



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**



LUIZA CAROLINA FRANÇA OPRETZKA

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO E ANÁLISE
PATENTÁRIA DE LINHAGENS DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS E SUAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PARA A
DOR NEUROPÁTICA.**

SALVADOR – BA

2024

LUIZA CAROLINA FRANÇA OPRETZKA

Investigação do potencial terapêutico e análise patentária de linhagens de células-tronco mesenquimais e suas vesículas extracelulares para a dor neuropática.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Flora Villarreal

Salvador – BA

2024

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Opretzka, Luiza Carolina França.

Investigação do potencial terapêutico e análise patentária de linhagens de células-tronco mesenquimais e suas vesículas extracelulares para a dor neuropática / Luiza Carolina França Opretzka. - 2024.

202 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Flora Villarreal.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2024.

1. Dor. 2. Dor crônica - Tratamento. 3. Dor neuropática - Tratamento. 4. Terapia celular. 5. Células-tronco mesenquimais - Uso terapêutico. 6. Vesículas extracelulares - Uso terapêutico. I. Villarreal, Cristiane Flora. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 616.0472

CDU - 616.8



TERMO DE APROVAÇÃO

Luiza Carolina França Opretzka

“Investigação do potencial terapêutico e análise patentária de linhagens de células-tronco mesenquimais e suas vesículas extracelulares para a dor neuropática”

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Doutorado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmácia.

Aprovada em 29 fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Cristiane Flora Villarreal
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Dr. Luiz Fernando Ferrari
University of Utah - USA

Dr. Carlos Amílcar Parada
Universidade Estadual de Campinas

Dr^a. Simone Garcia Macambira
Universidade Federal da Bahia

Dr. Victor Diógenes Amaral da Silva
Universidade Federal da Bahia

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram enormemente e de diversas formas para que esse trabalho pudesse ser realizado. Os agradecimentos aqui não descrevem a minha profunda gratidão a todos.

A Deus, por me guiar e me fortalecer em todos os momentos, bons e ruins.

À minha família, por construir a base de quem sou e me lembrar que sou amada e cuidada em todos os momentos. À minha mãe e minha avó (*in memoriam*), por todas as noites maldormidas e pelas abdições para que eu pudesse realizar meus sonhos, por serem meu exemplo de vida e pelo amor incondicional dedicado. Ao meu irmão, Silvio, e aos meus tios, em especial, Emerson e Wellington, pelo apoio e carinho.

À professora Cristiane Villarreal, minha “Doktormutter”, que para mim sempre foi um exemplo de profissional e pessoa, muito obrigada pelos ensinamentos, pelo cuidado, pela amizade. Por me incentivar sempre e me acolher ou “puxar minha orelha” quando eu precisava. Sua orientação foi fundamental.

Ao meu parceiro de vida, pessoal e profissional, Breno Cardim, que foi a surpresa mais grata desse doutorado. Obrigada pela pessoa maravilhosa que você é, e pelo que faz por mim. Te amo!

Aos amigos, antigos e novos, que foram e são essenciais, cada um do seu jeito. Por me apoiarem, me ensinarem, me fazerem rir, não me deixarem surtar, meu muito obrigada! À Girlaine Café, que contribuiu diretamente para esse trabalho, obrigada pelo auxílio e pelas risadas. Cassinho, Flávia, Mavi, Gabi, Jaque, Pati, Afrânio, Alana, Thais, Dhara, Julia, Carine, Ivan, à família LETI/CIMATEC que me acolheu, me auxiliou e com a qual eu compartilhei risadas e resenhas que tornaram tudo mais leve. À família LAFTE, que é minha origem, especialmente à Maria Vitória, pela enorme ajuda nesse processo, e também Aurora, Alyne, Max, Anna, Karol, Sthe, Pedro e aos “LAFTEanos” raiz Renan e Leti, que são uma inspiração para mim. Aos meus “idosos” Bárbara, Carine, Rafa, e às “Phynas”, que me acompanham e me fazem rir há mais de 10 anos. À Luana, que conheceu tantas fases e me apoiou em tantos momentos.

À Dra. Milena Botelho e ao Dr. Ricardo Ribeiro (*in memoriam*), pelo suporte fornecido e por serem uma inspiração tão grande no mundo da pesquisa.

Aos maravilhosos profissionais da UFBA e IGM/Fiocruz que tanto auxiliaram em questões práticas e burocráticas, especialmente à Carolina Portela e ao Valdomiro Moitinho, que estão sempre dispostos a ajudar de todas as formas.

A todos que, mesmo não tendo sido citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho ou para que a vida se tornasse mais leve enquanto ele estava sendo realizado.

“Se vi mais longe, foi por estar sobre
ombros de gigantes.”

Sir Isaac Newton – 1675.

OPRETZKA, Luiza Carolina França. Investigação do potencial terapêutico e análise patentária de linhagens de células-tronco mesenquimais e suas vesículas extracelulares para a dor neuropática. 2024. 202 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2024.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A dor neuropática é uma síndrome de dor crônica que afeta significativamente a qualidade de vida dos pacientes, os quais se beneficiam pouco ou não respondem ao tratamento disponível. Essa lacuna terapêutica pode ser sanada com o uso de terapias regenerativas com células-tronco mesenquimais. **OBJETIVOS:** Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico de uma linhagem de célula-tronco mesenquimal humana (MSC), uma linhagem derivada de MSC superexpressando o fator inibidor de leucemia (MSC-LIF), e suas vesículas extracelulares (VE-MSC e VE-LIF) na dor neuropática experimental, explorar os mecanismos associados aos efeitos antinociceptivos de MSC e VE-MSC, e realizar uma análise das patentes publicadas protegendo derivados de células-tronco. **MÉTODOS:** MSC obtidas de um biobanco foram modificadas geneticamente para superexpressar LIF. Vesículas extracelulares foram isoladas por ultracentrifugação e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão, análise de rastreamento de nanopartículas e Dotblot. As citocinas liberadas por macrófagos estimulados *in vitro* e tratados com MSC, VE-MSC, MSC-LIF ou VE-LIF foram quantificadas por ELISA. Em camundongos submetidos ao modelo de dor neuropática induzida por ligadura parcial do nervo ciático foram avaliados o efeito antinociceptivo, por meio dos testes de Hargreaves e filamentos de von Frey, e a capacidade física em esteira ergométrica. Camundongos knockout para interleucina-10 (IL-10 KO) e ensaios de antagonismo farmacológico com um antagonista seletivo de CXCR2 (SB225002; 1 mg/kg, i.p.) foram utilizados para investigar os mecanismos de ação das MSC e VE-MSC. Foram realizadas análises de citocinas por ELISA e expressão gênica de PENK por RT-qPCR em secções de medula espinal (L4-L5) e os níveis séricos de CXCL1 foram analisados por ELISA. Adicionalmente, a prospecção patentária sobre produtos de terapia *cell-free* derivados de MSC foi realizada usando o DWPI como base de dados. **RESULTADOS:** Todos os tratamentos reduziram os níveis de TNF- α e elevaram os de IL-10 em macrófagos em cultura, indicando a possível aplicação na neuropatia sensorial. Uma única injeção de MSC (1×10^6), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$ partículas/mL), MSC-LIF (1×10^6) e VE-LIF ($2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^7$ partículas/mL) proporcionou o alívio completo e duradouro da

hipernocicepção térmica e a melhoria da capacidade física dos camundongos. O tratamento com MSC e VE-MSC aliviou completamente a hipernocicepção mecânica, que foi reduzida apenas transitória e parcialmente por MSC-LIF e VE-LIF. O tratamento com MSC e VE-MSC aumentou os níveis de IL-10 e PENK na medula dos camundongos e o seus efeitos antinociceptivos foram reduzidos em camundongos IL-10 KO. O tratamento agudo com SB225002 reverteu completamente antinocicepção mecânica e parcialmente o efeito antinociceptivo térmico das MSC e VE-MSC. Os níveis séricos de CXCL1, ligante de CXCR2, não apresentaram diferença entre os grupos experimentais 14 dias após o tratamento com MSC ou VE-MSC e estavam elevados apenas em animais neuropáticos ao final do tratamento. Em relação à busca de patentes, foram encontradas 150 famílias de patentes protegendo derivados de células-tronco mesenquimais, sendo a maior parte destas dedicada à proteção de vesículas extracelulares e exossomos. Houve um aumento exponencial destas patentes a partir de 2015. A China foi o país com o maior número de patentes aprovadas, seguida pelos Estados Unidos.

CONCLUSÃO: O perfil de efeito das células-tronco e vesículas extracelulares foi bastante similar, evidenciando que vesículas extracelulares são capazes de mediar o efeito das células-tronco mesenquimais, mesmo as oriundas de células geneticamente modificadas. Ainda, a melhora tanto de parâmetros nociceptivos, como funcionais, pelo tratamento com MSC e a VE-MSC reforça a proposta de aplicação futura destas terapias para o tratamento da dor neuropática. Apesar da modificação genética de MSC via superexpressão de LIF ter sido deletéria para o efeito antinociceptivo de MSC, este trabalho avançou na compreensão do mecanismo do efeito antinociceptivo das MSC na dor neuropática, o qual envolve o aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 é mantido pela ativação de receptores CXCR2. Por fim, a análise de patentes também indicou um interesse crescente na pesquisa e desenvolvimento de produtos de *terapia cell-free*. Desta forma, este trabalho corrobora o potencial da terapia livre de células com vesículas extracelulares de MSC e sua aplicação na dor neuropática.

Palavras-chave: Dor neuropática, células-tronco mesenquimais, vesículas extracelulares, fator inibidor de leucemia, interleucina-10, CXCR2.

OPRETZKA, Luiza Carolina França. Investigation of the therapeutic potential and patent analysis of mesenchymal stem cell lines and their extracellular vesicles for neuropathic pain. 2024. 202 f. Thesis (Doctorate in Pharmacy) – Federal University of Bahia, Salvador, 2024.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Neuropathic pain is a chronic pain syndrome that affects a significant proportion of the population and has devastating effects on patients' quality of life and work activity. Although there are therapeutic options, most patients benefit little or do not respond to treatment. Therefore, regenerative therapies with mesenchymal stem cells and their derivatives may help to fill this therapeutic gap. **AIM:** This study aimed to evaluate the therapeutic potential of a human mesenchymal stem cell line (MSC), an MSC-derived line overexpressing the leukemia inhibitory factor (MSC-LIF) and their extracellular vesicles (VE-MSC and VE-LIF) in a model of neuropathic pain. It also aimed to explore the mechanisms underlying MSC's and VE-MSC's antinociceptive effects. Additionally, we aimed to perform a patent mapping focusing on MSC's derivatives. **METHODS:** MSCs obtained from a biobank were genetically modified to overexpress LIF and characterized by flow cytometry and in vitro cell differentiation assays. The extracellular vesicles were isolated by ultracentrifugation and characterized by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, and Dotblot. Cytokines released by macrophages stimulated in vitro and treated with MSC, EV-MSC, MSC-LIF, or EV-LIF were quantified by ELISA. Using the model of neuropathic pain induced by partial ligation of the sciatic nerve in C57Bl/6 mice, the antinociceptive effect of all treatments was evaluated by Hargreaves and von Frey filaments tests. Gait function was assessed on a treadmill. Knockout mice for interleukin-10 (IL-10 KO) and pharmacological antagonism assays with a selective CXCR2 antagonist (SB225002; 1 mg/kg, i.p.) were used to investigate the mechanisms of action of MSC and EV-MSC. Sections of the spinal cord (L4-L5) and serum from mice were collected for gene expression analysis by RT-qPCR, cytokine and chemokine analysis by ELISA. Additionally, the DWPI database was used to retrieve the patents. **RESULTS:** Macrophages treated with MSC, EV-MSC, MSC-LIF, or EV-LIF showed reduced levels of TNF α , while IL-10 production was increased, indicating the possible application in sensory neuropathy. A single injection of MSC (1×10^6), EV-MSC ($7.45 \times 10^9 \pm 2.25 \times 10^8$ particles/mL), MSC-LIF (1×10^6) and EV-LIF ($2.47 \times 10^9 \pm 7.13 \times 10^7$ particles/mL) provided complete and long-lasting relief of thermal hypernociception and improvement of gait functional parameters. Treatment with MSC and VE-MSC also completely relieved the

mechanical hypernociception associated with neuropathy. Conversely, treatment with MSC-LIF and EV-LIF transiently and partially reduced the mechanical nociceptive behaviors of neuropathic mice. The participation of IL-10 in the therapeutical effect of MSC and EV-MSC was demonstrated since their antinociceptive effect was only partial in IL-10 KO mice compared to wild animals. In addition, IL-10 levels were elevated in the spinal cords of mice 14 days after treatment with MSC and EV-MSC but not at the end of the experimental period, or after treatment with MSC-LIF or VE-LIF. Preproenkephalin gene expression was regulated by MSC and VE-MSC. In addition, acute treatment with SB225002 partially reversed the thermal antinociceptive effect of MSC and EV-MSC, while this antagonist completely reversed mechanical antinociception. However, serum levels of CXCL1, a CXCR2 ligand, did not differ between the experimental groups 14 days after treatment with MSC or EV-MSC and were elevated only in neuropathic animals at the end of treatment. Regarding the patent search, 150 families of patents protecting mesenchymal stem cell's derivatives were found, most of which were dedicated to the protection of extracellular vesicles and exosomes. There was an exponential increase in these patents from 2015 onwards. China was the country with the highest number of approved patents, followed by the United States. **CONCLUSION:** The effect profile of stem cells and extracellular vesicles was quite similar, showing that extracellular vesicles can mediate the effect of mesenchymal stem cells, even those from genetically modified cells. In addition, the improvement of both nociceptive and functional parameters by treatment with MSC and EV-MSC reinforces the proposal for future application of these therapies for the treatment of neuropathic pain. Although the genetic modification of MSC via overexpression of LIF has been deleterious to the antinociceptive effect of MSC, this work has advanced the understanding of MSC's mechanism of action in neuropathic pain, which seems to involve increased production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and to be maintained by the activation of CXCR2 receptors. Finally, the patent analysis also indicated a growing interest in the research and development of cell-free therapy products. Thus, this work corroborates the potential of cell-free therapy with MSC extracellular vesicles and its application in neuropathic pain.

Keywords: Neuropathic pain, mesenchymal stem cells, extracellular vesicles, leukemia inhibitory factor, interleukin-10, CXCR2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Caracterização e quantificação das vesículas extracelulares derivadas de MSC por análise de rastreamento de nanopartículas.....	54
Figura 2 - Caracterização e quantificação das vesículas extracelulares derivadas de MSC por microscopia eletrônica de transmissão e Dotblot.	55
Figura 3 - Efeito da administração endovenosa de MSC ou VE-MSC sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos em modelo de dor neuropática.....	57
Figura 4 - Efeito da administração endovenosa de MSC ou VE-MSC sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de neuropatia diabética sensorial.....	58
Figura 5 – Tempo de permanência no rota-rod durante o período experimental no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático.....	59
Figura 6 – Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre o desempenho dos camundongos em esteira ergométrica no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático.....	60
Figura 7 – Produção de citocinas por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ em co-cultura com MSC.....	62
Figura 8 - Efeito das VE-MSC sobre a viabilidade celular de macrófagos J774 estimulados em cultura.....	63
Figura 9 – Efeito das VE-MSC sobre a produção de citocinas por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ	64
Figura 10 – Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos deficientes em IL-10 (IL-10 ^{-/-}) em modelo de dor neuropática.....	66
Figura 11 – Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos deficientes em IL-10 em modelo de neuropatia diabética sensorial.....	67
Figura 12 – Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre os níveis da citocina IL-10 na medula espinal de camundongos em modelo de dor neuropática.....	68
Figura 13 - Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre a expressão gênica de preproencefalina na medula espinal de camundongos.....	69
Figura 14 – Efeito do antagonista de CXCR2 (SB225002) sobre o efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC.....	71
Figura 15 – Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre os níveis séricos da citocina CXCL-1 em camundongos submetidos ao modelo de neuropatia.....	72

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical (MSC-WT) e células-tronco mesenquimais humanas superexpressando LIF (MSC-LIF).....	115
---	-----

Figura 2 - Cultura de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical (MSC-WT) e células-tronco mesenquimais humanas superexpressando LIF (MSC-LIF) em diferenciação em células das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica.....	116
Figura 3 - Caracterização e quantificação das vesículas extracelulares derivadas de MSC-LIF por análise de rastreamento de nanopartículas.....	117
Figura 4 - Caracterização e quantificação das vesículas extracelulares derivadas MSC-LIF por microscopia eletrônica de transmissão e Dotblot.	118
Figura 5 – Produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ em co-cultura com MSC-WT e MSC-LIF.	120
Figura 6 – Produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ em co-cultura com MSC-WT e MSC-LIF.....	121
Figura 7 - Efeito de vesículas extracelulares sobre a viabilidade celular de macrófagos J774 estimulados em cultura.....	122
Figura 8 – Efeito das vesículas extracelulares sobre a produção de citocinas por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ	123
Figura 9 - Efeito da administração endovenosa de MSC-LIF e VE-LIF sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de dor neuropática.....	125
Figura 10 - Efeito do transplante de MSC-LIF e VE-LIF sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de neuropatia dor neuropática.....	127
Figura 11 - Tempo de permanência no rota-rod durante o período experimental no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático.....	129
Figura 12 – Efeito do tratamento com MSC-LIF e VE-LIF sobre o desempenho dos camundongos em esteira ergométrica no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático.....	130
Figura 13. Efeito da administração endovenosa de MSC-LIF e VE-LIF sobre os níveis espinais de IL-10 em camundongos em modelo de dor neuropática.	131

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Evolução temporal (2006–2023) das patentes publicadas relacionadas a produtos terapêuticos derivados de MSC identificados no DPWI.....	160
Figura 2 – Tendências de publicação de patentes (A) e participação total (B) dos diferentes tipos de PTLC-CTM.....	161
Figura 3 – Distribuição geográfica dos principais países e organizações de propriedade intelectual onde foram publicadas patentes que protegem produtos terapêuticos livres de células derivadas de células-tronco mesenquimais.....	167
Figura 4 – Comparação das tendências de proteção de produtos livres de células derivadas do MSC entre os dois principais países em número de patentes.....	168
Figura 5 - Principais detentores de patentes e locais onde solicitaram o patenteamento...	168
Figura 6 – Principais organizações que depositaram patentes segmentadas por tipo de PTLC-CTM.....	171

Figura 7 – Distribuição dos produtos terapêuticos derivados das CTM entre os estudos clínicos registrados em *ClinicalTrials.gov*..... 172

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ADT	Antidepressivos tricíclicos
ANOVA	Análise de variância
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CCI	Lesão por constrição crônica
CXCL1	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>
CXCL2	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 2</i>
CXCL3	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 3</i>
CXCR2	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DRG	Gânglios da raiz dorsal
DWPI	<i>Derwent World Patents Index</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FGF-1	Fator de crescimento de fibroblasto
GNDF	Fator neurotrófico derivado da glia
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IFN- γ	Interferon gama
IGM/FIOCRUZ	Instituto Gonçalo Moniz/ Fundação Oswaldo Cruz

IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iPSCs	Células-tronco pluripotentes induzidas
IRSN	Inibidores da recaptção de serotonina-noradrenalina
LIF	Fator inibitório de leucemia
LPS	Lipopolissacarídeo
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
miRNA	Pequenas moléculas endógenas de ácido ribonucléico não codificantes
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MSC	Células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical
N	Normal
NGF	Fator de crescimento do nervo
nm	Nanômetro
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PENK	Preproencefalina
PTCA	Produto de terapia celular avançada

PTLC-CTM	Produtos terapêuticos livres de células derivados de células mesenquimais
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa
SBF	Soro bovino fetal
SNL	Ligadura do nervo espinhal
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	Fator de necrose <i>tumoral</i> α
T _{reg}	Células T regulatórias
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VE	Vesículas extracelulares
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
OBJETIVOS	40
OBJETIVO GERAL.....	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
1. CAPÍTULO 1.....	41
1.1. INTRODUÇÃO	41
1.2. MATERIAL E MÉTODOS	43
1.2.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
1.2.2. OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DE CORDÃO UMBILICAL	43
1.2.2.1. <i>Citometria de fluxo</i>	43
1.2.2.2. <i>Diferenciação in vitro</i>	44
1.2.3. ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSC (VE-MSC).....	45
1.2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS VE-MSC.....	46
1.2.4.1. <i>Análise de rastreamento de nanopartículas</i>	46
1.2.4.2. <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	46
1.2.4.3. <i>Dotblot</i>	46
1.2.5. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	47
1.2.6. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS ATIVADOS - ELISA (<i>ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>)	48
1.2.7. ANIMAIS	48
1.2.8. MODELO DE DOR NEUROPÁTICA POR LIGADURA DO NERVO ISQUIÁTICO	48
1.2.9. AVALIAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO: FILAMENTOS DE VON FREY.....	49
1.2.10. AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO: TESTE DE HARGREAVES.....	49
1.2.11. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA: TESTE DE ROTA-ROD.....	50
1.2.12. AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA PERCORRIDA EM ESTEIRA ERGOMÉTRICA.....	50
1.2.13. ENSAIOS DE ANTAGONISMO FARMACOLÓGICO.....	51
1.2.14. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM TECIDO - ELISA.....	51

