância científica, ao propor uma nova e promissora alternativa de tratamento. Entretanto, precisamos investigar os mecanismos de ação da terapia celular na NT, além disso, a sua eficácia clínica.

## **5. CONCLUSÃO**

Este estudo demonstrou que o transplante de células mononucleares de medula óssea produziu efeito antinociceptivo relevante na neuropatia trigeminal experimental. Uma única administração de CMMO foi capaz de reverter as alterações da sensibilidade térmica e mecânica características da neuropatia. Esse efeito se manteve durante todo o período experimental, enquanto o tratamento farmacológico considerado padrão ouro apresentou efeito antinociceptivo apenas transitório e curto. Esses resultados indicam que a terapia celular apresenta potencial para o controle da neuropatia trigeminal. Entretanto, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de investigar os efeitos de outras populações celulares e elucidar seus mecanismos de ação na neuropatia.

## **Evaluation of the effect of cell therapy in experimental trigeminal neuropathy**

### **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Trigeminal neuralgia corresponds to the most common form of craniofacial neuropathic pain. It is described as an intensely painful chronic condition, characterized by the occurrence of lancinating and sudden attacks of pain, allodynia and hyperalgesia, which considerably compromise patients' quality of life. These symptoms are often refractory to conventional methods of treatment, reinforcing the need to establish new effective therapeutic approaches in this type of pain. Recently, cellular therapies have been considered potentially useful in the treatment of diseases and injuries of the nervous system.

**OBJECTIVES:** To evaluate the effects of bone marrow mononuclear cell (BMMC) transplantation on experimental trigeminal neuropathy. **METHODS:** BMMC were obtained from bone marrow of male C57Bl/6 mice, from the laboratory animal center of CPqGM (FIOCRUZ-BA). Animals of the same lineage underwent partial ligation of the infraorbital nerve and during thirty days the thermal and mechanical nociceptive thresholds were evaluated by Hargreaves and von Frey, respectively. **RESULTS:** Infraorbital nerve ligation reduced nociceptive thresholds, characterizing thermal hyperalgesia and mechanical allodynia typical of neuropathy. Treatment with BMMC produced antinociceptive effect that started 24-48hours after treatment, and was maintained throughout the experimental period. Carbamazepine, a gold standard in the clinical control of trigeminal neuropathy, produced an antinociceptive effect lasting only 4 hours. **CONCLUSION:** BMMC produces a consistent and long-lasting antinociceptive effect, indicating the potential of cellular therapy for the control of this chronic syndrome.

**KEYWORDS:** Neuropathic pain, trigeminal neuralgia, stem cells, carbamazepine

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VAN HECKE, O. et al. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. **Pain**. 155 (2014) 654–662.
2. MAIZELS, M.; MCCARBERG, B. Antidepressants and Antiepileptic Drugs for Chronic Non-Cancer Pain. **Am. Fam. Physician**, v.71, p.483-490, 2005.
3. GALVÃO, A. C. R. Dor neuropática: Tratamento com anticonvulsivantes. **Instituto simbidor**, São Paulo, Ed. Segmento Farma, 2005.
4. NURMIKKO, T.J.; ELDRIDGE, P.R. Trigeminal neuralgia: pathophysiology, diagnosis and current treatment. **Br. J. Anaesth.**, 87: 117-132, 2001.
5. CHICHORRO, J.G. *et al.* Mechanisms operated by endothelin ETA and ETB receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**. 43: 133-142, 2009.
6. LEOCÁDIO. *et al.* Neuralgia do trigêmio uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research- BJSCR** Vol.7,n.2,pp.33-37 (Jun - Ago 2014).
7. KRAFFT, R.M. Trigeminal neuralgia. **Am. Fam. Physician.**, 77: 1291-1296, 2008.
8. SVENSSON, E. Pain mechanisms in myogenous temporomandibular disorders. **Pain Forum**. 1997(6):158-65.
9. SIDDALL, P.J.; COUSINS, M.J. Pain mechanisms and management: an update. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 1995; 22(10):679-88.
10. FINNERUP, N.B.; SINDRUP, S.H.; JENSEN, T.S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. **Pain**, v.150, p. 573-581, 2010.
11. GRONSETH, G. *et al.* Practice Parameter: the diagnostic evaluation and treatment of trigeminal neuralgia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the European Federation of Neurological Societies. **Neurology**, 2008; 71(15):1183-90.
12. ATTAL, N.E.; FINNERUP, N.B. Pharmacological management of neuropathic pain. **Pain: Clinical Updates**, in J. IASP., Vol. XVIII, Issue 9, 2010.
13. WIFFEN, P.J.; MCQUAY, H.J.; MOORE, R.A. Carbamazepine for acute and chronic pain. **Cochrane Database Syst. Rev.**, CD005451, 2005.