1.2.15.	REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (RT-qPCR)	51
1.2.16.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
1.2.17.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	52
1.1.	RESULTADOS	54
1.1.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO.....	54
1.1.2.	EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM MSC E VE-MSC NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS.....	56
1.1.2.1.	<i>Limiar nociceptivo mecânico</i>	56
1.1.2.2.	<i>Limiar nociceptivo térmico</i>	57
1.1.2.3.	<i>Função motora</i>	59
1.1.2.4.	<i>Avaliação da capacidade física</i>	59
1.1.3.	INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO	61
1.1.3.1.	<i>Efeitos da co-cultura de macrófagos e MSC sobre o perfil de citocinas liberadas por macrófagos ativados</i>	61
1.1.3.2.	<i>Efeitos das VE-MSC sobre a viabilidade celular e perfil de citocinas liberadas por macrófagos</i>	63
1.1.3.3.	<i>Contribuição da citocina anti-inflamatória IL-10 para o efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC</i>	65
1.1.3.4.	<i>Efeito de MSC ou VE-MSC sobre os níveis de IL-10 na medula espinal durante a neuropatia</i>	68
1.1.3.5.	<i>Efeito de MSC ou VE-MSC sobre a expressão gênica de proencefalina na medula espinal durante a neuropatia</i>	69
1.1.3.6.	<i>Contribuição de receptores CXCR2 para o efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC</i> 70	
1.1.3.7.	<i>Efeito de MSC e VE-MSC sobre os níveis séricos de CXCL1 em camundongos com neuropatia experimental</i>	72
1.2.	DISCUSSÃO	73
1.3.	REFERÊNCIAS	84
2.	CAPÍTULO 2.....	102
2.1.	INTRODUÇÃO	102
2.2.	MATERIAL E MÉTODOS	105
2.2.1.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	105
2.2.2.	TRANSDUÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DE CORDÃO UMBILICAL	105
2.2.3.	CARACTERIZAÇÃO DAS MSC.....	105

2.2.3.1.	<i>Citometria de fluxo</i>	105
2.2.3.2.	<i>Diferenciação in vitro</i>	106
2.2.4.	ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSC 107	
2.2.5.	CARACTERIZAÇÃO DAS VE	108
2.2.5.1.	<i>Análise de rastreamento de nanopartículas</i>	108
2.2.5.2.	<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	108
2.2.5.3.	<i>Dotblot</i>	108
2.2.6.	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	109
2.2.7.	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS ATIVADOS - ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	110
2.2.8.	ANIMAIS	110
2.2.9.	MODELO DE DOR NEUROPÁTICA POR LIGADURA DO NERVO ISQUIÁTICO	110
2.2.10.	AVALIAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO: FILAMENTOS DE VON FREY	111
2.2.11.	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO: TESTE DE HARGREAVES	111
2.2.12.	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA NO TESTE DE ROTA-ROD	112
2.2.13.	AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA PERCORRIDA EM ESTEIRA ERGOMÉTRICA	112
2.2.14.	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM TECIDO - ELISA	112
2.2.15.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	113
2.2.16.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	113
2.3.	RESULTADOS	115
2.3.1.	CARACTERIZAÇÃO DE MSC-LIF	115
2.3.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSC-LIF	117
2.3.3.	POTENCIAL TERAPÊUTICO DE MSC-LIF E VE-LIF: ENSAIOS IN VITRO 119	
2.3.3.1.	<i>Efeitos da co-cultura de macrófagos com MSC-WT ou MSC-LIF sobre o perfil de citocinas liberadas por macrófagos estimulados</i>	119
2.3.3.2.	<i>Efeitos das vesículas extracelulares sobre a viabilidade celular e perfil de citocinas liberadas por macrófagos estimulados</i>	121
2.3.4.	POTENCIAL TERAPÊUTICO DE MSC-LIF E VE-LIF: ENSAIOS IN VIVO	123

2.3.4.1. <i>Efeito dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF sobre o limiar nociceptivo mecânico no modelo de dor neuropática</i>	124
2.3.4.2. <i>Efeito dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF sobre o limiar nociceptivo térmico no modelo de dor neuropática</i>	126
2.3.4.3. <i>Efeito dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF sobre a função motora de camundongos no modelo de dor neuropática</i>	128
2.3.4.4. <i>Efeitos dos tratamentos com MSC e VE-MSM sobre a capacidade física dos camundongos no modelo de neuropatia</i>	129
2.3.4.5. <i>Efeito dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF sobre a expressão de IL-10 na medula espinal de camundongos no modelo de neuropatia</i>	131
2.4. DISCUSSÃO	131
2.5. REFERÊNCIAS	137
3. CAPÍTULO 3	155
3.1. INTRODUÇÃO	155
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	157
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	159
3.3.1. <i>Evolução temporal das patentes de PTLC-CTM</i>	159
3.3.2. <i>A aplicabilidade das tecnologias baseadas em PTLC-CTM é ampla</i>	162
3.3.3. <i>Mercado de produtos terapêuticos livres de células derivados de células-tronco mesenquimais</i>	167
3.4. REFERÊNCIAS	174
CONCLUSÃO GERAL	177
REFERÊNCIAS GERAIS	178
APÊNDICE	189
PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO:	
PRÊMIAÇÕES	189
ARTIGOS PUBLICADOS	190
RESUMOS EXPANDIDOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS /	
APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSOS	201
PATENTES DEPOSITADAS	202

INTRODUÇÃO

Dor

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, que sinaliza a ocorrência de dano tecidual ou alerta para a possível ocorrência deste dano (RAJA et al., 2020). Do ponto de vista evolutivo, tanto a dor como a sua modulação se fizeram necessárias para a sobrevivência (ESCH; KREAM; STEFANO, 2020; JIANG et al., 2021; SINICA; VLACHOVÁ, 2021; WALTERS, 2023). A percepção e processamento dos estímulos dolorosos são influenciados em diferentes níveis por fatores biológicos, psicológicos e sociais, o que torna a dor uma experiência pessoal, complexa e multifatorial (ADAM; CHATELLIER; ALFONSI, 2024; RAJA et al., 2020).

Em relação a sua etiologia, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) classifica a dor como: 1) nociceptiva, quando é causada por danos reais ou potenciais ao tecido e está diretamente relacionada à ativação de nociceptores; 2) neuropática, quando é causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial; e 3) nociplástica, quando surge da nocicepção alterada apesar de não haver evidência de processos que levem à ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial causando a dor (IASP, 2021).

Apesar da característica adaptativa da dor, ela pode afetar negativamente o bem-estar físico, social e psicológico, especialmente quando se cronifica. A dor crônica pode ter várias definições, dentre elas: “a dor que persiste após o tempo normal de recuperação do tecido” (AGUIAR et al., 2021). Neste caso, a dor perde a função de alerta e prejudica a qualidade de vida do indivíduo (PANDELANI et al., 2023).

Dor crônica: características e epidemiologia

A dor crônica é uma condição que afeta uma significativa parcela da população e causa um impacto profundo em diversos aspectos da vida, incluindo o bem-estar físico, mental e social e a qualidade de vida como um todo (KERCKHOVE et al., 2021; PANDELANI et al., 2023; STOMPÓR et al., 2019; STUBHAUG et al., 2024). As consequências da dor crônica também repercutem sobre o trabalho e a capacidade funcional do indivíduo. O impacto financeiro causado pela dor crônica é percebido tanto pelo indivíduo com dor crônica, como pela sociedade (STUBHAUG et al., 2024), dado que os custos econômicos da dor crônica vão

além de medicamentos e internações, mas incluem a perda de produtividade, absenteísmo e aposentadoria precoce (BREIVIK; EISENBERG; O'BRIEN, 2013).

A prevalência da dor crônica pode variar significativamente podendo ser de 20% a 50%, a depender da população avaliada (AGUIAR et al., 2021; CHENAF et al., 2018; DAHLHAMER, 2018; HIGGINS et al., 2023; PANDELANI et al., 2023). No Brasil, uma revisão sistemática identificou uma prevalência média nacional de 45,59%, variando de 23,02 a 76,17% entre os estudos avaliados (AGUIAR et al., 2021). A dor crônica é mais prevalente no sexo feminino e na idade avançada (AGUIAR et al., 2021; HIGGINS et al., 2023; PANDELANI et al., 2023; STOMPÓR et al., 2019; ZIS et al., 2022). Entretanto, outras parcelas da população também são afetadas, como crianças e jovens que podem desenvolver problemas de saúde mental na idade adulta devido à dor crônica (LAMBARTH et al., 2023).

Frequentemente a dor crônica se apresenta como uma comorbidade relacionada a outras doenças/condições crônicas e em alguns casos apresenta uma prevalência até maior do que os sintomas cardinais dessas doenças/condições (VIDERMAN et al., 2023). Dentre as síndromes de dor crônica, a dor neuropática é altamente prevalente (AGUIAR et al., 2021; CHENAF et al., 2018; HIGGINS et al., 2023; STOMPÓR et al., 2019; TOTH; LANDER; WIEBE, 2009; ZIS et al., 2022). Diversos fatores ou doenças podem estar associadas à etiologia da dor neuropática, como ao câncer (PEREIRA et al., 2023) e a quimioterapia (JHENG et al., 2024; PEREIRA et al., 2023); a neuralgia pós-herpética (DWORKIN et al., 2008); o diabetes (STAEHELIN JENSEN, 2023); as infecções virais (DE FREITAS-SUAREZ et al., 2023; DWORKIN et al., 2008; HU et al., 2023; NIEMEYER et al., 2024); além de lesões como a lesão medular (HUNT et al., 2021), neuropatia pós-cirúrgica (ADAM; CHATELLIER; ALFONSI, 2024; TOGIOKA et al., 2023) e lesões traumáticas de nervos periféricos (MICLESCU et al., 2019).

Pacientes com neuropatias sensoriais podem apresentar sintomas como dor espontânea "tipo choque elétrico", uma resposta exacerbada a estímulos dolorosos (hiperalgesia), distúrbios sensoriais e parestesias, respostas dolorosas a estímulos não nocivos (alodinia) e, paradoxalmente, perda de sensibilidade (COLLOCA et al., 2017; SMITH, 2023). Além de sintomas dolorosos, outros sintomas e comorbidades, como cinesiofobia, dificuldade de marcha e redução da capacidade física, que comprometem de forma mais ampla a qualidade de vida (DE BRUIJN; GEERTZEN; DIJKSTRA, 2007; KARAYANNIS et al., 2017; STOMPÓR et al., 2019). A própria dor pode levar a adaptações motoras, que comprometem a capacidade de realização de uma atividade física ou até a completa evitação de atividades que desencadeiam respostas dolorosas (BEEBE et al., 2021; MERKLE; SLUKA; FREY-LAW, 2020). A

sintomatologia pode variar segundo a origem da neuropatia. A neuropatia periférica causada pela quimioterapia com oxaliplatina, por exemplo, se manifesta principalmente como uma alodínia induzida pelo frio (MØRCH et al., 2023). A neuropatia diabética, por outro lado, pode cursar com dor ou perda sensorial, parestesia, e comprometimento motor (STAEHELIN JENSEN, 2023).

Vias de transmissão e modulação da dor

Os estímulos nocivos são detectados por terminações nervosas livres especializadas de alto limiar, chamadas nociceptores, de neurônios de primeira ordem ou aferentes primários do tipo A δ e C (SHIMOJI; KUROKAWA, 2021). Nociceptores estão presentes em quase todos os órgãos e tecidos. De um modo geral, fibras A δ são fibras mielinizadas de médio diâmetro e estão relacionadas com a dor aguda bem localizada e rápida. Quatro classes de nociceptores foram descritas: mecânicos, térmicos, polimodais e silenciosos. A maioria dos nociceptores são polimodais, respondendo a estímulos nocivos de natureza mecânica, térmica (calor ou frio) e química (SHIMOJI; KUROKAWA, 2021). As fibras C, são não mielinizadas de pequeno diâmetro e transmitem dor mal localizada e mais tardia. Estas fibras nervosas inervam a pele, músculo, articulações e órgãos viscerais, possuem seus corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal ou em gânglios trigeminais, e após transduzirem o estímulo nociceptivo em potencial de ação, se projetam para o corno dorsal da medula espinal, onde realizam sinapse (BASBAUM et al., 2009; SHIMOJI; KUROKAWA, 2021). Os neurônios que recebem a informação sensorial nervosa dos neurônios periféricos são classificados como neurônios de segunda ordem e constituem parte das vias ascendentes de condução da dor, pois se projetam em direção a áreas supraespinhais onde o estímulo doloroso será processado e percebido, gerando a sensação dolorosa (BASBAUM et al., 2009; SHIMOJI; KUROKAWA, 2021). A vias ascendentes conduzem a informação dolorosa ao tronco encefálico e tálamo, alcançando em seguida estruturas corticais, como o córtex somatosensorial (associado às propriedades sensório-discriminativas da dor) e o giro cingulado anterior e córtex insular (associados a aspectos emocionais e afetivos da dor) (BASBAUM et al., 2009; DE RIDDER; ADHIA; VANNESTE, 2021; SHIMOJI; KUROKAWA, 2021). As vias ascendentes de transmissão da dor ativam também áreas de modulação endógena, que regulam a transmissão da informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinal por meio de vias descendentes inibitórias (BASBAUM et al., 2009; SHIMOJI; KUROKAWA, 2021).

Os mecanismos endógenos podem modular de forma positiva ou negativa a experiência dolorosa. A modulação que envolve mecanismos de supressão da dor é desencadeada pelas

próprias vias nociceptivas ascendentes, que ativam áreas encefálicas como a substância cinzenta periaquedutal, ativando vias neuronais que se projetam ao corno dorsal da medula onde inibem a transmissão do estímulo sensorial doloroso (DE RIDDER; ADHIA; VANNESTE, 2021; SHIMOJI; KUROKAWA, 2021). Outras áreas, como o bulbo rostral ventromedial (RVM – do inglês *rostral ventromedial medulla*) podem apresentar uma natureza inibitória, e reduzir a sinalização nociceptiva, ou facilitatória, ou seja, aumentar a transmissão nociceptiva. Numerosos fatores, incluindo estado emocional, atenção e memórias de experiências dolorosas passadas podem ativar sistemas descendentes de modulação alterando profundamente a experiência sensorial de dor (DE RIDDER; ADHIA; VANNESTE, 2021). Diversos mediadores e receptores estão envolvidos nas vias descendentes de modulação da dor, como opióides endógenos, noradrenalina, serotonina, ácido gama-aminobutírico, glicina e colecistoquinina (MILLAN, 2002).

O sistema opióide é o mais conhecido mecanismo de analgesia endógena. Os opióides, analgésicos exógenos ou endógenos, agem em receptores opióides amplamente distribuídos no corpo, estando presentes no aferente primário, medula espinal e encéfalo, reduzindo a percepção da dor. Sabe-se que os seus efeitos analgésicos se devem à capacidade de inibir diretamente a transmissão da informação nociceptiva do corno dorsal da medula espinal e de ativar vias descendentes de controle da dor (CORDER et al., 2018; MILLAN, 2002) (HOLLINGER, 2007).

A sinalização opioidérgica ocorre pela ativação dos receptores opioides μ , δ , κ e do receptor de nociceptina. Estes receptores interagem com os ligantes opioides endógenos β -endorfinas, encefalinas, dinorfinas e nociceptina/orfanina FQ. Estes ligantes são produzidos a partir de moléculas precursoras, como a proopiomelanocortina, prodinorfina e preproencefalina, e quebrados em transmissores peptídicos mais específicos amplamente expressos no sistema nervoso central (SNC), especialmente em vias da dor (CORDER et al., 2018).

Fisiopatologia da dor neuropática induzida por lesão periférica

As fibras nervosas periféricas, dada a sua localização anatômica, são propensas a serem danificadas por compressão, esmagamento ou transecção, o que resulta em lesões nervosas de diferentes graus de gravidade (GHEORGHE et al., 2022). Após a lesão dos nervos periféricos são ativados diversos mecanismos que podem ser tornar mal adaptativos e que resultar na gênese e manutenção da dor neuropática. Estes mecanismos têm sido extensamente estudados em modelos murinos, como os de lesão por constrição crônica (CCI, do inglês *chronic*

constriction injury) e de ligadura do nervo espinal (SNL, do inglês *spinal nerve ligation*) (COBOS; PORTILLO-SALIDO, 2013; KARIMI; ZAHRA; MARTIN, 2024).

Na periferia, a lesão neuronal desencadeia um processo de degeneração nervosa, neuroinflamação e sensibilização periférica. Alterações estruturais degenerativas nos axônios e bainha de mielina, além de redução da área e densidade das fibras não mielinizadas foram relatadas em neurônios periféricos durante a neuropatia, e contribuem para a sinalização defeituosa nos estados de dor neuropática (EVANGELISTA et al., 2018; LIU; VAN ROOIJEN; TRACEY, 2000). Em paralelo, a lesão nervosa causa alterações na expressão ou função de numerosos canais iônicos, levando à hiperexcitabilidade dos neurônios aferentes primários e a descargas ectópicas e espontâneas (RATTÉ; PRESCOTT, 2016), que estão intimamente associadas à manutenção e persistência de sinais de dor neuropática (YATZIV; DEVOR, 2019). A hiperexcitabilidade neuronal também pode ser mantida pelo brotamento de fibras simpáticas no gânglio da raiz dorsal, principalmente ao redor de fibras mielinizadas (CHUNG et al., 1996; JI et al., 2022; MCLACHLAN et al., 1993).

O estado instalado de hiperexcitabilidade persistente dos neurônios sensoriais periféricos após o dano nervoso pode levar à plasticidade sináptica central mal adaptativa (DAOU et al., 2016; PITCHER; HENRY, 2008). A nível espinal, a hiperexcitabilidade pode ser desencadeada por alterações nos neurônios aferentes secundários, diminuição da sinalização inibitória, pela ativação/aumento da reatividade glial e invasão de células imunes (ALLES; SMITH, 2018; COLLOCA et al., 2017; SMITH, 2023; WEST et al., 2015). Ainda, múltiplas alterações são observadas em áreas supraespinhais. A plasticidade cortical e subcortical mal adaptativa contribui para modificações na interpretação dolorosa dos sinais recebidos e na atuação dos mecanismos descendentes inibitório, o que em última instância, promovem um estado de dor crônica (ABY et al., 2022; CARLSON et al., 2007; TRAN et al., 2024; VERA-PORTOCARRERO et al., 2006; WEI et al., 2022).

Mecanismos neuroimunes envolvidos na fisiopatologia da dor neuropática induzida por lesão periférica

A neuroinflamação é um evento altamente complexo, com o envolvimento de diversos tipos celulares e mediadores, e que pode induzir e/ou reforçar os mecanismos acima citados. Esta resposta neuroinflamatória é intrinsecamente um mecanismo fisiológico de reparo, no entanto o perfil protetor ou mal adaptativo desse processo é influenciado pela resolução adequada tanto da fase inflamatória quanto da dor subsequente (FIORE et al., 2023).

Os mecanismos neuroimunes desencadeados pelo dano neuronal periférico são centrais para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (GRACE et al., 2014; SU et al., 2022). Apesar de o evento inicial ocorrer na periferia, alterações e modulação neuroimunes ocorrem também em nível espinal e supra espinal (ZHU et al., 2024), e evidências consideráveis indicam que a neuroinflamação promove sensibilização periférica e central que contribuem para a cronicidade da dor (FIORE et al., 2023).

O início destes eventos coincide com o início da degeneração walleriana e é marcado pela ativação de células residentes, como células de Schwann, fibroblastos, queratinócitos, células epiteliais no local da lesão, bem como pelo recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o local da lesão (SMITH, 2023). Em paralelo, macrófagos residentes e células gliais satélites dos gânglios da raiz dorsal também são ativados (SMITH, 2023).

A ativação dessas células leva à liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios e neurotróficos, como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator inibitório de leucemia (LIF), fator de crescimento do nervo (NGF) e quimiocinas (CHEN; DONNELLY; JI, 2020; FIORE et al., 2023; SMITH, 2023; SU et al., 2022). A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por células imunes residentes e recrutadas nesse contexto pode levar à disfunção mitocondrial, que também foi descrita como um processo chave na etiologia da dor (DOS SANTOS et al., 2021; FLATTERS; BENNETT, 2006).

Enquanto alguns destes mediadores estão relacionados com o recrutamento de células e amplificação da neuroinflamação, outros também estão envolvidos diretamente com a sensibilização do nervo periférico. TNF- α e IL-1 α/β são as primeiras citocinas produzidas pelas células de Schwann ao início da degeneração walleriana (SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002) e por macrófagos residentes (SANTA-CECÍLIA et al., 2019). O TNF- α tem um efeito autócrino sobre os macrófagos, que aumenta a síntese e liberação de mediadores e amplifica a resposta inflamatória (GANE; STOCKLEY; SAPEY, 2016). Concomitantemente, TNF- α e IL-1 β estão envolvidas com descargas ectópicas em neurônios sensoriais (GABAY et al., 2011; SORKIN et al., 1997), o que reflete o envolvimento direto com a ativação neuronal. Isso é corroborado por estudos nos quais animais saudáveis reproduziram sinais de dor neuropática após a injeção intraneural de TNF- α e IL-1 β no nervo ciático de ratos (ZELENKA; SCHÄFFERS; SOMMER, 2005) e pela grande quantidade de estudos que demonstra que a redução dos níveis dessas citocinas se correlaciona positivamente com a melhoria de sintomas dolorosos (DOS SANTOS et al., 2021; GABAY et al., 2011; HUNG; LIM; DOSHI, 2017). Além disso, outros mediadores inflamatórios, como bradicinina, serotonina, prostaglandina E₂,

histamina e outras quimiocinas podem aumentar a excitabilidade dos neurônios do gânglio da raiz dorsal, contribuindo para a dor neuropática (CHEN; DONNELLY; JI, 2020; SMITH, 2023; SU et al., 2022).

Diversas células imunes participam dessa resposta global à injúria nervosa periférica e podem contribuir tanto amplificando a dor neuropática como auxiliando na sua resolução, dentre as quais macrófagos, células T e neutrófilos merecem destaque (FIORE et al., 2023; GHEORGHE et al., 2022).

Macrófagos podem atuar diretamente no nervo lesado, migrando e se acumulando localmente, como também no gânglio da raiz dorsal e na medula espinal (LONDON; COHEN; SCHWARTZ, 2013; SILVA; GUIMARÃES; CUNHA, 2021). A ativação de receptores nestas células, principalmente por citocinas e quimiocinas, pode desencadear mudanças fenotípicas e de perfil secretório que irão definir se estas células contribuirão para a instalação ou resolução da dor neuropática (SILVA; GUIMARÃES; CUNHA, 2021; SU et al., 2022). Após diferentes estímulos, macrófagos podem se polarizar em duas principais categorias. Os macrófagos M1 estão envolvidos na resposta pró-inflamatória e produzem citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Macrófagos M2 apresentam um perfil anti-inflamatório e produzem moléculas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β , além de peptídeos opioides (CELIK et al., 2020; SU et al., 2022; YUNNA et al., 2020).

De forma similar, células T também podem apresentar papéis pró- ou antinociceptivos, que dependem de seus fenótipos e perfis secretórios (FIORE et al., 2023; GALVIN; C, 2021). Além disso, a ação dessas células também apresenta um padrão dimórfico em relação ao sexo (LOPES et al., 2017; SORGE et al., 2015). Linfócitos T podem produzir opioides endógenos que aliviam a hipersensibilidade na neuropatia periférica (LABUZ et al., 2010; XU et al., 2020) e células T regulatórias (T_{reg}) estão envolvidas na resolução da neuropatia periférica. Como exemplo, Davoli-Ferreira e colaboradores (2020) demonstraram que estas células reduzem a dor neuropática ao inibir células Th1 CD4⁺ e aumentar a sinalização por IL-10, além de indiretamente reduzir o dano neuronal e a neuroinflamação em gânglios sensoriais (DAVOLI-FERREIRA et al., 2020).

Subpopulações de neutrófilos também foram encontradas e podem ter papéis únicos na dor neuropática. Previamente foi descrito que neutrófilos podem causar efeitos hiperalgésico via produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6, prostaglandina E₂, espécies reativas de oxigênio e outros mediadores (BALOG; SONTI; ZIGMOND, 2023; CARREIRA et al., 2013). Por outro lado, neutrófilos também podem contribuir para a antinocicepção, via liberação de opioides endógenos (RITTNER et al., 2001; SCHEFF et al., 2019; SHI et al., 2023).

No SNC, tanto células imunes circulantes (descritas acima), quanto células imunes residentes, participam do estabelecimento e cronificação da dor neuropática. A micróglia, célula imune residente do SNC, é ativada por estímulos provenientes de neurônios periféricos, por quimiocinas oriundas de células imunes e neurônios, e pela ativação de receptores purinérgicos e *Toll-like* (POTTORF et al., 2022). A ativação da micróglia resulta na secreção de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal, o que se reflete em sensibilização central e no comportamento doloroso (SU et al., 2022). Por outro lado, a redução da ativação microglial (YAO et al., 2016; ZHOU et al., 2018) e a secreção de substâncias antinociceptivas pela micróglia pode reduzir a dor neuropática (MA et al., 2021).

Outras células gliais, como astrócitos e neuroglia, são consideradas imunocompetentes e secretam mediadores imunológicos após a sua ativação (SU et al., 2022). Assim como a micróglia, os astrócitos são ativados e se tornam reativos no contexto da dor neuropática (MIRANPURI et al., 2021). Eles regulam o estado pró-nociceptivo liberando uma série de mediadores como quimiocinas, proteases e fatores de crescimento, que estão associados ao início e à manutenção geral da dor neuropática (CHEN et al., 2014; CHENG; XU; MA, 2022).

Os eventos aqui descritos não esgotam todos os possíveis mecanismos que podem estar envolvidos com a instalação e manutenção da dor neuropática, já que a investigação da fisiopatologia dessa doença é uma área ainda em desenvolvimento. Entretanto, verifica-se que a fisiopatologia da dor neuropática envolve mecanismos intrincados, o que contribui para a complexidade do seu tratamento.

Tratamento da dor neuropática

Diversas terapias medicamentosas e não medicamentosas têm sido utilizadas no manejo da dor neuropática. Algumas terapias não medicamentosas incluem estimulação elétrica da medula espinhal (KISSOON et al., 2023), acupuntura (HOERDER et al., 2023; XIUMEI et al., 2023), aromaterapia (YOU; SHIN; SEOL, 2024), e bloqueio nervoso (XIUMEI et al., 2023). Já o tratamento medicamentoso atualmente utilizado para o controle da dor neuropática comumente envolve o uso de anticonvulsivantes, antidepressivos tricíclicos (ADT) e inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina (IRSN) (CHENAF et al., 2018; DI STEFANO et al., 2021).

Uma meta-análise conduzida pelo grupo de interesse especial em dor neuropática da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) apontou medicamentos antidepressivos, como os ADT e IRSN, pregabalina, gabapentina, e gabapentina/enacarbil XR como medicamentos de primeira linha para o tratamento da dor neuropática. Tramadol, adesivos de

lidocaína e de capsaicina foram considerados tratamentos de segunda linha, e os opioides fortes e a toxina botulínica A foram propostos como tratamentos de terceira linha (FINNERUP et al., 2015). Entretanto, estudos apontam para uma eficácia modesta dos tratamentos disponíveis e sugerem a necessidade de novas opções medicamentosas (DI STEFANO et al., 2021; FINNERUP et al., 2015).

De fato, o manejo terapêutico dos pacientes neuropáticos é bastante complexo em decorrência da resposta inadequada (FERREIRA et al., 2023; MEAADI et al., 2023; REINERT; VERONIN; MEDINA, 2023; STOMPÓR et al., 2019), com eficácia imprevisível, uma difícil titulação da dosagem, início tardio dos efeitos analgésicos e frequentes efeitos colaterais (DI STEFANO et al., 2021; DWORKIN et al., 2007; FINNERUP et al., 2015; MEAADI et al., 2023; REINERT; VERONIN; MEDINA, 2023; STOMPÓR et al., 2019).

Outro fator que limita o alívio apropriado da dor neuropática está relacionado às características intrínsecas das opções terapêuticas existentes, que agem apenas aliviando os sintomas associados à dor neuropática. Os processos fisiopatológicos subjacentes à manutenção da dor neuropática, como por exemplo alterações bioenergéticas ou estruturais da fibra, não modificados pelo tratamento disponível. Nesse sentido, o uso de terapias regenerativas, que agem restaurando tecidos danificados e/ou reestabelecendo homeostase do organismo, se apresenta como uma alternativa à terapia atual e com potencial de mudar o panorama previamente descrito.

Terapias regenerativas e produtos de terapia avançada

As terapias regenerativas, ou medicina regenerativa, envolvem uma área de pesquisa e desenvolvimento multidisciplinar com foco em explorar a renovação e reparo de tecidos e órgãos a partir da capacidade intrínseca do corpo de se reparar e substituir tecidos afetados por doenças e patógenos (VELIKIC et al., 2024). As áreas abrangidas pelas terapias regenerativas podem incluir a engenharia de tecidos e biomateriais, terapias celulares, terapias gênicas, ou mesmo uma combinação destas tecnologias (VELIKIC et al., 2024).

A medicina regenerativa é uma área em ampla expansão, entretanto relativamente nova do ponto de vista regulatório e de desenvolvimento de produtos, que usa como arcabouço terapêutico os “produtos de terapia avançadas”, definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) como uma “categoria especial de medicamentos novos que compreende o produto de terapia celular avançada, o produto de engenharia tecidual e o produto de terapia gênica”. Segundo esta classificação, as células-tronco se enquadram como “Produtos de terapia celular avançada” (PTCA) (Ministério da Saúde, 2023).

Apesar de várias estratégias poderem ser empregadas nas terapias regenerativas, o termo "regenerativo" é frequentemente associado ao uso de células-tronco, devido ao seu grande potencial de desenvolvimento e aplicação terapêutica (VELIKIC et al., 2024).

Terapia com células-tronco mesenquimais

As células-tronco são células não especializadas do corpo humano que possuem a capacidade de se auto-renovar e de diferenciar em outras linhagens celulares. De fato, a possibilidade de explorar esta habilidade singular estabeleceu as bases da medicina regenerativa (HAN et al., 2019; SUMAN et al., 2019a; WANG et al., 2020a). São comumente classificadas em função da sua origem como células-tronco embrionárias, células-tronco adultas/somáticas ou células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), e em função do seu potencial de diferenciação como toti-, pluri-, multi-, oligo- ou unipotentes. (CABAÑA-MUÑOZ et al., 2023; ZAKRZEWSKI et al., 2019).

Células totipotentes possuem o mais amplo espectro de diferenciação, sendo capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular do organismo, incluindo estruturas embrionárias e extra-embrionárias, como a placenta e o cordão umbilical. Esse tipo de célula-tronco é encontrado no zigoto, nos primeiros estágios após a fecundação (ZAKRZEWSKI et al., 2019). As células-tronco pluripotentes são capazes de formar células de todas as camadas germinativas do embrião. Nessa categoria estão incluídas as células-tronco embrionárias (fase de blástula) e as iPSC (ZAKRZEWSKI et al., 2019).

Células-tronco multipotentes e oligopotentes apresentam um potencial de diferenciação inferior às pluripotentes, mas ainda significativa capacidade de diferenciação em uma variedade de tipos celulares relacionados dentro de um folheto germinativo, tecido ou órgão específico (CABAÑA-MUÑOZ et al., 2023; ZAKRZEWSKI et al., 2019).

Células multipotentes incluem, por exemplo, as células-tronco mesenquimais, capazes de regenerar e diferenciar-se em tipos celulares derivados do mesoderma, e as células-tronco hematopoiéticas, que podem gerar diversos tipos de células sanguíneas. Após a diferenciação de uma célula-tronco multipotente, esta pode tornar-se uma célula oligopotente, cujas habilidades de diferenciação estão comprometidas com uma linhagem celular específica, a exemplo da célula-tronco mieloide que pode gerar leucócitos, mas não hemácias. Por fim, células-tronco unipotentes são capazes de se autorrenovar, mas produzem células diferenciadas tecido-específicas. (CABAÑA-MUÑOZ et al., 2023; TIAN et al., 2023; ZAKRZEWSKI et al., 2019).

O uso terapêutico de células-tronco tem se restringido às células-tronco adultas, devido às questões éticas envolvendo células-tronco embrionárias e a fatores que limitam o uso de células pluripotentes, sejam embrionárias ou iPSCs, como suas propriedades inerentes de tumorigenicidade e imunogenicidade (SUMAN et al., 2019a; YAMANAKA, 2020).

Historicamente, a célula-tronco adulta mais estudada é a célula-tronco hematopoética, que acreditava-se ser a única célula-tronco que funcionava no adulto até o início da década de 1990 (CAPLAN, 2015). Desde a sua primeira utilização, há mais de meio século, tem sido amplamente utilizada em transplantes alogênicos como uma das estratégias de tratamento mais bem sucedidas para leucemia, linfoma e outras neoplasias hematológicas (BERNARDI et al., 2024; SUMAN et al., 2019a). Entretanto reações imunes subsequentes ao transplante alogênico podem ocorrer, como o desenvolvimento da doença do enxerto contra hospedeiro, a qual está associada à morbidade e mortalidade do paciente (BERNARDI et al., 2024). Célula-tronco mesenquimais, por outro lado, tem se destacado por suas propriedades regenerativas e imunomodulatórias (DABROWSKA et al., 2021; YANG et al., 2023).

As células-tronco mesenquimais são células-tronco oriundas do mesênquima, um tecido embrionário da camada germinativa média, mesoderme, que dá origem ao tecido conjuntivo e a outros tecidos especializados. Este tipo celular foi identificado pela primeira vez por Alexander Friedenstein em 1966 (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966), seguido por Alexander Maximow em 1969 (WORTON; MCCULLOCH; TILL, 1969), que identificaram duas populações distintas de células enquanto estudavam células da medula óssea de camundongos. Em 2005, a Sociedade Internacional de Terapia Celular definiu critérios para a identificação de células-tronco mesenquimais. Características fenotípicas descritas por Friedenstein foram incorporadas e outras foram agregadas, a saber: (1) capacidade de aderência ao plástico em condições padrão de cultura; (2) expressar os marcadores de superfície característicos de células mesenquimais (CD105, CD73, CD90) e apresentar baixa expressão de marcadores hematopoiéticos (CD45, CD34, CD14, CD11b, entre outros); e (3) capacidade de se diferenciar em três tipos de células: osteoblastos, adipócitos e condroblastos em condições padrão *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

Notoriamente, além das características fenotípicas das células mesenquimais, foram descritas também diversas propriedades biológicas e terapêuticas que fundamentaram suas aplicações em diversos tipos de doenças degenerativas. Dentre estas propriedades podemos destacar os efeitos antiapoptóticos, neuroregeneradores, angiogênicos, e propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (HAN et al., 2019; LOTFY; ABOQUELLA; WANG, 2023; MONTOTO-MEIJIDE et al., 2023). Diversas pesquisas – tanto pré-clínicas, como clínicas –

demonstraram o potencial da terapia celular com células-tronco nas mais variadas condições patológicas, como por exemplo doenças cardíacas (ABOUZID et al., 2023; DALTRO et al., 2017; KRISHNA MOHAN et al., 2023), cardiomiopatia chagásica (SILVA et al., 2014, 2018), acidente vascular cerebral isquêmico (ZHANG et al., 2021), lesão da medula espinhal (MENDONÇA et al., 2014; MONTOTO-MEIJIDE et al., 2023), doença de Crohn (WANG et al., 2021), cirrose hepática (LU et al., 2023), esclerose múltipla (ISLAM et al., 2023), doença de Alzheimer (GE et al., 2018), e autismo (VILLARREAL-MARTÍNEZ et al., 2022).

Décadas de pesquisa embasaram a aprovação dos primeiros PTCA baseados em células-tronco mesenquimal de medula-óssea em 2011 (RAMEZANKHANI et al., 2020). Nos anos seguintes foram aprovados outros PTCA compostos por células-tronco mesenquimais, autólogas ou alógenas, derivadas de cordão umbilical, tecido adiposo, e mais frequentemente de medula óssea (RAMEZANKHANI et al., 2020). A entrada de PTCA baseados em células mesenquimais no mercado demonstra o poder translacional das terapias celulares baseadas em células-tronco e reforça a potencial aplicabilidade da terapia celular em outras doenças sem tratamento efetivo, como a neuropatia dolorosa.

Dentre a ampla gama de efeitos biológicos, os efeitos neuroregeneradores, anti-inflamatórios e imunomoduladoras das células mesenquimais conduziram à avaliação destes efeitos na dor neuropática em busca de um tratamento efetivo e capaz de modificar o curso da doença. O primeiro relato do efeito antinociceptivo das células mesenquimais na dor neuropática experimental foi de Musolino e colaboradores (MUSOLINO et al., 2007). Desde então, diversos grupos de pesquisa vêm somando evidências promissoras que têm corroborado o uso terapêutico das células mesenquimais no tratamento da dor neuropática (CHAKRAVARTHY et al., 2017; PADDA et al., 2021; WANG et al., 2020b).

Estudos do nosso grupo demonstraram o efeito antinociceptivo e neuroregenerador das células mesenquimais. O trabalho realizado por Evangelista e colaboradores demonstrou a que as alterações de hipersensibilidade na neuropatia diabética, a neuroinflamação espinal e alterações estruturais no nervo periférico foram mitigadas pelo tratamento endovenoso com células-tronco mesenquimais (EVANGELISTA et al., 2018). Camundongos que desenvolveram neuropatia induzida por quimioterápicos, após tratamento endovenoso com células mesenquimais, também apresentaram melhora na hipernocicepção térmica e mecânica, no balanço de citocinas pró- e anti-inflamatórias, diminuição do stress oxidativo no nervo periférico e na medula espinhal, e da atipia mitocondrial (DOS SANTOS et al., 2021; OLIVEIRA COSTA et al., 2014). Ainda, células-tronco mesenquimais murinas reverteram parâmetros nociceptivos térmicos e mecânicos em um modelo de neuropatia por ligadura do

nervo isquiático e modularam citocinas, aumentando as anti-inflamatórias e reduzindo pró-inflamatórias no nervo e na medula espinal (GAMA et al., 2018).

Trabalhos realizados por diversos outros grupos de pesquisa corroboraram estes achados, como o trabalho de Mannelli e colaboradores (2018), que avaliaram a injeção endovenosa de células mesenquimais de rato em um modelo de neuropatia induzida por oxaliplatina. Brini e colaboradores (2017) relataram um efeito duradouro de reversão da hipernocicepção térmica e mecânica por células mesenquimais na neuropatia diabética. A diminuição da hipersensibilidade mecânica, dos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e aumento de IL-10 na medula também foram observados, além de indução do restabelecimento do equilíbrio Th1/Th2, que foi deslocado para Th1 durante o diabetes (BRINI et al., 2017).

Uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos avaliou estudos cujos modelos experimentais focavam na dor neuropática induzida por lesão de nervo periférico (WANG et al., 2020b). Wang e cols. (2020b) pontuaram que a hipernocicepção associada à neuropatia dolorosa foi significativamente atenuada pelos transplantes de células mesenquimais, sem a observação de efeitos adversos, independentemente da grande heterogeneidade observada entre os estudos analisados em relação à espécie, modelos experimentais, vias de administração e regime de transplante.

Terapia com derivados de células-tronco mesenquimais

Além das propriedades terapêuticas intrínsecas das células mesenquimais, sua aplicação uso na medicina regenerativa tem se estendido para outras áreas da tecnologia. Uma nova abordagem tem sido utilizar as células mesenquimais como plataforma para obtenção de novos produtos e terapias que se adequem a objetivos específicos de alguns tratamentos. Um exemplo seria, a partir habilidade de diferenciação das células-tronco, utilizá-las ou diferenciá-las para a impressão 3D de tecidos de difícil regeneração (MESSAOUDI et al., 2021).

Apesar de teorias iniciais proporem que os efeitos regenerativos das células mesenquimais decorreriam da diferenciação e substituição celular, evidências têm indicado que seu efeito parácrino contribui primordialmente para o efeito terapêutico dessas células (BAGNO et al., 2022; VIZOSO et al., 2017). Acredita-se também que a capacidade de migrar para o foco da doença ou lesão devido a gradientes químicos, conhecida como “homing”, e secretar fatores parácrinamente, incluindo vesículas extracelulares (VE), e transferir mitocôndrias para células próximas sejam uma das bases dos efeitos terapêuticos das células mesenquimais (VIZOSO et al., 2017).

Essa habilidade de secretar substâncias bioativas, como uma “mini-bomba”, encorajou o uso da engenharia genética para produção de substâncias de interesse por células mesenquimais (SHELASH AL-HAWARY et al., 2023; ZHOU et al., 2023), e também o uso terapêutico das substâncias secretadas por elas, como seu secretoma ou vesículas extracelulares (EVANGELISTA; SOARES; VILLARREAL, 2019; LUO et al., 2024; POKROVSKAYA et al., 2020).

Bioengenharia de células-tronco mesenquimais

A engenharia genética é utilizada para manipular a expressão gênica de células-tronco de forma a aumentar ou diminuir a expressão de algum gene de interesse, ou ainda inserir algum gene para expressão (SHELASH AL-HAWARY et al., 2023; WYSE; DUNBAR; ROSSIGNOL, 2014). Tanto vetores virais e técnicas não virais pode ser utilizadas para esse propósito (DAMASCENO et al., 2020). Células-tronco têm sido geneticamente modificadas para atingir diversos objetivos, dentre eles, melhorar sua sobrevivência após o transplante, melhorar suas habilidades de homing, superexpressar fatores de interesse para a doença a ser tratada (DAMASCENO et al., 2020; SHAHROR et al., 2020; WYSE; DUNBAR; ROSSIGNOL, 2014; ZHOU et al., 2023) e assim aumentar a potência terapêutica das células mesenquimais. Ou também como plataformas de expressão e entrega de microRNA terapêuticos (SHELASH AL-HAWARY et al., 2023).

A engenharia genética de células mesenquimais tem sido utilizada com a finalidade de aprimorar seu efeito analgésico em síndromes de dor neuropática e neuroregenerador em lesões nervosas. Zhang e colaboradores (2020) construíram células mesenquimais superexpressando simultaneamente fator neurotrófico derivado do cérebro e fator neurotrófico derivado da glia para melhorar a regeneração do dano ao nervo ciático e de mostraram que as células superexpressando ambos os fatores neurotróficos apresentaram melhores resultados que as células mesenquimais selvagens (ZHANG et al., 2020).

Outra estratégia para o tratamento da dor neuropática envolveu a superexpressão do fator de crescimento de fibroblasto (FGF-1), que possui efeitos regenerativos e neurotróficos. Forouzanfar e colaboradores (2018) demonstraram que as células mesenquimais superexpressando FGF-1 atenuou a hipersensibilidade mecânica e térmica induzida, e reduziu as alterações estruturais de medula espinal de camundongos de forma mais eficaz que as células selvagens (FOROUZANFAR et al., 2018). Células-tronco mesenquimais superexpressando Sirtuína 1, uma proteína desacetilase envolvida na resposta celular a estressores inflamatórios, metabólicos e oxidativos, exibiram efeitos antinociceptivos superiores aos de células

mesenquimais selvagens e reduziram os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro e no corno dorsal da medula espinal de ratos neuropáticos (TIAN et al., 2021).

Desta forma, a modificação genética de células mesenquimais para superexpressar fatores que contribuam para analgesia ou neuroregeneração em estados de dor neuropática pode ser uma boa estratégia para otimizar as propriedades terapêuticas destas células.

Terapia livre de células: vesículas extracelulares

O conjunto de fatores/moléculas bioativas secretadas pelas células mesenquimais é denominado secretoma, e inclui proteínas solúveis, ácidos nucleicos livres, lipídios e vesículas extracelulares. O secretoma das células varia em função do tipo celular, das condições e estímulos ao qual a célula foi submetida, do estado fisiológico e da senescência (VIZOSO et al., 2017). Diversos estudos demonstraram que o uso do secretoma das células mesenquimais reproduz os efeitos da própria célula em diversos modelos experimentais (BOGATCHEVA; COLEMAN, 2019; SMOLINSKÁ; BOHÁČ; DANIŠOVIČ, 2023).

Esses estudos fundamentaram uma nova abordagem terapêutica livre de células (*cell free*) que utiliza não mais as células mesenquimais, mas seus derivados. Essa abordagem visa aproveitar os efeitos terapêuticos das células mesenquimais evitando algumas das desvantagens relacionadas à terapia com células. Algumas das vantagens da terapia *cell-free* incluem: 1) a redução das considerações de segurança intrínsecas à terapia com células, como compatibilidade imunológica, tumorigenicidade, formação de êmbolos e transmissão de infecções; 2) disponibilidade imediata para o tratamento, superando dificuldades logísticas do tratamento com células; 3) evita potenciais procedimentos invasivos relacionados à coleta de células; e 4) a produção industrial é possível por meio do estabelecimento de linhagens celulares específicas sob condições laboratoriais controladas, fornecendo uma fonte conveniente de fatores bioativos (VIZOSO et al., 2017).