14. LEMOS, L.; FLORES, S.; OLIVEIRA, P. Gabapentin supplemented with ropivacain block of trigger points improves pain control and quality of life in trigeminal neuralgia patients when compared with gabapentin alone. *Clin. J. Pain*, 24: 64-75, 2008.
15. TESFAYE, S. *et al.* Diabetic Neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetescare*, vol. 33, n. 10, 10/2010.
16. PROCKOP, D.J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Non-hematopoietic Tissues. *Science*, 1997.
17. AKIYAMA, Y.; RADTKE, C.; KOCSIS, J.D. Reimplantation of the Rat Spinal Cord by Transplantation of Identified Bone Marrow Stromal Cells. *J. Neurosci.*, n.15, v. 22, p. 6623-6630, 2002.
18. SYKOVÁ, E. *et al.* Bone marrow stem cells and poly merhydro gels: two strategies for spinal cord injury repair. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v.26, p.1113-1129, 2006.
19. SOUZA, V. F. *et al.* Células-tronco: uma breve revisão. *R. Ci. Med. Biol.*, v.2, n.2, 2003.
20. SANTOS, R. B.; SOARES, M. B. P.; CARVALHO, A. C.C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, p. 490-495, 2004.
21. SIMEONI, R. B. **Efeito do transplante autólogo de células-tronco mononucleares da medula óssea na miocardiopatia induzida por doxorubicina em ratos wistar.** Dissertação – PUC-PR, 2006.
22. KIM, J.Y. *et al.* Dopaminergic neuronal differentiation from embryonic neural precursors by Nurr1 over expression. *J Neurochem.*2003;85:1443-54.
23. WEI, L. *et al.* Angiogenesis and stem cell transplantation as potential treatments of cerebral ischemic stroke. *Pathophysiology.* 2005;12: 47-62.
24. DEZAWA, M. *et al.* Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrowstromalcells. *Eur J Neurosci.* 2001;14:1771-6.
25. HESS, D. C.; BORLONGAN, C. V. Stem cells and neurological diseases. *Cell Prolif.*, v.41, p. 94-114, 2008.
26. MENDONÇA, M. V. P. **Transplante autólogo de células-tronco de medula óssea em pacientes com trauma raquimedular.** 106 F. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira, 2014.
27. MUSOLINO, P. L.; *et al.* Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. *Neurosci. Lett.*, v. 418, p. 97-101, 2007;



28. KLASS, M. et.al. Intravenous mononuclear marrow cells reverse neuropathic pain from experimental mononeuropathy. **Anesth. Analg.**, v. 104, p. 944-948, 2007.
29. BARROS, T. A. A. **Avaliação dos efeitos da terapia celular em modelo experimental de dor neuropática.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2010.
30. GUIMARÃES, E.T. *et al.* Transplantation of Stem Cells Obtained from Murine Dental Pulp Improves Pancreatic Damage, Renal Function and Painful Diabetic Neuropathy in Diabetic Type 1 Mouse Model. **Cell Transplant**, 2012.
31. EVANGELISTA, A. **Avaliação do efeito do transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea em modelo murino de neuropatia periférica diabética.** 91 F. Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.
32. OLIVEIRA, A. L. L. **Efeitos do tratamento com células mesenquimais de medula óssea sobre a neuropatia crônica induzida por oxaliplatina em camundongos.** 72 F. Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2017.
33. ZIMMERMANN, M. Ethic guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.
34. XU, M. ; AITA , M.; CHAVKIN C: Partial infraorbital nerve ligation as a model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural, and glial reactions. **J Pain** 2008, 9:1036-1048.
35. CHAPLAN, S. R. et.al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J. Neurosci. Meth.**, v. 53, n.1, p. 55-63, 1994.
36. HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 77-88, 1988.
37. INTISO, E. et al. Botulinum Toxin Type A for the Treatment of Neuropathic Pain in Neuro-Rehabilitation. **Toxins**, v. 7, n. 7, p. 2452-2480, 2015.
38. COSTA, G.M.; ALMEIDA-LEITE. Neuralgia trigeminal: mecanismos periféricos e centrais. **C M Rev Dor**. São Paulo, 2015 out-dez;16(4):297-301.
39. KLASS, M. et. al. Intravenous mononuclear marrow cells reverse neuropathic pain from experimental mononeuropathy. **Anesth. Analg.**, v. 104, p. 944-948, 2007.