Dentre as substâncias secretadas pelas células mesenquimais, encontram-se as vesículas extracelulares. As VE são partículas lipídicas delimitadas por membrana, que estão envolvidas com a sinalização intercelular (THÉRY et al., 2018; WELSH et al., 2024). Diferentes populações de VE foram descritas pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares, dentre as quais as subpopulações de maior relevância terapêutica são os exossomos e ectossomos/microvesículas. Exossomos são subtipo de VE pequenas, geralmente menor que 200 nm, oriundas do sistema endossomal e que são liberados através de corpos multivesiculares. O termo "ectossomo" ou "microvesícula" refere-se a vesículas oriundas do brotamento da

superfície celular e possuem tamanhos variados, inclusive se sobrepondo aos dos exossomos (WELSH et al., 2024).

Tem sido relatado que o conteúdo das vesículas extracelulares engloba diversas moléculas bioativas como enzimas, citocinas, mitocôndrias, e material genético – DNA, microRNA (miRNA), RNA mensageiro (mRNA) – inclusive mitocondrial (GAO et al., 2024; RAPOSO; STAHL, 2024; SANSONE et al., 2017; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Esse conteúdo também é dependente do tipo celular de origem das VE e da sua via de produção/liberação.

Algumas vantagens da aplicação terapêutica de VE em vez do secretoma têm sido apontadas. Nas vesículas extracelulares, as moléculas bioativas se encontram encapsuladas e protegidas da degradação (VIZOSO et al., 2017). Além disso, as VE também podem apresentar tropismo, que está relacionado ao seu padrão de expressão de moléculas de adesão (EDELDMANN; KIMA, 2022).

Dessa forma, o potencial do uso terapêutico de vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais tem sido cada vez mais explorado para diversas doenças, especialmente as que apresentam um componente degenerativo e/ou imune (DABROWSKA et al., 2021; HARRELL et al., 2019; LUO et al., 2024; MOCCHI et al., 2021; POKROVSKAYA et al., 2020), incluindo a dor neuropática (BRYK et al., 2022).

Estudos pré-clínicos e clínicos têm explorado o efeito das VE em diversos modelos de síndromes dolorosas como osteoartrite (RIZZO et al., 2023), síndrome da dor regional complexa (PAICIUS et al., 2023), dor inflamatória (HUA et al., 2022), lesão medular (WANG et al., 2024), e na dor neuropática.

Um dos primeiros trabalhos que relatou o efeito de VE em modelos de dor neuropática foi o de Shiue e colaboradores (2019), que realizaram uma injeção intratecal de VE no modelo de cirurgia de ligadura do nervo espinal L5/6. Foram observados efeitos preventivos e de reversão da hipernocicepção mecânica via infusão contínua dos exossomos, além da modulação de citocinas e fatores neurotróficos (SHIUE et al., 2019).

A administração intratecal de vesículas extracelulares de células mesenquimais oriundas de placenta humana reverte a hipernocicepção mecânica de camundongos em um modelo de lesão com nervo poupado (LU et al., 2022a). Dois estudos realizados por Gao e colaboradores (2023a, 2023b) demonstraram a reversão da hipernocicepção mecânica em camundongos induzidos à neuropatia pelo modelo de constrição crônica do nervo isquiático (GAO et al., 2023a, 2023b). A injeção intratecal das vesículas extracelulares reduz a ativação microglial *in vitro* (GAO et al., 2023b) e *in vivo* (GAO et al., 2023a, 2023b).

Estudos clínicos envolvendo vesículas extracelulares se multiplicaram nos últimos anos, focando principalmente no tratamento de Covid-19 (CHU et al., 2022; LIGHTNER et al., 2023; ZARRABI et al., 2023). Em relação à dor neuropática, um estudo intervencional foi cadastrado na plataforma *Clinicaltrials.gov* e foca no uso de exossomos na neuralgia craniofacial (NCT04202783). Estes estudos demonstram que a pesquisa com VE de células mesenquimais têm apresentado resultados robustos, capazes de gerar de fato uma nova terapia.

Outra aplicação interessante das VE que foi estudada, e que é particular da terapia *cell free*, foi a sua associação a outras tecnologias para gerar um produto que ser prontamente utilizado. Song e colaboradores (2023), por exemplo, criaram um sistema de microagulhamento que dispensa VE de células mesenquimais fundidas com lipossomos e carregadas com o analgésico ziconotida para promover sistema de liberação transdérmica de ziconotida (SONG et al., 2023). Outra combinação para dor neuropática envolveu a produção de uma estrutura tridimensional de alginato, ou “*scaffold*”, que foi implantada ao redor do nervo danificado para liberar lentamente as vesículas extracelulares de células mesenquimais do cordão umbilical humano (HSU et al., 2020).

Potencial de inovação e patentes

De fato, a terapia *cell free* apresenta um enorme potencial de inovação, seja pelo seu uso como produto terapêutico de forma isolada, seja em combinação com outras tecnologias, como evidenciado acima. Esse potencial desperta o interesse de indústrias, como a farmacêutica e cosmética, e de partes interessadas, ou “*stakeholders*”.

A exploração comercial de novas tecnologias normalmente está associada à proteção da propriedade intelectual, na forma de proteção patentária. A função da patente é resguardar a originalidade produto/processo patentado e garantir ao inventor os benefícios do investimento tecnológico, evitando que terceiros o reproduzam e diminuam seu potencial de mercado (SILVA et al., 2021). A concessão de patentes para novas invenções biológicas desempenha um papel crucial na promoção do avanço da ciência ao garantir temporariamente aos inventores o direito exclusivo sobre suas descobertas, e assim viabilizar a sustentabilidade comercial da indústria de biotecnologia (YEH; FERNANDEZ, 2004). As patentes, dessa forma, podem ser consideradas como uma medida das atividades de pesquisa e desenvolvimento e inovação. Elas também podem ser usadas para verificar o estado da arte e da técnica das tecnologias, estimar indiretamente o mercado atual e vislumbrar tendências futuras e linhas de pesquisa emergentes através do processo de mapeamento de patentes (MARCATO; NORONHA, 2013; TAKEDA et al., 2009).

O mapeamento de patentes é um processo multiestágio que estuda e analisa patentes existentes e documentos não patenteados para obter dados analíticos que ajudarão institutos de ensino/pesquisa e partes interessadas a impulsionar seus esforços em inovação tecnológica. Durante esses processos, é realizado o levantamento de patentes e a avaliação de uma determinada área do conhecimento, por meio de buscas em bases de dados. Além disso, técnicas e ferramentas de tratamento e análise de dados são utilizadas para recuperar informações estratégicas identificadas no estudo (AHARONSON; SCHILLING, 2016; SANTOS; ROCHA, 2021). Ao analisar patentes e suas informações relacionadas, pesquisadores e profissionais da indústria podem obter uma compreensão mais profunda da base de conhecimento existente, identificar os principais atores da inovação, avaliar a novidade e a singularidade de suas inovações, descobrir áreas potenciais para pesquisa e desenvolvimento e ter uma ideia sobre a possibilidade de patentear seu trabalho ou não (ONORATO et al., 2024). A análise da produção patentária, desta forma, pode agregar informações que não seriam encontradas na literatura científica, e direcionar os esforços de pesquisa para áreas mais propensas à inovação.

Levando em consideração o panorama exposto, esse trabalho foi delineado para abarcar três vertentes importantes no que tange a terapia celular com células mesenquimais e *cell free* com derivados de células mesenquimais: 1. A necessidade de se avaliar comparativamente o efeito das vesículas extracelulares de células mesenquimais com os de suas células de origem e de se ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos de ação envolvidos nesses efeitos; 2. Avaliar o potencial da engenharia genética na otimização dos efeitos de células mesenquimais e suas vesículas; e 3. Avaliar o cenário tecnológico atual em relação à terapia *cell free* com derivados de células mesenquimais. Dessa forma, esse trabalho foi dividido em três capítulos que visam abordar e aprofundar cada ponto separadamente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Investigar e comparar o potencial terapêutico de linhagens de células-tronco mesenquimais e suas vesículas extracelulares na dor neuropática experimental e avaliar o panorama patentário de produtos derivados de células-tronco mesenquimais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efeito de células mesenquimais e suas vesículas extracelulares sobre as alterações de sensibilidade de camundongos em um modelo de dor neuropática;
- Caracterizar o efeito de células mesenquimais e suas vesículas extracelulares sobre as alterações de capacidade física de camundongos em um modelo de dor neuropática;
- Comparar o efeito das células mesenquimais com o de suas vesículas extracelulares;
- Investigar os mecanismos de ação de células mesenquimais e suas vesículas extracelulares em um modelo de dor neuropática;
- Caracterizar o efeito de células mesenquimais superexpressando LIF e suas vesículas extracelulares sobre macrófagos J774 em cultura;
- Caracterizar o efeito de células mesenquimais superexpressando LIF e suas vesículas extracelulares sobre as alterações de sensibilidade de camundongos em um modelo de dor neuropática;
- Caracterizar o efeito de células mesenquimais superexpressando LIF e suas vesículas extracelulares sobre as alterações de capacidade física de camundongos em um modelo de dor neuropática;
- Comparar o efeito de células mesenquimais superexpressando LIF e suas vesículas extracelulares com o efeito de células mesenquimais selvagens e suas vesículas extracelulares;
- Realizar um mapeamento de patentes de produtos derivados de células mesenquimais.

1. CAPÍTULO 1

Células tronco mesenquimais de cordão umbilical e suas vesículas extracelulares na dor neuropática: efeitos antinociceptivos, funcionais e mecanismos associados

1.1. INTRODUÇÃO

A dor neuropática é uma síndrome dolorosa altamente incapacitante, cujos efeitos deletérios repercutem em vários aspectos da vida das pessoas que sofrem com esta condição (ADAM; CHATELLIER; ALFONSI, 2024). As opções de tratamento farmacológico disponíveis são frequentemente ineficazes, apresentam diversos efeitos indesejados e tem um impacto financeiro significativo ao longo da vida dos paciente (KOPSKY; KEPPEL HESSELINK; CASALE, 2015; STUBHAUG et al., 2024).

Pesquisas têm apontado para o potencial da terapia regenerativa com células-tronco como uma alternativa promissora para o alívio da dor neuropática (BRYK et al., 2022; CHAKRAVARTHY et al., 2017; JOSHI et al., 2021).

As células-tronco mesenquimais têm mostrado grande potencial em terapias regenerativas, em diferentes doenças e afecções, incluindo as do tecido nervoso. Seus efeitos terapêuticos podem decorrer da sua capacidade de migrar para locais lesados, enxertar e diferenciar-se em células funcionais, contribuindo assim para a reparação de tecidos danificados, mas sua ação modulatória sobre a função de diferentes células do hospedeiro tem sido considerada mais determinante para sua ação regenerativa (DABROWSKA et al., 2021; FAN et al., 2020; GALIPEAU, 2021). Esse fenômeno é particularmente importante, pois as células mesenquimais podem desempenhar um papel expressivo na regulação da resposta imunológica, ajudando a reduzir a inflamação e promovendo a regeneração tecidual (DABROWSKA et al., 2021; YANG et al., 2023). Essas propriedades têm feito das células-tronco mesenquimais uma opção relevante para o desenvolvimento de terapias inovadoras em medicina regenerativa (FAN et al., 2020)-

Os efeitos terapêuticos das células-tronco mesenquimais têm sido historicamente atribuído a dois fatores principais: à sua capacidade de substituir tecidos lesionados por meio da diferenciação em diversas linhagens celulares e à função imunomoduladora dessas células (FAN et al., 2020). Entretanto, uma ampla gama de estudos têm indicado que os efeitos terapêuticos das células-tronco mesenquimais são mais dependentes de sua função parácrina,

na qual as células-tronco mesenquimais liberam uma variedade de fatores tróficos solúveis, citocinas, fatores de crescimento, moléculas da matriz extracelular, e vesículas extracelulares (AGUIAR KOGA et al., 2023; SMOLINSKA et al., 2023; SMOLINSKÁ; BOHÁČ; DANIŠOVIČ, 2023; SUMAN et al., 2019b). O consenso de que o efeito parácrino das células-tronco, mais do que a diferenciação celular, é primordial para seus efeitos terapêuticos, levou à perspectiva de uma nova abordagem terapêutica: a terapia livre de células (*cell-free*). Nesse sentido, as células-tronco mesenquimais poderiam ser utilizadas como fonte de moléculas terapêuticas e não como agente terapêutico propriamente dito (EVANGELISTA; SOARES; VILLARREAL, 2019). Partindo desta perspectiva, estudos explorando produtos derivados de células-tronco mesenquimais, o secretoma e vesículas extracelulares, têm sido realizados com o objetivo de validar os benefícios terapêuticos da abordagem *cell-free*. Uma das primeiras abordagens utilizadas para explorar o secretoma das células mesenquimais foi o uso de meio condicionado (BOGATCHEVA; COLEMAN, 2019; SMOLINSKÁ; BOHÁČ; DANIŠOVIČ, 2023). Efeitos benéficos do tratamento com meio condicionado já foram descritos em modelos de dor neuropática (BRINI et al., 2017; GAMA et al., 2018).

Mais recentemente, as VE derivadas de células mesenquimais têm figurado como uma alternativa terapêutica para a terapia *cell-free* (AGUIAR KOGA et al., 2023; GUO et al., 2021; KESHTKAR; AZARPIRA; GHahremani, 2018). Vesículas extracelulares são um grupo heterogêneo de estruturas delimitadas por membrana de tamanho nano ou micrométrico que são liberadas por diferentes tipos de células e atuam na comunicação entre células. Estas partículas carregam moléculas biologicamente ativas de suas células de origem parentais e são capazes de transferir seu conteúdo para as células-alvo modulando sua função. Segundo o tamanho e origem, as vesículas extracelulares são classificadas em exossomos ou microvesículas. Exossomos apresentam um tamanho de no máximo 200 nm e são secretadas por exocitose, enquanto ectossomos/microvesículas apresentam tamanhos variáveis até 1000 nm e são formadas por um processo de brotamento da membrana plasmática (BRYK et al., 2022; WELSH et al., 2024; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

A abordagem *cell-free* para o controle da dor neuropática é uma área de pesquisa recente que tem sido objeto de estudo por diferentes grupos de pesquisa visando encontrar uma estratégia inovadora que evite as limitações inerentes ao transplante celular (EVANGELISTA; SOARES; VILLARREAL, 2019). Até o momento, poucos estudos exploraram o potencial terapêutico das vesículas extracelulares na dor neuropática (GAO et al., 2023b; KALVALA et al., 2023; LU et al., 2022b; SHIUE et al., 2019). Também se faz necessário compreender melhor os mecanismos pelos quais estas vesículas atuam e como estes se comparam aos de suas células

de origem. Assim, estudos ainda são necessários para validar o potencial terapêutico da terapia *cell-free* na dor neuropática, assim como para caracterizar os mecanismos envolvidos nos seus efeitos.

Desta forma, no presente trabalho foram avaliados comparativamente os efeitos e mecanismo associados aos efeitos de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical e de suas vesículas extracelulares no modelo de dor neuropática por ligadura do nervo isquiático.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos envolvendo materiais derivados de humanos foram aprovados e seguiram as diretrizes do Comitê Institucional de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ 519.235). Os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – IGM/FIOCRUZ (020/2022) e realizados conforme as recomendações da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2023).

1.2.2. OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DE CORDÃO UMBILICAL

As células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical (MSC) utilizadas neste projeto foram gentilmente cedidas pela Dra. Rosália Mendes Otero a partir do biorrepositório do projeto “Otimização da Produção de Embriões *in vitro* Utilizando Co-Culturas de Células-Tronco Mesenquimais” (CAAE: 22734213.0.3001.5275). Os protocolos de obtenção dessas células foram descritos por BODART-SANTOS et al. (2019). As MSC foram caracterizadas por citometria de fluxo, para avaliação de marcadores relacionados a células mesenquimais, e pela sua capacidade de diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, como recomendado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (DOMINICI et al., 2006).

1.2.2.1. Citometria de fluxo

A caracterização das MSC também foi realizada pela identificação de marcadores de superfície utilizando o kit de marcação (Human MSC Analysis Kit, BD Biosciences) que inclui o painel proposto pelo ISCT (DOMINICI et al., 2006), de acordo com as recomendações do

fabricante. MSC na 10ª passagem, foram tripsinizadas e a suspensão celular foi lavada 2 vezes com PBS 1x. Um total de 5×10^6 células foram incubada a 4°C por 30 minutos: 1. Coquetel positivo: Coquetel para identificar positivamente MSC contendo CD90 (Clone: 5E10), CD105 (Clone: 266), CD73 (Clone: AD2); ou 2. Coquetel negativo: Coquetel para identificar potenciais contaminantes contendo CD34 (Clone:581), CD11b (Clone: ICRF44), CD19 (Clone: HIB19), CD45 (Clone: HI30), HLA-DR (Clone: G46-6); ou 3. Anticorpos para compensação: CD90, CD105, CD73 e CD44. Após incubação, foram realizadas mais duas lavagens com PBS 1x e, em seguida, realizada a aquisição dos dados e análise no citômetro de fluxo BD LRS Fortessa (BD Biosciences). Pelo menos 50.000 eventos foram coletados e analisados.

1.2.2.2. Diferenciação in vitro

A capacidade de diferenciação das MSC na décima passagem em adipócitos, condrócitos e osteócitos, foi investigada com a utilização de meio suplementado com fatores indutores de diferenciação, como previamente descrito (EVANGELISTA, 2019).

Para a diferenciação adipogênica, MSC foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo (1×10^4 células/poço). Após atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e substituído por meio de indução adipogênica StemPro Adipogenesis Differentiation Kit (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado com meio completo. Para observar a deposição de gordura, após quinze dias em cultivo, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. Em seguida, foram coradas com solução de Oil red por 5 minutos e em seguidas lavadas com álcool 70%. As imagens foram capturadas por microscópio AX70 (OLYMPUS) utilizando o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

Para a diferenciação condrogênica, MSC foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo (10^5 células/poço). Após atingirem 40-50% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas, durante 21 dias, com meio de diferenciação condrogênica Stem Pro Chondrogenesis Differentiation Kit (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo. Para avaliação da síntese de proteoglicanos, as células foram fixadas com

paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com solução de Alcian Blue (GIBCO) em HCl 0,1N por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com solução de HCl 0,1N e, em seguida, foi adicionada água destilada para a neutralização da acidez. As imagens das células diferenciadas em condrócitos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

Para diferenciação osteogênica, 5×10^5 MSC foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo. Ao atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas por até 14 dias, com meio de diferenciação osteogênica Stem Pro Osteogenesis Differentiation Kit (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada em microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo. A deposição de cálcio foi observada pela coloração com vermelho de Alizarina 2%. Após fixação em paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavagem com água destilada, as células foram coradas com solução de vermelho de Alizarina 2% por 3 minutos e, em seguida, foram realizadas duas lavagens com água destilada. As imagens das células diferenciadas em osteoblastos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

1.2.3. ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSC (VE-MSC)

MSC entre a 10^a e 12^a passagem com confluência de 90% foram lavadas com solução salina estéril e cultivadas por 48 horas em meio DMEM sem soro. O sobrenadante foi coletado e submetido a centrifugações diferenciais para o isolamento das VE. Inicialmente, realizou-se uma centrifugação a 700 x g por 5 minutos a 8°C para eliminar o debrí celular, seguida de uma centrifugação a 4.000 x g por 20 minutos a 4°C. Após a realização de duas centrifugações diferenciais, o sobrenadante obtido foi ultracentrifugado a 100.000 x g por 1h20m a 4°C, utilizando uma ultracentrífuga Optima XE-100, rotor SW32.1 (Beckman Coulter). Após a ultracentrifugação para a sedimentação das VE-MSC, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de vesículas ressuspendido em solução salina. Foram adicionados 100 µL de PBS, seguido da agitação vigorosa em vórtex, o procedimento foi repetido 3 vezes para máxima recuperação das VE-MSC. O material obtido foi armazenado em ultrafreezer -80°C até posterior utilização (EVANGELISTA, 2019).

1.2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS VE-MSC

As VE-MSC foram caracterizadas seguindo as recomendações da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (THÉRY et al., 2018). A análise de rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle tracking analysis* - NTA) foi utilizada para obter informações sobre tamanho e concentração das VE-MSC. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) informou acerca do tamanho e morfologia das vesículas. Marcadores de superfície foram caracterizados por Dotblot. O detalhamento de cada metodologia encontra-se abaixo.

1.2.4.1. Análise de rastreamento de nanopartículas

A análise de rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle tracking analysis* - NTA) é um método de quantificação direta de partículas em suspensão que se baseia nas propriedades de dispersão da luz e no movimento browniano das partículas. As amostras de VE-MSC foram analisadas no equipamento Nanosight modelo NS300 (Malvern Panalytical, Reino Unido), equipado com um compartimento de amostras e um laser de 532 nm. Inicialmente, as vesículas foram diluídas (1:50) em água ultrapura e injetadas no compartimento de amostras com o auxílio de um injetor automático. O software utilizado para a captura e análise dos dados foi a NTA 3.4 Build 3.4.4. Para a determinação da média de tamanho de partícula e concentração da amostra (partículas/mL), as partículas foram injetadas em fluxo contínuo e analisadas a partir das gravações de 5 registros com 30 segundos cada.

1.2.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Informações sobre a morfologia e tamanho das vesículas extracelulares foram obtidas por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Vinte microlitros de amostras de VE-MSC foram aplicados em uma grade de cobre revestida com carbono/formvar e mantidos por 5 min para adsorção. A amostra não adsorvida foi removida com auxílio de papel filtro e em seguida foi contrastada com 10 µL citrato de uranila aquoso a 2% por 30 segundos. O excesso foi removido novamente com de papel filtro e a grade foi reservada por 24h para secar ao ar. As amostras foram observadas em microscópio JEOL 1230 (JEOL, Tóquio, Japão) a 80 kV, como descrito previamente, com adaptações (EVANGELISTA, 2019).

1.2.4.3. Dotblot

A caracterização da composição proteica foi realizada por Dotblot utilizando marcadores enriquecidos em VE, como descrito previamente, com adaptações (TAVAKKOLI

et al., 2020). A presença de proteínas transmembrana ou ancoradas a glicosilfosfatidilinosito associadas à membrana plasmática (CD9 e CD81) e de proteínas citosólicas recuperadas em vesículas extracelulares (TSG101) foi avaliada, como recomendado pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (THÉRY et al., 2018). Para execução da análise por Dotblot, 50 µL das amostras foram adicionadas a uma membrana de nitrocelulose com tamanho de poro de 0,45 µm (BioRad, CA, Estados Unidos). Após a secagem completa das amostras, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado a 5%. A membrana foi incubada com anticorpos monoclonais primários CD9 anti-humano (1:1000; Invitrogen, MA, Estados Unidos), CD81 anti-humano (1:1000; Invitrogen) ou TSG101 anti-humano (1:1000; Invitrogen), durante a noite a 4 °C. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com Tris adicionada de 0,1% de Tween-20 e incubadas com o anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo conjugada com HRP (Santa Cruz, TX, Estados Unidos) por 1 hora em temperatura ambiente com balanço suave. Após a lavagem, a detecção foi realizada por quimioluminescência utilizando o substrato Clarity Western ECL Substrate (BioRad) de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram capturadas com um fotodocumentador iBright 1500 (Thermo Fisher).

1.2.5. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Uma possível citotoxicidade das VE-MSC sobre os macrófagos murinos da linhagem J774 estimulados com LPS e IFN- γ foi investigada no ensaio de Alamar Blue, como descrito previamente (LINS et al., 2022). Os macrófagos foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, Waltham, MA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; GIBCO) e 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (GIBCO). Após a dissociação enzimática das células utilizando tripsina (GIBCO), os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços (2 x 10⁵ células/poço), e incubados por 2h a 37 °C e 5% CO₂. Após esse tempo, as células foram estimuladas com LPS (500 ng/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e IFN- γ (5 ng/ml; Sigma) e as VE-MSC foram adicionadas em concentrações seriadas (200 µg/mL – 6,25 µg/mL) em triplicata e incubadas por 24h. Posteriormente, 20 µL de Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi adicionado a cada poço e as amostras foram incubadas por 4h a 6h. Leituras colorimétricas foram realizadas a 570 e 600 nm. Tween 20 (Thermo Scientific) a 20% foi utilizado como controle positivo.

1.2.6. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS ATIVADOS - ELISA (*ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

Para a determinação dos níveis citocinas, células J774 foram plaqueadas em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 100 U/ml de penicilina-estreptomicina durante 2h a 37 °C e 5% CO₂. As células foram então estimuladas com LPS (500 ng/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e IFN- γ (5 ng/ml; Sigma) na presença das VE-MSc, veículo ou dexametasona (droga de referência no teste – 20 μ M) e incubadas a 37 °C. O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas sendo então mantido a -80 °C até o momento do ensaio. Os níveis das citocinas TNF- α , IL1- β , e IL-10 foram estimados utilizando kits de imunoenensaio ELISA para camundongos (R&D SYSTEM, Minneapolis, MN, USA) para cada citocina, como previamente descrito (GAMA et al., 2018).

1.2.7. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, provenientes do Biotério do IGM, FIOCRUZ – BA pesando entre 20 e 28 gramas, com idade entre 40 e 90 dias. Animais *knock-out* para a citocina IL-10 (IL-10^{-/-}) também foram provenientes do Biotério do IGM, FIOCRUZ – BA pesando entre 20 e 28 gramas, com idade entre 40 e 60 dias. Todos os animais foram mantidos em sala climatizada sem restrição hídrica ou alimentar durante todo o período experimental. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – IGM/FIOCRUZ (020/2022) e realizados conforme as recomendações da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (IASP, 2023). Todos os testes comportamentais foram realizados entre 07:00 e 16:00 horas.

1.2.8. MODELO DE DOR NEUROPÁTICA POR LIGADURA DO NERVO ISQUIÁTICO

O modelo de dor neuropática por ligadura parcial do nervo ciático (LPN) foi adaptado de (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990), como descrito por LAURIA et al. (2024). Os camundongos foram submetidos a anestesia com cetamina (100 mg/kg; Syntec, SP, Brazil) e xilazina (10 mg/kg, Syntec) por via intraperitoneal. Foi realizada a depilação do local da incisão seguida de antissepsia com álcool 70%. O membro posterior direito foi depilado e desinfetado com etanol 70%. Uma pequena incisão na pele foi realizada para promover a exposição do músculo bíceps femoral. As fibras musculares foram afastadas para cuidadosamente expor o nervo ciático, que foi então transfixado e ligado com um fio de sutura de polipropileno 7-0 (Shalon Fios Cirúrgicos, São Luís de Montes Belos - GO), contraindo 1/3 a 1/2 do diâmetro do

nervo. Em seguida, a pele foi suturada fio de polipropileno 6-0 (Shalon®) e os camundongos foram acomodados em caixas aquecidas e monitorados até a recuperação completa da anestesia. No grupo sham (falsa ligadura), o nervo foi exposto sem constrição.

1.2.9. AVALIAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO: FILAMENTOS DE VON FREY

O limiar de resposta ao estímulo mecânico foi mensurado utilizando filamentos de von Frey pelo método *up-and-down* (CHAPLAN et al., 1994). Estes filamentos consistem em segmentos de fio de nylon cuja rigidez à tensão é previamente determinada em gramas pelo fabricante (Stoelting, Chigaco, EUA). Os animais foram postos em caixas de acrílico transparentes, com fundo em tela de arame galvanizado, elevadas sobre um espelho de modo a permitir o acesso à superfície plantar e visualização da resposta do animal. Os animais permaneceram na caixa para adaptação por um período de trinta minutos. A pata foi tocada verticalmente com um de uma série dos filamentos, considerando um total de seis respostas consecutivas, tendo início quando o animal inverte o comportamento não responsivo (negativo) por um comportamento responsivo (positivo). Considerou-se como resposta positiva a retirada brusca da pata testada. A série foi interrompida quando o animal exibiu resposta positiva. As medidas foram realizadas tendo como princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo de filamento inferior, enquanto uma resposta negativa é seguida de um estímulo com filamento superior. O limiar é estimado considerando: o valor em logaritmo da força proporcional ao último filamento (X_f), o valor equivalente ao padrão de respostas positivas e negativas (k), e a média da diferença entre os estímulos em unidades logarítmicas (δ), conforme fórmula abaixo. O limiar assim calculado representa 50% do limiar nociceptivo em gramas, ou seja, a força em que o camundongo responde em 50% das apresentações.

$$50\% \textit{ gramas Limiar} = \frac{10^{(X \cdot f + k \cdot \delta)}}{10.000}$$

1.2.10. AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO: TESTE DE HARGREAVES

Com o objetivo de avaliar o limiar de resposta ao estímulo térmico foi realizado o teste plantar em aparelho Hargreaves (Ugo Basile, Varese, Itália), como descrito previamente (HARGREAVES et al., 1988). Para isso, os animais foram alocados em compartimentos individuais de acrílico e posicionados sobre uma superfície de vidro especial que permite a

passagem homogênea da luz e do calor, durante cinco minutos para adaptação ao ambiente. Após esse período, uma fonte de luz infravermelha foi posicionada sob uma das patas traseiras do animal, enquanto um cronômetro eletrônico foi acionado. Quando o animal exibe resposta positiva (*flinch* ou retirada da pata) a fonte de luz e o relógio param automaticamente. Um tempo de corte de 20 segundos foi utilizado para evitar danos teciduais. Em cada animal foram realizadas três medidas de latência de retirada da pata, com um intervalo de 5 a 10 minutos entre elas e o resultado foi expresso como a média das três leituras em segundos.

1.2.11. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA: TESTE DE ROTA-ROD

O desempenho no teste de rota-rod foi avaliado, como previamente descrito (GAMA et al., 2018), para avaliar a capacidade motora dos animais. O aparelho de rota-rod (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) é composto por uma barra cilíndrica com um diâmetro de 3 cm, subdividida em cinco compartimentos, e que gira à velocidade constante de 6 rpm. Para manter-se no cilindro o animal necessita se locomover, sendo a capacidade alterada de permanência no aparelho indicativo de prejuízos motores ou neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade. Os animais foram acompanhados em dias alternados durante o período experimental, e foi anotado o tempo de permanência na barra em três tentativas de no máximo 120 segundos. Os resultados foram expressos em média do tempo em segundos de permanência dos animais no rota-rod.

1.2.12. AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA PERCORRIDA EM ESTEIRA ERGOMÉTRICA

A distância percorrida em esteira ergométrica foi utilizada como medida funcional da capacidade física dos camundongos, como descrito por MINAMI et al. (2018), com modificações. O teste foi realizado em uma câmara com esteira ergométrica para um animal (LE 8700; Panlab, Barcelona, Espanha). A velocidade da esteira e a intensidade do choque (mA) foram controladas por um potenciômetro (LE 8700 controle da esteira, Panlab). A velocidade inicial foi de 12 cm/s, com incremento de mais 6 cm/s a cada 5 minutos. O teste foi finalizado quando o animal atingiu a exaustão e permaneceu por um período de 10 segundos na grade de aço inoxidável eletrificada que serve como estímulo para que o animal realize a atividade. Os parâmetros avaliados foram a distância percorrida e tempo total de exercício.

1.2.13. ENSAIOS DE ANTAGONISMO FARMACOLÓGICO

Para avaliar um possível mecanismo pelo qual as MSC e VE-MSC promovem antinocicepção, foram realizados ensaios de antagonismo farmacológico utilizando como parâmetros os limiares nociceptivos mecânico e térmico, avaliados nos testes dos filamentos de von Frey e Hargreaves, respectivamente. Após o tratamento com MSC ou VE-MSC e no tempo de efeito antinociceptivo máximo, os animais foram tratados com SB225002, um antagonista do receptor CXCR2, na dose de 1 mg/kg, por via intraperitoneal (MANJAVACHI et al., 2010). Após a administração o efeito agudo do antagonista farmacológico foi avaliado em horas.

1.2.14. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM TECIDO - ELISA

Os níveis de citocinas em segmentos da medula espinal (L4-L5) e no nervo isquiático (1 cm centralizado na ligadura) do camundongos foram determinados como descrito por GAMA et al., (2018). Resumidamente, foram adicionados 100 µL do tampão de extração de citocinas (0,4 M de NaCl, 0,05% tween 20, 0,5 % de BSA, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinina diluídos em PBS 1x) ao tecido coletado. O material foi imediatamente triturado em homogeneizador de tecidos *TissueLyser II* (Gentech Bio) por 3 minutos, e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota destinada à quantificação de proteínas totais utilizando o teste colorimétrico de Pierce™ 660nm (Thermo Fisher Scientific), segundo as recomendações do fabricante. O restante do sobrenadante foi armazenado em freezer -80°C para posterior quantificação das citocinas. Os níveis de citocinas foram quantificados utilizando kits de imunoenensaio ELISA para camundongos para cada citocina analisada (R&D SYSTEM, Minneapolis, MN, USA). Os resultados foram expressos em picogramas de citocina por mg de proteína.

1.2.15. REAÇÃO DE TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (RT-qPCR)

Para a extração de mRNA nas amostras dos segmentos L4-L5 de medula espinal do camundongos foi utilizado o método de Trizol® (Thermo Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade e pureza de RNA foram avaliadas através de espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). A pureza das amostras obtidas pela relação $A_{260nm}:A_{280nm}$ demonstrou uma proporção entre 1,8 e 2,0. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Scientific), também seguindo as recomendações do fabricante. Para a avaliação da expressão gênica, foram

utilizados o reagente Taqman *Universal Master Mix* (Applied Biosystems) e sondas para *Penk* (Mm01212875_m1; Thermo Fisher) utilizando o equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). A normalização das amostras foi feita como o gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) e a quantificação relativa da expressão gênica foi realizada comparando amostras do tecido de camundongos naive com camundongos neuropáticos tratados com veículo, MSC ou VE-MSC. Os dados foram representados como a quantificação relativa ao grupo naive seguindo o método matemático $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para a análise estatística paramétrica, os dados foram transformados no seu logaritmo na base 10 correspondente.

1.2.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como médias \pm desvio padrão (D.V.) de 5-6 animais em cada grupo. As comparações entre os tratamentos foram feitas usando o ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey, ou para medidas repetidas, ANOVA bidirecional seguido pelo teste de Bonferroni, conforme o caso. Todos os dados foram analisados usando o Software Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

1.2.17. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo, os grupos experimentais, compostos por seis animais cada, foram definidos da seguinte forma:

1. Naive: animais que não sofreram nenhum tipo de manipulação, foram avaliados com o objetivo de avaliar a resposta do animal não-estimulado, em situação de homeostase.
2. Sham: animais que foram submetidos à anestesia, incisão da pele, manipulação da musculatura e do nervo isquiático, mas não tiveram o nervo isquiático ligado. Este grupo experimental teve o objetivo de avaliar até que ponto as respostas comportamentais obtidas foram em decorrência do procedimento cirúrgico *per si*.
3. Animais neuropáticos tratados com veículo: animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e que receberam como tratamento apenas o veículo – solução fisiológica e heparina sódica à 10% – em um volume de 100 μ l via endovenosa (veia lateral da cauda). O veículo foi administrado no sétimo dia após a cirurgia.
4. Animais neuropáticos tratados com MSC: animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e que receberam como tratamento 1×10^6 MSC entre as passagens 10 e 12, em um volume de 100 μ l de salina e 10% de heparina sódica, por via endovenosa (veia lateral da cauda), no sétimo dia após a cirurgia de ligadura.

5. Animais neuropáticos tratados com VE-MSC: animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e que receberam como tratamento $7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$ partículas/mL de vesículas extracelulares derivadas de MSC entre as passagens 10 e 12, em um volume de 100 μ l de salina e 10% de heparina sódica, por via endovenosa (veia lateral da cauda), no sétimo dia após a cirurgia de ligadura.

1.1. RESULTADOS

1.1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO

Previamente à realização dos tratamentos, as VE obtidas a partir de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano foram caracterizadas. Foi feita a análise de NTA, que permite uma quantificação direta fornecendo como parâmetros o número e o tamanho das partículas em suspensão na amostra avaliada (figura 1). Três leituras foram realizadas e os dados relacionados ao tamanho e quantidade das vesículas isoladas podem ser observados na figura 1). A figura 1B apresenta a visualização das vesículas extracelulares pelo aparelho Nanosight, a partir da qual o movimento de cada partícula isolada é acompanhado e utilizado para calcular o tamanho e concentração das partículas. O gráfico disposto na figura 1A representa o número de vesículas quantificadas por mililitro de suspensão (eixo y) em relação à distribuição de tamanho de partícula em nanômetros (eixo x). O pico visualizado neste gráfico representa a moda, ou seja, o valor mais frequente de diâmetro das partículas (VE-MSC) isoladas, que foi $146,5 \pm 3,1$ nm. Nesta população de VE isolada, 10% das partículas apresentaram um tamanho igual ou menor que $125,9 \pm 1,9$ nm (D10, figura 1C), enquanto 90% das partículas possuíam um diâmetro até $240,4 \pm 5,3$ nm (D90, figura 1C). A concentração de vesículas isoladas por cada 1×10^6 MSC foi de $7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$ partículas/mL.

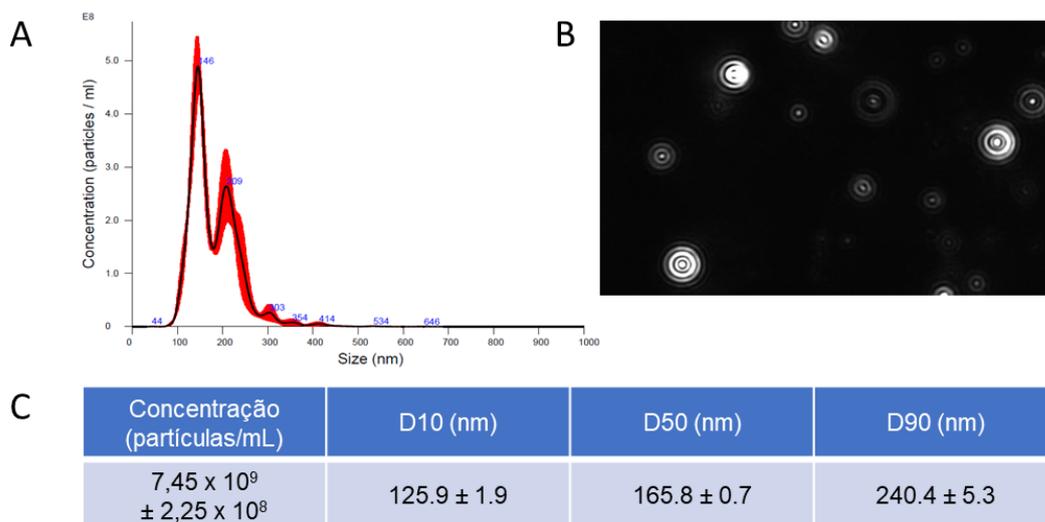


Figura 1 - Caracterização e quantificação das vesículas extracelulares derivadas de MSC por análise de rastreamento de nanopartículas. **A.** Gráfico representativo do número de vesículas por mL (eixo y) em relação à distribuição de tamanho de partícula em nanômetros (eixo x). **B.** Imagem ilustrativa capturada pelo NTA das vesículas extracelulares em suspensão. **C.** Quadro apresentando o número total de partículas por mL (VE-MSC isoladas) e os percentis D10, D50 e D90.

Estes dados indicam que foi recuperada uma população mista de vesículas, majoritariamente vesículas extracelulares pequenas, que podem conter exossomos (usualmente menores que 200 nm) e ectosomos/microvesículas (que possuem grande variedade de tamanhos). A morfologia das vesículas extracelulares foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. Durante a análise foram visualizadas vesículas com tamanhos aproximados entre 100 e 300 nm, com morfologia arredondada, membrana íntegra e com diferentes tamanhos (figuras 2A, 2B e 2C).

A caracterização da composição proteica foi realizada por Dotblot para demonstrar a natureza da amostra isolada. A presença de proteínas de duas categorias é recomendada para a caracterização das vesículas: 1) Proteínas transmembrana ou ancoradas a glicosilfosfatidilinositol associadas à membrana plasmática e/ou endossomos e 2) Proteínas citosólicas recuperadas em vesículas extracelulares. Foram avaliadas as proteínas transmembrana CD9 e CD81, da categoria 1, e a proteína citosólica TSG101, categoria 2. O ensaio revelou a presença das proteínas CD9, CD81 e TSG101 na amostra de vesículas, validando a caracterização das VE-MSC (figura 2D).

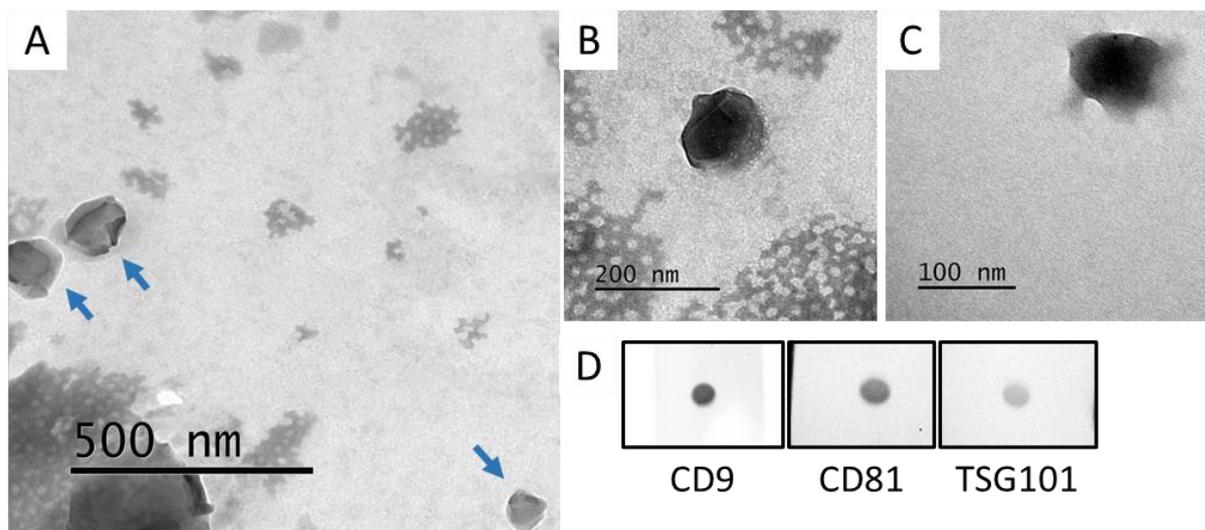


Figura 2 - Caracterização e quantificação das vesículas extracelulares derivadas de MSC por microscopia eletrônica de transmissão e Dotblot. Os painéis A, B e C apresentam eletromicrografias representativas das VE-MSC. Setas em A destacam a localização das VE-MSC. **O painel D** apresenta os pontos com marcações com anticorpos CD9, CD81 e TSG101.

1.1.2. EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM MSC E VE-MSC NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA EM CAMUNDONGOS

Tendo sido confirmado o perfil característico de VE-MSC nas amostras obtidas, foram iniciados os estudos no modelo experimental de neuropatia. Foram avaliados os impactos dos tratamentos sobre parâmetros comportamentais indicativos de dor neuropática (redução do limiar nociceptivo mecânico e térmico), além da função motora e capacidade física que podem estar alteradas na neuropatia sensorial.

1.1.2.1. Limiar nociceptivo mecânico

O limiar nociceptivo mecânico dos camundongos foi avaliado com o objetivo de confirmar o desenvolvimento da neuropatia dolorosa no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático (figura 3). Um dia após a cirurgia de indução do modelo houve uma redução significativa do limiar de resposta a estímulos mecânicos (figura 3A; $p < 0,001$). Animais sham também apresentaram redução do limiar nociceptivo mecânico em decorrência do procedimento cirúrgico, mas seus limiares nociceptivos retornaram espontaneamente a valores basais 10 dias após a indução. Por outro lado, os animais submetidos à LPN apresentaram uma redução sustentada (dia 1 ao dia 50, figura 3A; $p < 0,001$) do limiar nociceptivo mecânico em relação ao grupo naive, caracterizando o desenvolvimento da neuropatia sensorial neste modelo. Os tratamentos com MSC (1×10^6 células) e VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) foram realizados uma única vez, com uma administração por via endovenosa na veia lateral da cauda no sétimo dia após a indução da neuropatia experimental, e foram capazes de induzir um efeito antinociceptivo progressivo, com reversão completa das alterações de limiar mecânico a partir dos dias 11 e 10, para MSC e VE-MSC respectivamente (figura 3A).