40. NAKAMURA, J., *et al.* Transplantation of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Improves Mechanical Hyperalgesia, Cold Allodynia and Nerve Function in Diabetic Neuropathy. **Plosone**, vol. 6, n.11, 11/2011.
41. SINISCALCO, D., *et al.* Long lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular and biomolecular modifications in neuropathic mice. **Frontiers in integrative neuroscience**. Vol. 5, n. 79, 12/2011.
42. RIBEIRO–RESENDE, V. T. *et al.* Trophic activity derived from bone marrow mononuclear cells increase esperipheral nerve regeneration by a ctingon both neuronal and glial cell populations. **Neuroscience**, 159: 540-549, 2009.
43. GOEL, R. K. Effect of bonemarrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transaction model of threats ciatic nerve. **Journal of Clinical Neuroscience**, 16: 1211-1217, 2009.
44. CSETE, M., *et al.* Intravenous Mononuclear Marrow Cells Reverse Neuropathic Pain from Experimental Mononeuropathy. **International Anesthesia ResearchSociety**, vol. 104, n. 4, 04/2007.
45. CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol.**, v.1, n. 2, 2002.
46. MIMURA, T. *et al.* Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. **J Neurosurg**. 2004; :806-12.
47. BAES, C. *et al.* Avaliação neurofisiológica do efeito das células-tronco mesenquimais de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração de nervo periférico. In: **I Congresso Brasileiro de Células Tronco**; 2005 10-12 Nov; Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Realidade e Perspectivas; 2005.
48. WAN, C. D. *et al.* Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopicliver transplantation model. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**. 2008;7(1):29-33.
49. NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**. 2007 Nov 15;110 (10):3499-506.
50. BERNARDO, M.E.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W.E. Mesenchymal stromal cells. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1176, p. 101-117, 2009.
51. CORCIONE, A, *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**. 2006;107(1):367-72.

52. DI NICOLA, M. et al. Human bone marrow stromal cells up press T lymphocyte proliferation induced by cellular or non specific mitogeni cstimuli. **Blood**. 2002;99(10):3838-43.
53. AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**. 2005;105(4):1815-22.
54. JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 2001; 413 (6852):203-10.
55. DAEMEN, M.A. *et al*. Neurogenic inflammation in an animal model of neuropathic pain. **Neurol Res**. 1998;20(1):41-5.
56. AUSTIN, P. J.; MOALEM-TAYLOR,G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **J Neuroimmunol**. 2010;229(1-2):26-50.
57. TREVISAN, G. *et al* .TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. **Brain** 2016: 139; 1361–1377.
58. SCHESTATSKY, P. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. **Rev. HCPA**, vol. 28 n.3, 2008.
59. FAZAN, V. P. S., *et al*. Diabete como modelo de neuropatia autonômica. **Medicina (Ribeirão Preto)** 39 (1): 28-38, 2006.
60. MOTTA, P.; SOUZA, M. T.; SENGUPTA, R. P. Radiofrequency- thermo coagulation in the treatment of trigeminal neuralgia: analysis of 100 cases. **ArqNeuropsiquiatr**1980 Mar; 38(1):33-44.
61. GAMA, K. B. **Potencial terapêutico do meio condicionado obtido de cultura de células-tronco mesenquimais na dor neuropática experimental: uma análise comparativa**. 87 F. Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.