O início do efeito de VE-MSC ($p < 0,05$) ocorreu no terceiro dia após o tratamento e o seu efeito aumentou progressivamente até atingir um efeito máximo de antinocicepção 19 dias após o tratamento, que perdurou em um platô durante todo o período experimental. O tratamento com MSC apresentou um início de efeito ($p < 0,05$) um pouco mais tardio, 4 dias após o tratamento, alcançando seu efeito máximo com platô de antinocicepção 11 dias após o tratamento. Apesar dessas diferenças no tempo de início do efeito e início do efeito máximo para os tratamentos com MSC e VE-MSC, não houve diferença nas magnitudes dos seus efeitos, como evidenciado na figura 3B, que representa a área sob a curva dos efeitos dos tratamentos.

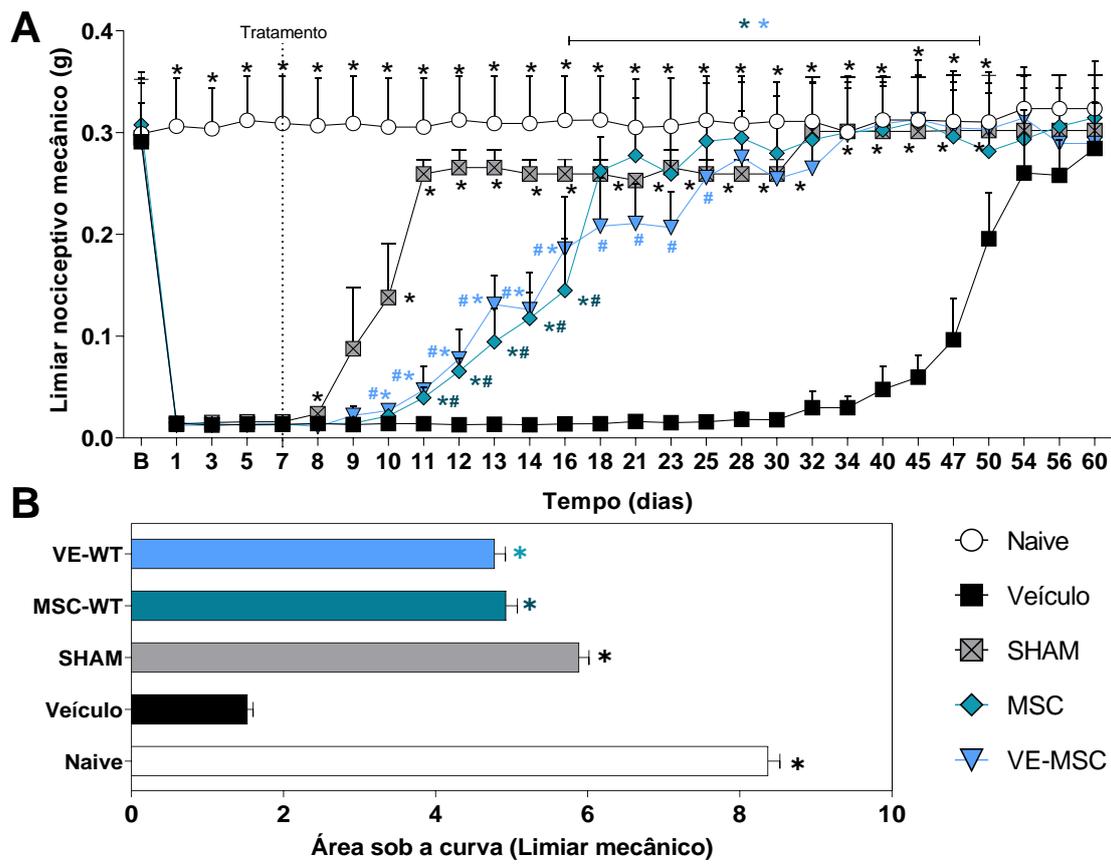


Figura 3 - Efeito da administração endovenosa de MSC ou VE-MSC sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos em modelo de dor neuropática. Painel A apresenta o curso temporal das mudanças no limiar nociceptivo mecânico. O eixo y representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. O basal (B) mostra valores do limiar nociceptivo antes da indução do modelo de neuropatia. A linha pontilhada no dia 7 indica o momento da administração endovenosa única de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou veículo (100 μ L de salina). **Painel B** apresenta a área sob a curva calculada para os dados de limiar mecânico apresentados no gráfico A. Dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 6 camundongos por grupo. * Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). # Diferença significativa em relação ao grupo naive ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni.

1.1.2.2. Limiar nociceptivo térmico

O limiar nociceptivo térmico dos camundongos também foi avaliado com o objetivo de confirmar o desenvolvimento da neuropatia sensorial no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático (figura 4). O limiar nociceptivo dos camundongos ao estímulo térmico reduziu (figura 4A; $p < 0,001$) gradativamente até o dia 7 após a cirurgia, quando animais sham apresentaram um retorno espontâneo a valores basais e os animais submetidos à cirurgia de indução do modelo apresentaram uma redução sustentada (dia 1 ao dia 41, figura 4A; $p < 0,001$) do limiar nociceptivo térmico em relação ao grupo naive, caracterizando o desenvolvimento da neuropatia sensorial neste modelo. Os tratamentos com MSC (1×10^6 células) e VE-MSC

($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$), realizados uma única vez no sétimo dia após a indução da neuropatia experimental por via endovenosa, causaram a reversão gradual e duradoura ($p < 0,05$) da hipernocicepção térmica dos animais neuropáticos. O transplante de VE-MSC levou a uma melhoria do limiar térmico dos animais neuropáticos desde o primeiro dia de avaliação após o tratamento, enquanto as MSC apresentaram um efeito a partir do segundo dia pós-tratamento. Ainda, pode-se perceber que os tratamentos com MSC e VE-MSC apresentam um perfil de efeito similar, entretanto uma pequena diferença na magnitude foi verificada. Na figura 4B, verifica-se que há uma pequena, porém significativa, diferença entre as áreas sob a curva dos efeitos de MSC e VE-MSC, favorecendo o tratamento com MSC.

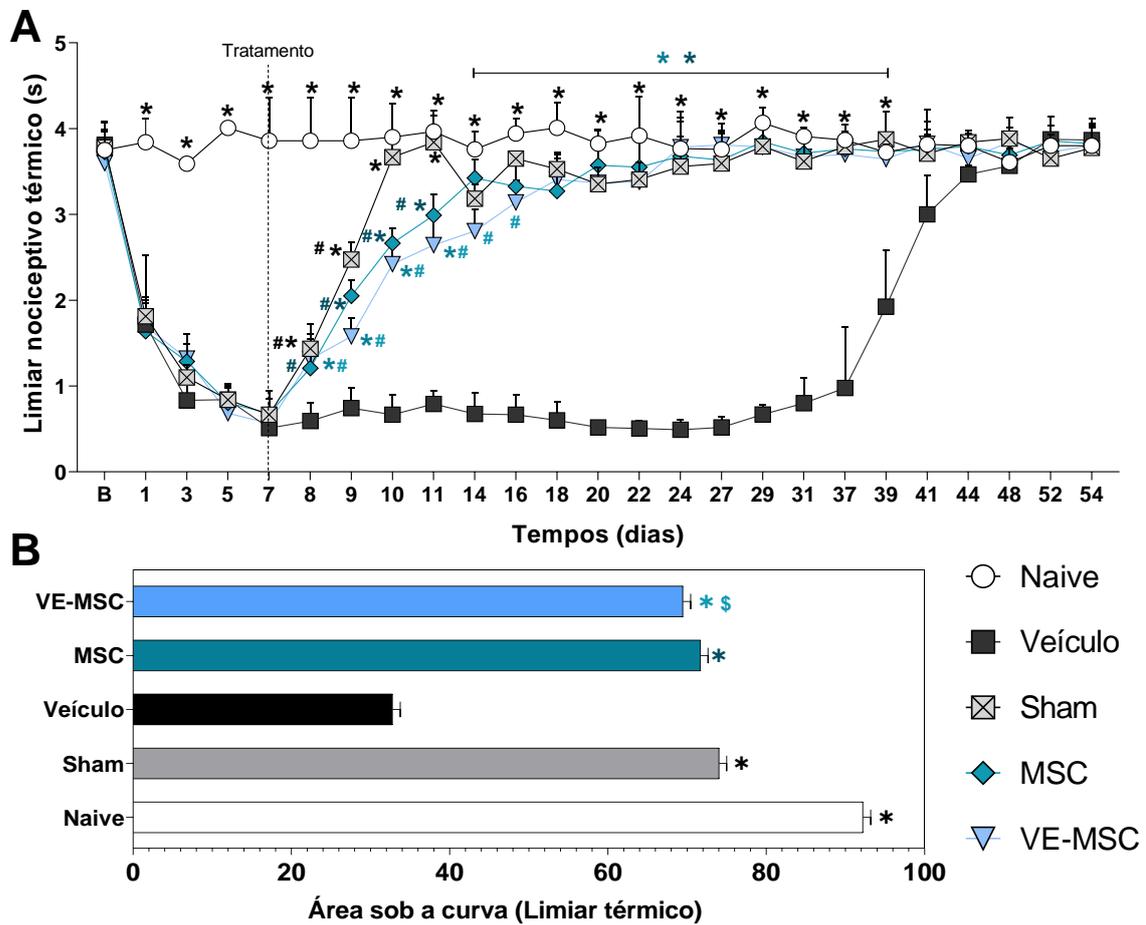


Figura 4 - Efeito da administração endovenosa de MSC ou VE-MSC sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de neuropatia diabética sensorial. Painel A apresenta o curso temporal das mudanças no limiar nociceptivo térmico. O eixo y representa a latência de retirada da pata em segundos. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. O basal (B) mostra valores do limiar nociceptivo antes da indução do modelo de neuropatia. A linha pontilhada no dia 7 indica o momento da administração endovenosa de MSC (1×10^6 células/ $100 \mu\text{L}$), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou do veículo ($100 \mu\text{L}$ de salina). **Painel B** apresenta a área sob a curva calculada para os dados de limiar mecânico apresentados no gráfico A. Dados foram expressos como média e desvio padrão; $n = 6$ camundongos por grupo. *Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). \$ Diferença significativa em relação ao grupo MSC ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni.

1.1.2.3. Função motora

Com o objetivo de verificar se o modelo de ligadura de nervo isquiático, ou os tratamentos realizados, poderia causar comprometimento motor, e desta forma influenciar as respostas nociceptivas dos animais, foi realizado o teste de rota-rod. Para isso, a média de tempo que os animais permaneceram na barra giratória do equipamento foi avaliada em diferentes momentos durante todo o período experimental. A figura 5 representa os resultados obtidos do teste e demonstra que nem a cirurgia de ligadura do nervo isquiático, nem os tratamentos realizados alteraram o tempo de permanência dos animais no aparelho durante o tempo experimental, levando em conta que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos.

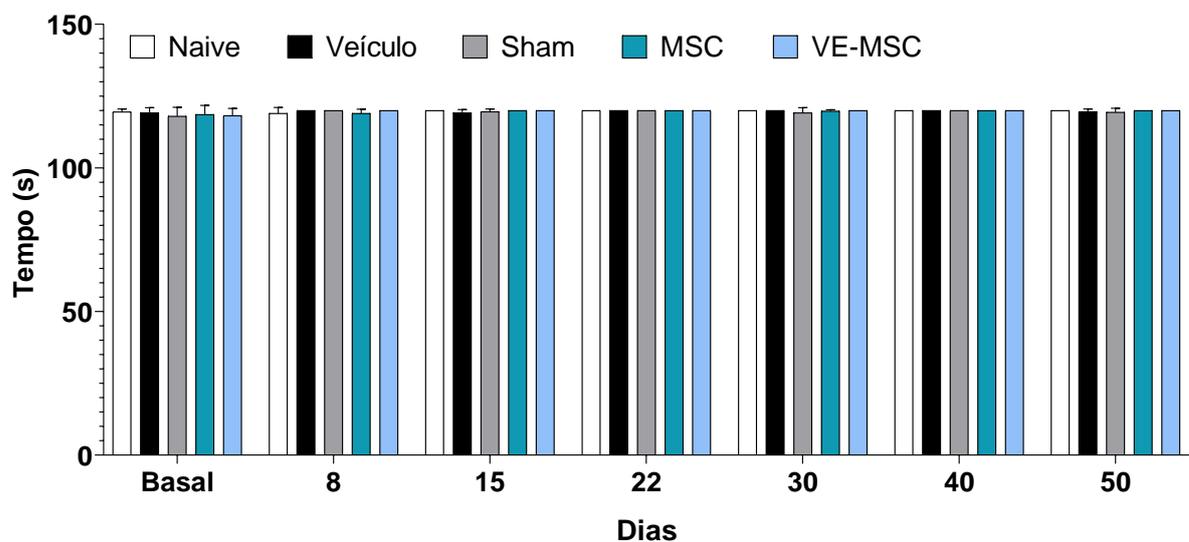


Figura 5 – Tempo de permanência no rota-rod durante o período experimental no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático. Os animais foram avaliados antes (basal) e após a indução do modelo de neuropatia dolorosa em diferentes momentos durante todo o período experimental. O eixo y representa o tempo de permanência dos animais na barra em segundos. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. O Basal mostra valores de permanência antes da indução do modelo de neuropatia. No dia 7 os animais receberam uma administração endovenosa única de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou veículo (100 μ L de salina). O grupo naive refere-se aos animais não submetidos a procedimentos experimentais, e o grupo sham, a animais falso operados. Os dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 6 camundongos por grupo. Foi realizado o teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni.

1.1.2.4. Avaliação da capacidade física

O efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre parâmetros funcionais indicativos da capacidade física dos camundongos, como o tempo de permanência e a distância percorrida na esteira, foram avaliados em uma esteira ergométrica. Antes da cirurgia de indução do modelo de neuropatia, todos os camundongos apresentaram tempos de permanência na esteira e

distâncias totais percorridas similares no teste, indicando homogeneidade da amostra (figura 6). Após a cirurgia de indução do modelo, os animais neuropáticos apresentaram uma redução significativa tanto do tempo de permanência, como da distância percorrida na esteira em relação a animais naive e sham, demonstrando que a neuropatia sensorial reduziu a capacidade física dos camundongos. Notavelmente, após o tratamento com MSC e VE-MSC, estes parâmetros em animais neuropáticos retornaram a níveis similares ao do grupo naive, indicando que os tratamentos reduziram as limitações físicas associadas à neuropatia. Não houve diferença estatística entre os grupos MSC e VE-MSC em ambos os parâmetros avaliados, nem entre os grupos naive e sham.

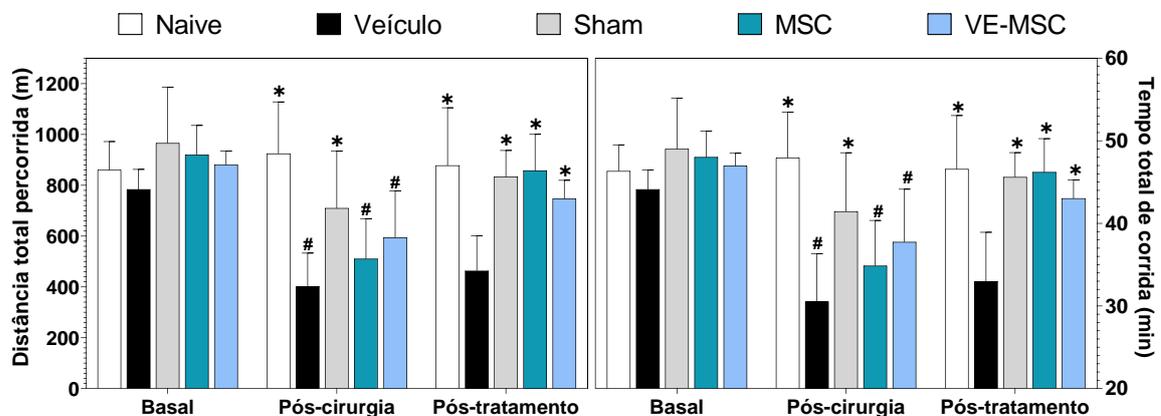


Figura 6 – Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre o desempenho dos camundongos em esteira ergométrica no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático. Camundongos foram submetidos à corrida em esteira ergométrica antes da cirurgia de indução do modelo de neuropatia (basal), 7 dias após a cirurgia e antes do tratamento (pós-cirurgia), e 21 dias após o tratamento (pós-tratamento). O **painel A** apresenta no eixo y as distâncias percorridas em metro e no eixo x os grupos experimentais. O **painel B** apresenta no eixo y o tempo total que os animais permaneceram na esteira em minutos e no eixo x os grupos experimentais. Os dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 6 camundongos por grupo. * Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,001$). # Diferença significativa em relação aos grupos naive e sham ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni.

1.1.3. INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO

Tendo sido demonstrados os efeitos dos tratamentos com MSC ou VE-MSC sobre a neuropatia sensorial experimental, buscou-se estudar os mecanismos ação associados a esses efeitos. Desta forma, levou-se em consideração a conhecida propriedade imunomodulatória das MSC e o importante papel da regulação neuroimune na gênese, manutenção e resolução da dor neuropática. Nesse bloco foram investigados mecanismos envolvendo a ação de células imunes, citocinas, quimiocina e a ativação de seus receptores.

1.1.3.1. Efeitos da co-cultura de macrófagos e MSC sobre o perfil de citocinas liberadas por macrófagos ativados

Como tem sido proposto que a polarização de macrófagos para um perfil M2 contribui para os efeitos terapêuticos das células-tronco na dor neuropática, o efeito da co-cultura de macrófagos e MSC foi inicialmente investigado, utilizando macrófagos J774 murinos estimulados com LPS e IFN- γ (figura 7). A produção de IL-1 β por macrófagos foi significativamente elevada pelo estímulo com LPS e IFN- γ (grupo controle, $p < 0,001$; figura 7A). A presença de MSC na cultura de macrófagos, em todas as concentrações de MSC testadas (2×10^5 – 2×10^4 células/poço), foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,01$) os níveis de IL-1 β no sobrenadante da co-cultura. A dexametasona (20 μ M), utilizada como fármaco padrão ouro no teste, também inibiu a produção de IL-1 β ($p < 0,001$), como esperado. Similarmente, a produção de TNF- α aumentou em macrófagos estimulados ($p < 0,001$) e foi reduzida pela cocultura com MSC (figura 7B). MSC reduziu significativamente as concentrações de TNF- α em relação ao grupo controle, que corresponde à cultura isolada de macrófagos estimulados, nas concentrações de 2×10^5 ($p < 0,001$), 1×10^5 e 5×10^4 ($p < 0,05$). A dexametasona (20 μ M) inibiu a produção de TNF- α ($p < 0,001$), como esperado. A capacidade de MSC de modular a produção de IL-10 em macrófagos estimulados também foi investigada (figura 7C). O estímulo com LPS e IFN- γ elevou os níveis de IL-10 na cultura de macrófagos, quando comparados aos níveis basais ($p < 0,001$). Os níveis de IL-10 produzidos por macrófagos em co-cultura com MSC aumentaram significativamente em todas as concentrações testadas de MSC (2×10^5 a 5×10^4 : $p < 0,001$; $2,5 \times 10^4$ a $6,25 \times 10^3$: $p < 0,05$). A dexametasona (20 μ M) não foi capaz de modificar as concentrações de IL-10 em comparação às células estimuladas e não cocultivadas com MSC.

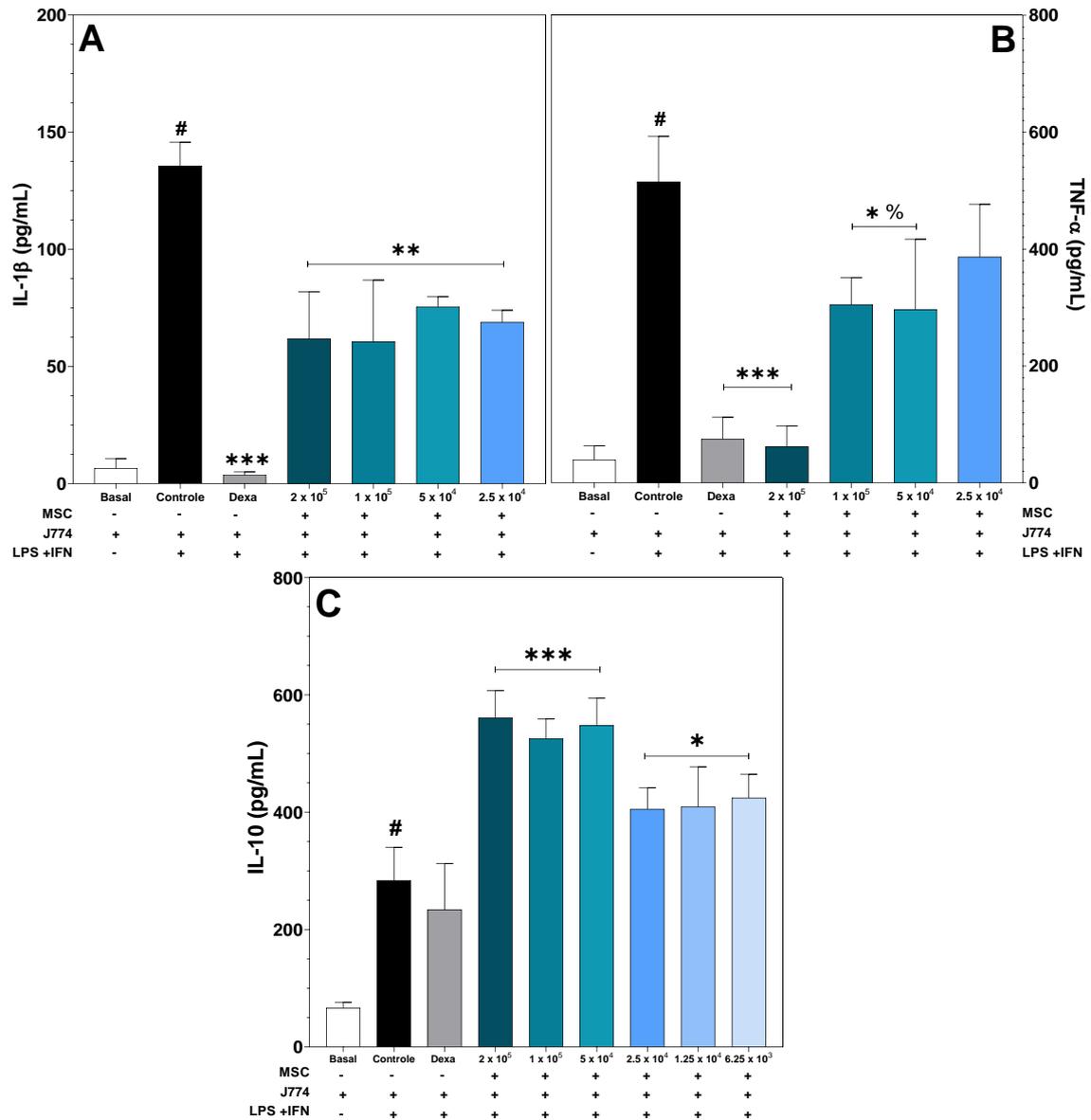


Figura 7 – Produção de citocinas por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ em co-cultura com MSC. A produção das citocinas IL-1 β (painel A), TNF- α (painel B) e IL-10 (painel C) foi avaliada no sobrenadante de células J774 estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN- γ (5 ng/mL). As células estimuladas foram incubadas com diferentes concentrações de MSC (2x10⁵ – 2x10⁴ células/poço) ou com dexametasona (Dexa; 20 μ M) utilizada como padrão-ouro. O grupo Basal representa células não estimuladas e não tratadas. O grupo Controle representa macrófagos estimulados em cultura isolada. O sobrenadante foi coletado 4 horas (TNF- α) ou 24 horas (IL-1 β e IL-10) após o estímulo. Valores representados como a média \pm desvio padrão de três determinações. *** Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,001$) ** Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,01$). * Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,05$). # Diferença significativa em relação ao grupo basal ($p < 0,05$). % Diferença significativa em relação ao grupo 2x10⁵ ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional seguido do teste de Tukey.

1.1.3.2. Efeitos das VE-MSC sobre a viabilidade celular e perfil de citocinas liberadas por macrófagos

Com base nos resultados da co-cultura, os efeitos do tratamento das culturas de macrófagos estimulados com VE-MSC foram a seguir investigados. Para tal, o impacto do tratamento com VE-MSC sobre a viabilidade celular dos macrófagos foi inicialmente estabelecido, com o objetivo de descartar possíveis efeitos citotóxicos das vesículas sobre as células. Como observado na figura 4, nenhuma das concentrações testadas de VE-MSC alterou significativamente a viabilidade celular dos macrófagos em cultura, em comparação às células tratadas com veículo. O detergente não iônico Tween 20 (20% em meio de cultura), que causa a lise celular, foi utilizado como controle positivo e reduziu a viabilidade celular como esperado ($p < 0,0001$).

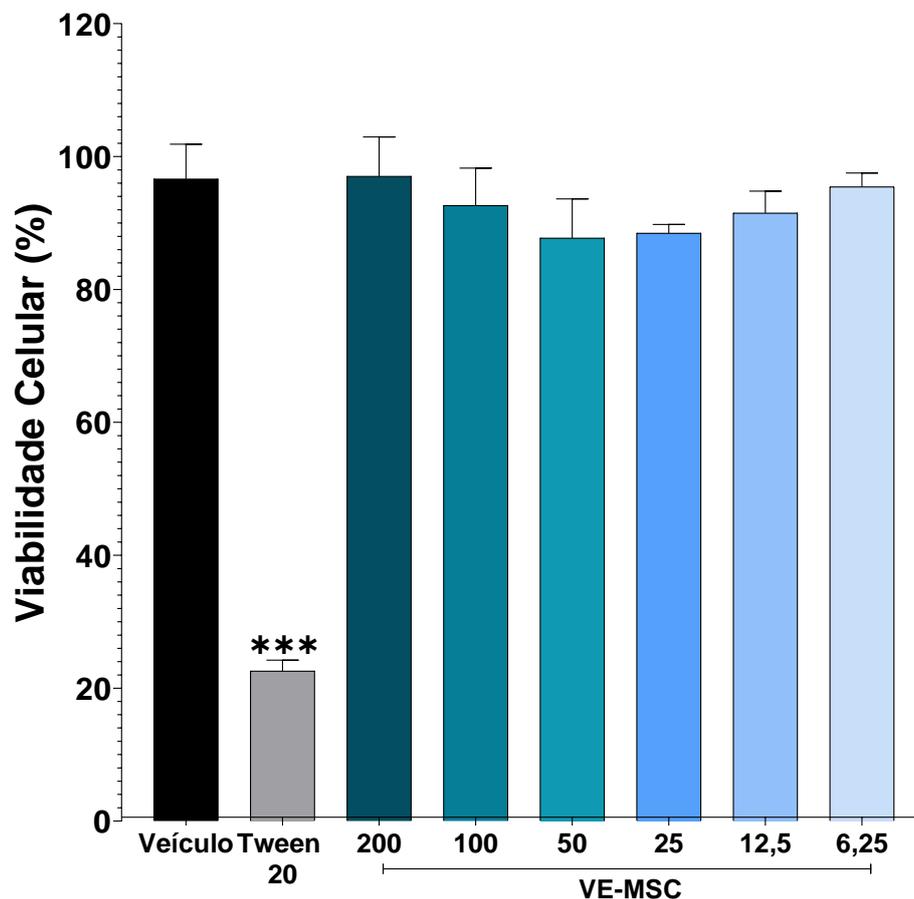


Figura 8 - Efeito das VE-MSC sobre a viabilidade celular de macrófagos J774 estimulados em cultura. O eixo X representa o tratamento com diferentes concentrações de VE-MSC. O eixo Y representa o percentual de células viáveis. A viabilidade celular dos macrófagos foi determinada pelo ensaio de Alamar Blue após a incubação das células tratadas com veículo (salina), VE-MSC (200 $\mu\text{g/mL}$ - 6,25 $\mu\text{g/mL}$) ou Tween 20 (20% em meio de cultura), usado como controle do teste. Os valores foram representados como média \pm desvio padrão de três

determinações. *** Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,001$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional, seguido do teste de Tukey.

Tendo determinado que as VE-MSC não induzem citotoxicidade aos macrófagos, os efeitos dessas VE sobre a produção de IL-10 e TNF- α em macrófagos J774 estimulados foram então avaliados (figura 9). O estímulo das células com LPS e IFN- γ resultou no aumento da produção de TNF- α quando comparado aos macrófagos não estimulados (grupo basal; $p < 0,05$; figura 5B). O tratamento das células com VE-MSC em diferentes concentrações (25 - 200 $\mu\text{g/mL}$; $p < 0,001$; figura 5B), assim como com dexametasona (Dexa, 20 μM ; $p < 0,001$), diminuiu a produção de TNF- α por macrófagos estimulados, quando comparado ao grupo controle (estimulado e tratado com veículo). Em contrapartida, os tratamentos com VE-MSC (25 - 200 $\mu\text{g/mL}$; $p < 0,05$; figura 5A) elevaram os níveis de IL-10 na cultura. Não houve diferença estatística dos níveis de IL-10 produzidos por células não estimuladas, estimuladas tratadas com veículo ou com dexametasona (20 μM).

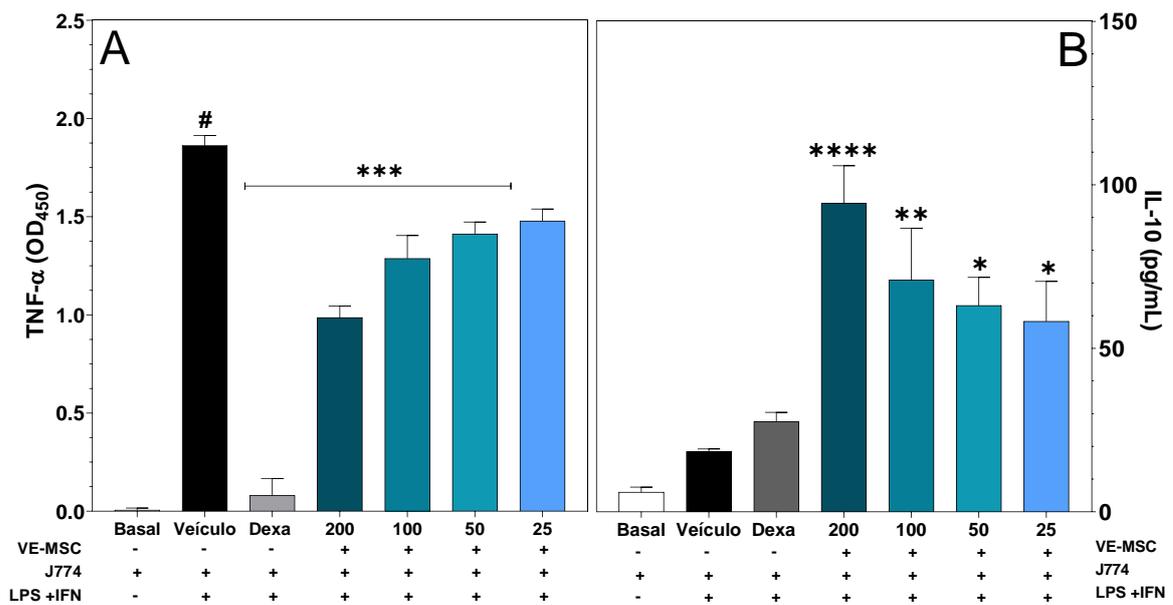


Figura 9 – Efeito das VE-MSC sobre a produção de citocinas por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ . A produção de TNF- α (painel A) e IL-10 (painel B) foi avaliada no sobrenadante da cultura de células J774 estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN- γ (5 ng/mL). As células estimuladas foram incubadas com diferentes concentrações de VE-MSC (200 $\mu\text{g/mL}$ – 25 $\mu\text{g/mL}$), dexametasona (Dexa; 20 μM) utilizada como padrão-ouro ou veículo (salina). O grupo Basal representa células não estimuladas e não tratadas. O grupo Veículo representa células estimuladas e tratadas com salina. Valores representados como a média \pm desvio padrão de três determinações. *** Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,001$) ** Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,01$). * Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). # Diferença significativa em relação ao grupo basal ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional seguido do teste de Tukey.

1.1.3.3. Contribuição da citocina anti-inflamatória IL-10 para o efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC

Considerando que tanto MSC quanto VE-MSC aumentaram a produção de IL-10 *in vitro*, e que a contribuição dessa citocina para as ações terapêuticas de MSC tem sido proposta, o papel de IL-10 no efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC foi a seguir investigado. Para tal, os efeitos antinociceptivos de MSC e VE-MSC foram comparados no modelo de neuropatia induzida por ligadura do nervo isquiático em camundongos selvagens versus *knockout* de IL-10 (IL-10^{-/-}). A administração endovenosa de MSC (1x10⁶ células) ou VE-MSC (7,45x10⁹ ±2,25x10⁸) em camundongos IL-10^{-/-} com neuropatia induziu efeito antinociceptivo mais tardio do que em animais selvagens com neuropatia, embora uma reversão completa das alterações de limiar nociceptivo também tenha sido atingida nos IL-10^{-/-} (figuras 10A e 11A).

O efeito antinociceptivo de VE-MSC sobre o limiar mecânico dos camundongos neuropáticos teve início 7 dias após o tratamento em animais IL-10^{-/-} versus 4 dias em animais selvagens (figura 10 A). A antinocicepção mecânica de MSC teve um início com 5 dias em animais selvagens versus 7 em animais knockout. Entre os dias 13 e 34 após a cirurgia, os efeitos antinociceptivos de MSC e VE-MSC foram maiores em animais selvagens que em animais IL-10^{-/-} (figura 10A, p<0,05). Refletindo esse fenômeno, verifica-se uma diferença significativa (p<0,05) entre as áreas sob a curva do efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC nas duas linhagens de camundongos (figura 10B), com animais knockout apresentando uma área menor que seus correspondentes selvagens. Esses resultados indicam que IL-10 contribui para a antinocicepção induzida por MSC e VE-MSC durante a neuropatia experimental.

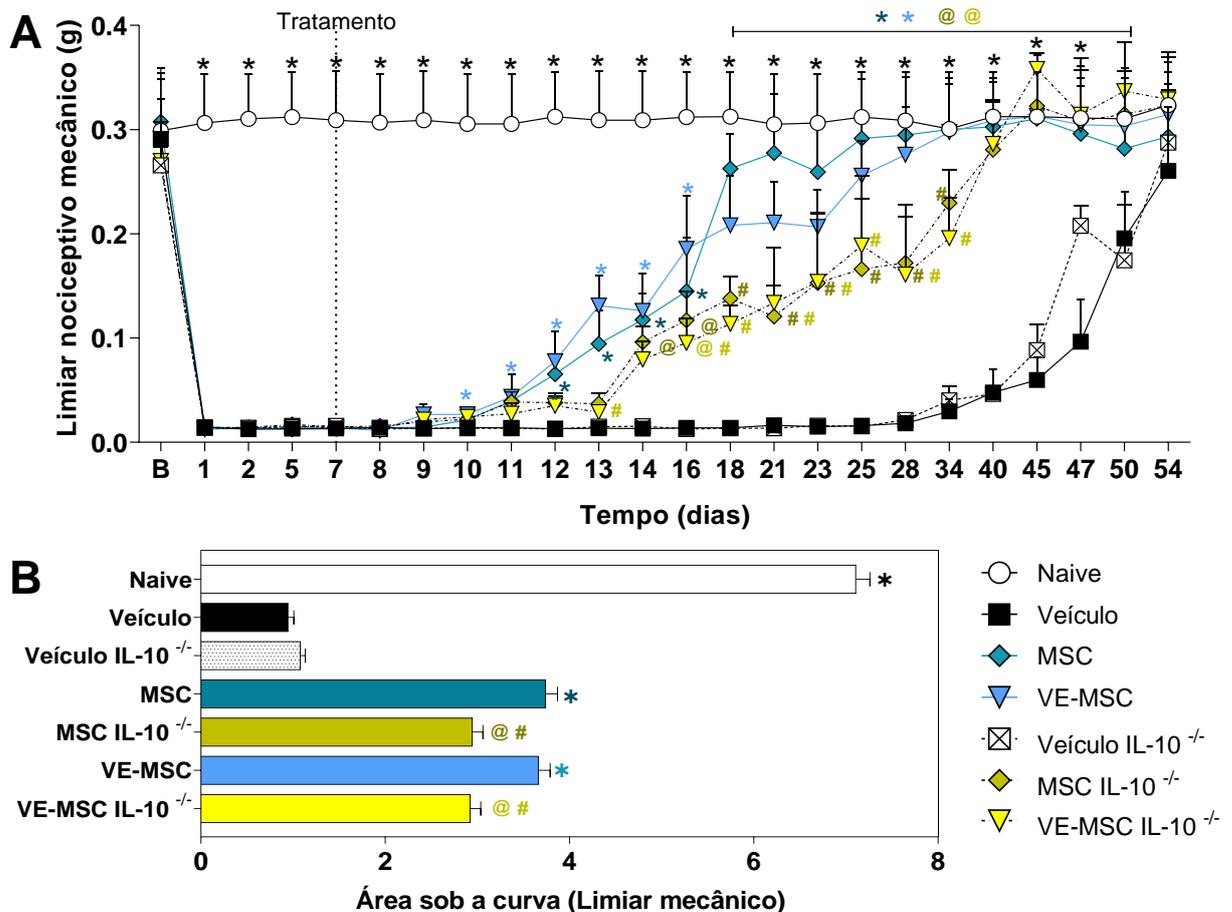


Figura 10 – Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos deficientes em IL-10 (IL-10^{-/-}) em modelo de dor neuropática. Painel A apresenta o curso temporal das mudanças no limiar mecânico. O eixo y representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações. O eixo das abscissas representa o tempo em dias após a cirurgia. O basal (B) mostra valores do limiar nociceptivo antes da indução do modelo de neuropatia. A linha pontilhada no dia 7 indica o momento da administração endovenosa única de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$ partículas/mL) ou veículo (100 μ L de salina) em camundongos C57Bl/6 selvagens ou em camundongos C57Bl/6 deficientes em IL-10 (MSC IL-10^{-/-}, VE-MSC IL-10^{-/-} ou Veículo IL-10^{-/-}, respectivamente). **Painel B** apresenta a área sob a curva (AUC) calculada para os dados de limiar mecânico apresentados no gráfico A. Dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 5 camundongos por grupo. * Diferença significativa em relação ao grupo veículo (p<0,05). @ Diferença significativa em relação ao grupo veículo IL-10^{-/-} (p<0,05). # Diferença significativa em relação ao grupo naive (p<0,05), como determinado pelo teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni.

O perfil de antinocicepção térmica seguiu o mesmo padrão da antinocicepção mecânica, ou seja, os efeitos antinociceptivos induzidos por MSC e VE-MSC são mais tardios em IL-10^{-/-} em comparação aos camundongos selvagens. A antinocicepção térmica teve início dois dias após os tratamentos em animais selvagens, enquanto animais *knockout* apresentaram o início do efeito antinociceptivo apenas 4 dias após os tratamentos (figura 11A). Entre os dias 10 e 20 após a cirurgia o efeito antinociceptivo térmico de MSC e VE-MSC foi menor em animais deficientes em IL-10 em comparação com animais selvagens (figura 11A, p<0,05). As áreas

sob a curva correspondentes ao efeito antinociceptivo térmico de MSC e VE-MSC em animais IL-10^{-/-} foi significativamente menor (figura 11B; p<0,05) que as áreas sob a curva de seus correspondentes selvagens, corroborando o papel de IL-10 no efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC.

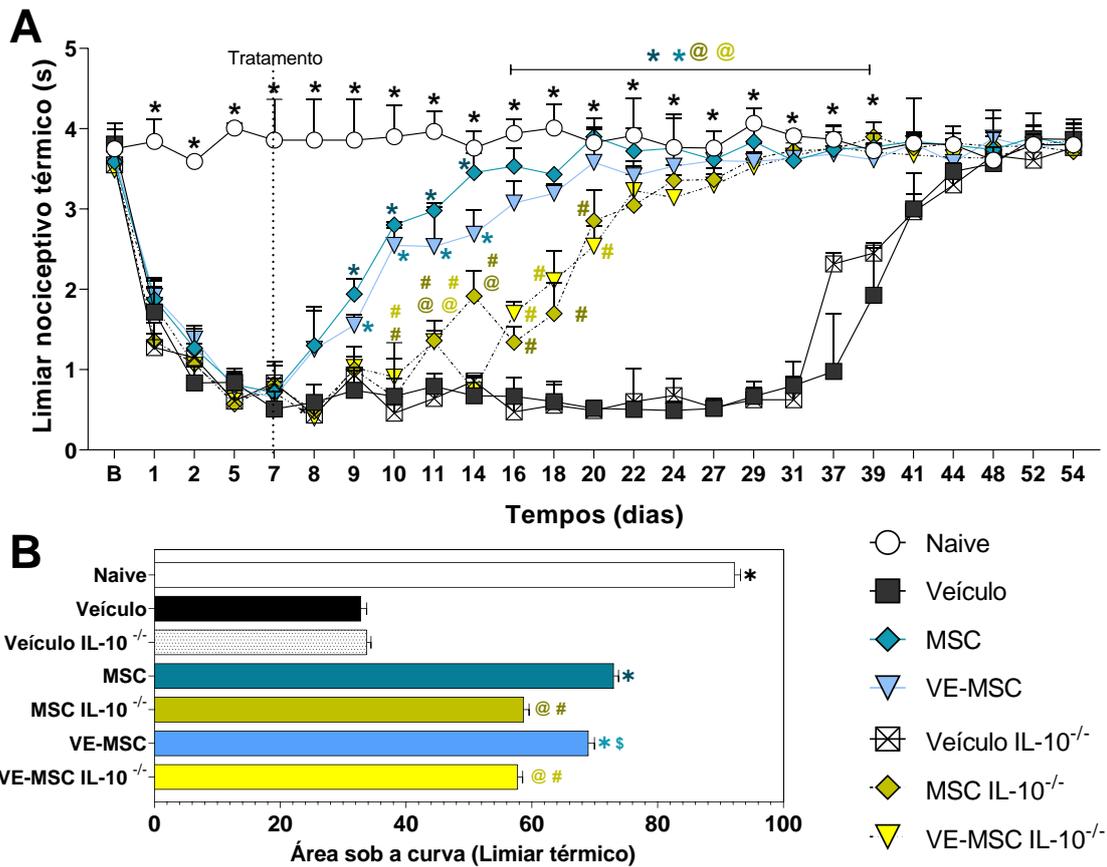


Figura 11 – Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos deficientes em IL-10 em modelo de neuropatia diabética sensorial. Painel A apresenta o curso temporal das mudanças na latência de retirada da pata. O eixo y representa a latência em segundos. O eixo das abscissas representa o tempo em dias após a cirurgia. O basal (B) mostra valores do limiar nociceptivo antes da indução do modelo de neuropatia. A linha pontilhada no dia 7 indica o momento da administração endovenosa única de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou do veículo (100 μ L de salina) em camundongos C57Bl/6 selvagem ou em camundongos C57Bl/6 deficientes em IL-10 (MSC IL-10^{-/-}, VE-MSC IL-10^{-/-} ou Veículo IL-10^{-/-}, respectivamente). **Painel B** apresenta a área sob a curva (AUC) calculada para os dados de limiar térmico apresentados no gráfico A. Dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 6 camundongos por grupo. *Diferença significativa em relação ao grupo veículo (p<0,05). \$ Diferença significativa em relação ao grupo MSC (p<0,05) @ Diferença significativa em relação ao grupo veículo IL-10^{-/-} (p<0,05). # Diferença significativa em relação ao grupo naive (p<0,05), como determinado pelo teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni.

1.1.3.4. Efeito de MSC ou VE-MSC sobre os níveis de IL-10 na medula espinal durante a neuropatia

Ainda buscando validar a contribuição de IL-10 para os efeitos antinociceptivos de MSC e VE-MSC, os níveis desta citocina na medula espinal de camundongos neuropáticos foram quantificados (figura 12). Segmentos de medula espinal (L4-L5) dos diferentes grupos experimentais foram coletados no dia 21 após a indução do modelo (tempo de efeito antinociceptivo estabelecido) e ao final do período experimental, visando avaliar se os tratamentos induzem uma modulação duradoura dos níveis desta citocina. A neuropatia experimental não levou ao aumento dos níveis de IL-10 na medula espinal, como evidenciado pela comparação entre os animais naive versus neuropático tratado com veículo. Por outro lado, os tratamentos com MSC e VE-MSC foram capazes de aumentar os níveis espinais de IL-10 em comparação com animais neuropáticos tratados com veículo ($p < 0,05$) no tempo de 21 dias após a indução da neuropatia. Entretanto, ao final do período experimental (60 dias) não houve diferença estatística entre os grupos em relação aos níveis de IL-10 na medula espinal.

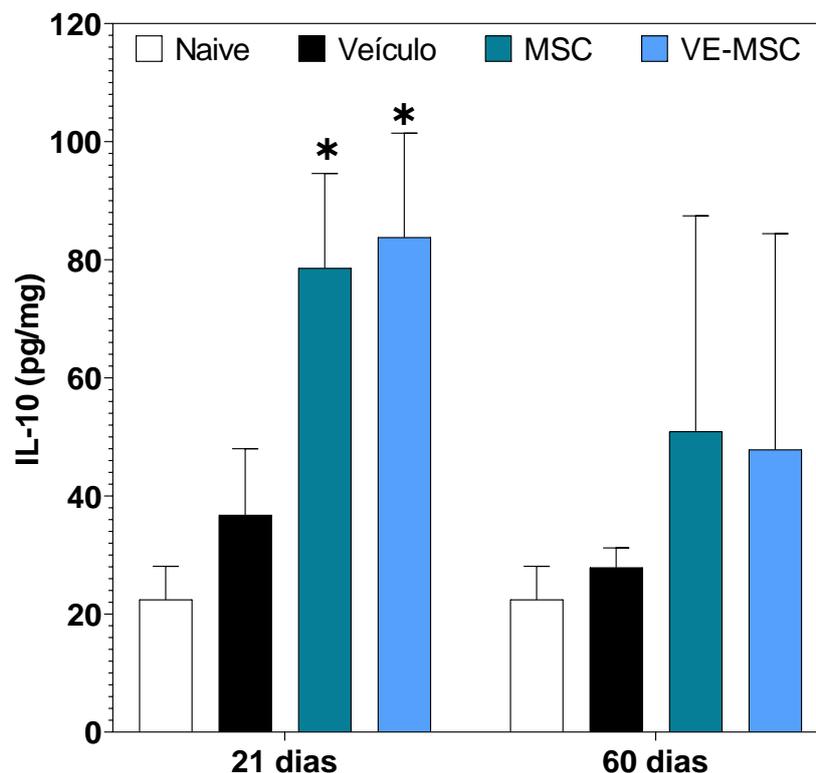


Figura 12 – Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre os níveis da citocina IL-10 na medula espinal de camundongos em modelo de dor neuropática. As análises foram realizadas 21 dias após a indução do modelo (tempo de efeito máximo dos tratamentos), e no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). O eixo y representa as concentrações de IL-10 em picogramas por mg de proteína do tecido. No eixo x estão representados os grupos dispostos nos tempos de 21 e 60 dias. No dia 7 após a indução do modelo experimental os animais receberam uma administração endovenosa única de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou veículo (100 μ L de salina). O grupo naive refere-se aos animais não submetidos a procedimentos experimentais. Os dados foram expressos como média e desvio padrão; $n = 5$ camundongos por grupo. * Diferença

significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey.

1.1.3.5. Efeito de MSC ou VE-MSC sobre a expressão gênica de preoencefalina na medula espinal durante a neuropatia

Outro possível mecanismo envolvendo o efeito terapêutico de MSC e VE-MSC pode incluir a regulação da sinalização por opioides. Dessa forma, a expressão gênica de preoencefalina (PENK), um precursor de peptídeos opioide endógenos, foi avaliada na medula espinal de camundongos naive e neuropáticos. Os resultados dispostos na figura 13 demonstram que a neuropatia dolorosa induziu uma diminuição da expressão gênica de PENK na medula espinal do grupo neuropático tratado com veículo em comparação com os animais naive ($p < 0,05$). Por outro lado, a expressão gênica de PENK em animais tratados com MSC ou VE-MSC foi significativamente maior que a de animais neuropáticos tratados com veículo ($p < 0,05$), apresentando níveis transcricionais a níveis aos de animais naive. Isso indica que MSC e VE-MSC reverteram a transcrição de PENK prejudicada pela neuropatia sensorial.

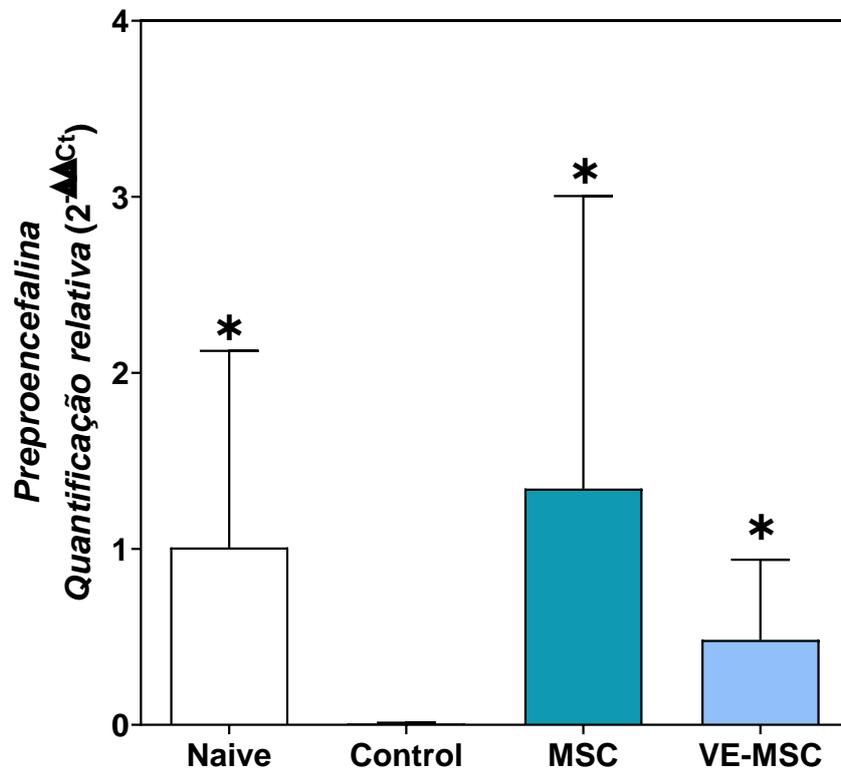


Figura 13 - Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre a expressão gênica de preoencefalina na medula espinal de camundongos. As amostras de medula espinal (L4-L5) de camundongos neuropáticos foram analisadas por RT-qPCR. O eixo y representa a variação da expressão gênica de *Penk* em relação ao grupo naive. A expressão do gene alvo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) foi determinada usando *Gapdh* como gene normalizador endógeno. No eixo x estão representados os grupos experimentais coletados no fim do período experimental (60 dias). No dia 7 após a indução do modelo experimental os animais receberam uma administração endovenosa única de MSC (1×10^6

células/100 μ L), VE-MS (7,45x10⁹ \pm 2,25x10⁸) ou veículo (100 μ L de salina). O grupo naivo refere-se aos animais não submetidos a procedimentos experimentais. Os dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 5 camundongos por grupo. * Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com veículo (p<0,05), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey.

1.1.3.6. Contribuição de receptores CXCR2 para o efeito antinociceptivo de MSC e VE-MS

Além de macrófagos, outras células imunes participam dos mecanismos imunomodulatórios envolvidos na dor neuropática, algumas das quais secretando peptídeos opioides via ativação de CXCR2 por ligantes como CXCL1, CXCL2 e CXCL3. Visando explorar outros mecanismos subjacentes ao efeito das MSC e VE-MS, a contribuição da ativação de receptores CXCR2 foi avaliada por meio de um ensaio de antagonismo farmacológico. Para isso o composto SB225002, antagonista seletivo do receptor de quimiocina CXCR2, foi administrado por via intraperitoneal (1 mg/kg) em animais neuropáticos tratados com MSC ou VE-MS, e os efeitos sobre o limiar nociceptivo foram acompanhados por até 8 horas após a administração (figura 14). A administração do antagonista de CXCR2 foi realizada 30 dias após a indução da neuropatia e 23 dias após os tratamentos, quando a antinocicepção causada por MSC ou VE-MS já está bem estabelecida. A antinocicepção mecânica induzida por MSC e VE-MS foi completamente revertida pelo tratamento agudo com SB225002 nas primeiras 4 horas pós-tratamento (p<0,05; figura 14A). Nos tempos de 6 e 8 horas pós-tratamento houve reversão parcial (p<0,05) da antinocicepção, e os limiares nociceptivos mecânicos retornaram gradativamente aos valores de pré-tratamento. O antagonista SB225002 reverteu parcialmente a antinocicepção térmica induzida por MSC e VE-MS 3 horas (p<0,05; figura 14B) após sua administração. Em conjunto, estes dados apontam para uma contribuição da ativação dos receptores CXCR2 no efeito antinociceptivo mediado por MSC e VE-MS.

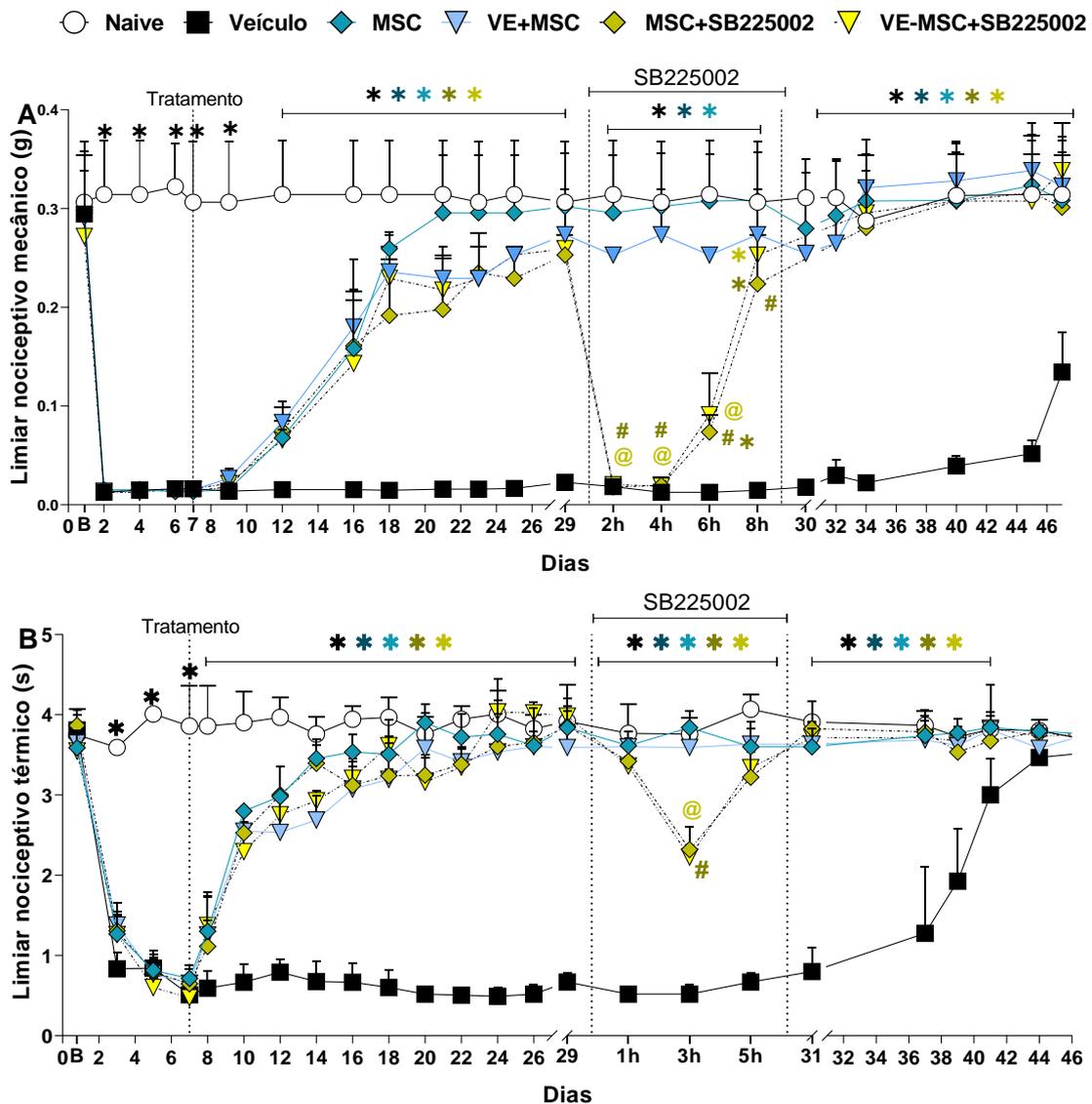


Figura 14 – Efeito do antagonista de CXCR2 (SB225002) sobre o efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC. Os limiares nociceptivos mecânicos (A) e térmicos (B) foram avaliados antes (B) e após a cirurgia de indução de neuropatia, realizada no tempo zero. **Painel A** apresenta o curso temporal das mudanças no limiar nociceptivo mecânico. O eixo y representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. **Painel B** apresenta o curso temporal das mudanças no limiar nociceptivo térmico. O eixo y representa a latência de retirada da pata em segundos. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. O grupo naive corresponde a animais não manipulados. O grupo sham representa camundongos manipulados cirurgicamente, mas sem ligadura do nervo isquiático. A linha pontilhada no dia 7 indica o momento da administração endovenosa única de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou veículo (100 μ L de salina). No dia 30, os camundongos foram tratados intraperitonealmente com SB225002 (1 mg/kg) e avaliados quando aos limiares nociceptivos até 8 horas após a administração. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão; n=5. * Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$) # Diferença significativa em relação ao grupo MSC ($p < 0,05$). @ Diferença significativa em relação ao grupo VE-MSC ($p < 0,05$) como determinado pelo teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni.

1.1.3.7. Efeito de MSC e VE-MSC sobre os níveis séricos de CXCL1 em camundongos com neuropatia experimental

Com o objetivo de corroborar o envolvimento da via de CXCR2 na antinociceção induzida por MSC e VE-MSC, os níveis de CXCL1 – um ligante dos receptores CXCR2 – foram quantificados no soro dos camundongos (figura 15). A quantificação de CXCL1 aos 21 dias pós-indução do modelo de neuropatia (14 dias após os tratamentos com VE-MSC e MSC) não indicou diferenças nos níveis dessa citocina entre os grupos experimentais. Por outro lado, no final do período experimental, os níveis de CXCL1 no soro de animais neuropáticos tratados com veículo foram superiores aos níveis observados em camundongos do grupo naive, sham e dos animais neuropáticos tratados com MSC e VE-MSC ($p < 0,05$).

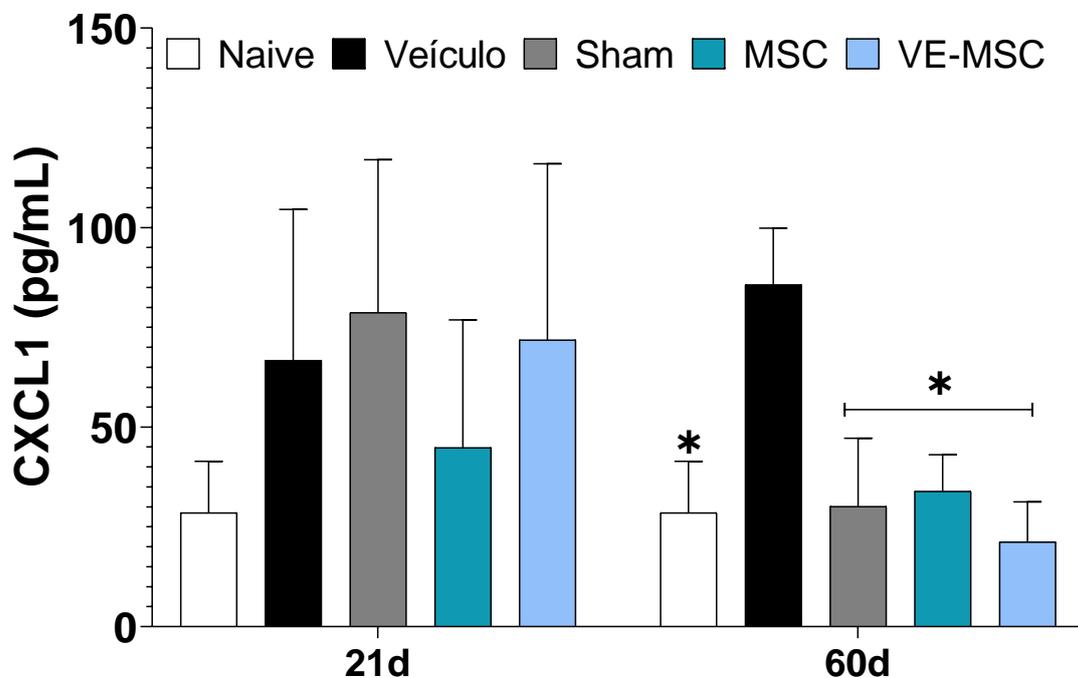


Figura 15 - Efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre os níveis séricos da citocina CXCL-1 em camundongos submetidos ao modelo de neuropatia. As análises foram realizadas 21 dias após a indução do modelo (tempo de efeito máximo dos tratamentos), e no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). O eixo y representa as concentrações de CXCL1 em picogramas por mL de soro. No eixo x estão representados os grupos dispostos nos tempos de 21 e 60 dias. No dia 7 após a indução do modelo experimental os animais receberam uma administração endovenosa única de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou veículo (100 μ L de salina). O grupo naive refere-se aos animais não submetidos a procedimentos experimentais. O grupo sham representa camundongos manipulados cirurgicamente, mas sem ligadura do nervo isquiático. Os dados foram expressos como média e desvio padrão; $n = 5$ camundongos por grupo. *Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA teste de ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey.

1.2. DISCUSSÃO

A dor neuropática é uma síndrome crônica refratária ao tratamento que apresenta um impacto significativo na vida, na saúde mental e laboral de uma parcela significativa da população. Tratamentos baseados em células-tronco mesenquimais têm sido considerados promissores para mitigar de forma permanente as causas e consequências da dor neuropática, entretanto, essa abordagem ainda requer investigações adicionais. O presente estudo avaliou comparativamente os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical versus vesículas extracelulares derivadas destas células na neuropatia experimental, além de investigar possíveis mecanismos associados aos seus efeitos antinociceptivos.

As vesículas extracelulares desempenham papéis variados e complexos em uma ampla gama de sistemas biológicos, o que pode decorrer de sua composição heterogênea (WELSH et al., 2024). Estas vesículas podem refletir o estado e as funções das células de origem, transmitindo essa informação a células alvo, sendo consideradas um importante agente de comunicação intercelular (WELSH et al., 2024; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Com base na sua capacidade de modular a função de células e tecidos, tem sido proposto que as vesículas extracelulares produzidas por células-tronco mesenquimais podem preservar as ações terapêuticas dessas células, uma hipótese que foi investigada no presente trabalho. Para tal, inicialmente as VE-MSC isoladas foram caracterizadas. Essa etapa é importante levando em consideração a heterogeneidade das VE-MSC, e visa aumentar a reprodutibilidade e translacionabilidade das aplicações terapêuticas.

As VE-MSC aqui isoladas foram caracterizadas seguindo as recomendações da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (THÉRY et al., 2018). As vesículas apresentaram tamanho, forma e marcadores característicos de VE. O tamanho máximo encontrado em 90% das partículas foi de aproximadamente 240 nm, demonstrando uma prevalência de vesículas extracelulares pequenas, como exossomos, todavia tamanhos maiores também foram verificados, incluindo ectossomos/microvesículas, o que indica claramente a presença de distintas populações de vesículas. Apesar de atualmente uma grande quantidade de pesquisas se referir especificamente às propriedades e efeitos de exossomos, a maioria das técnicas de isolamento e caracterização empregadas não permite diferenciar vesículas de subtipos específicos (WELSH et al., 2024). De fato, a maior parte da literatura existente sobre "exossomo" e "ectossomo/microvesícula" refere-se a uma ampla população de vesículas, e não às que são liberados por vias específicas de biogênese (WELSH et al., 2024). Como a partir da caracterização realizada no presente estudo não foi possível identificar ou separar subtipos

específicos de vesículas extracelulares estas partículas foram referenciadas aqui como “vesículas extracelulares”. Considerando que ambas as populações de VE-MSC, ou a mistura delas, têm apresentado efeitos biológicos em diversos contextos fisiológicos ou patológicos (RAPOSO; STAHL, 2024; YÁÑEZ-MÓ et al., 2015), inclusive na dor crônica (BRYK et al., 2022), o perfil de VE-MSC obtido foi considerado adequado para os objetivos do presente estudo. Após a caracterização bem-sucedida das VE-MSC, estudos para avaliar seu potencial terapêutico na dor neuropática foram realizados no modelo de neuropatia por ligadura do nervo esquiático.

A fisiopatologia da dor neuropática pode envolver a ativação direta de nociceptores em conjunto com alterações na expressão gênica de mediadores e receptores, e alterações nas propriedades eletrofisiológicas dos nociceptores e excitabilidade neuronal que culminam em sintomas característicos como dor espontânea, alodinia, hiperalgesia e distúrbios sensoriais (SMITH, 2023). Alguns destes sintomas podem ser avaliados no cenário pré-clínico utilizando-se de ensaios comportamentais estabelecidos. No contexto experimental animal, a alodinia e a hiperalgesia se traduzem em redução do limiar de resposta a estímulos mecânicos e térmicos, que podem ser mensurados no roedor com filamentos de von Frey (CHAPLAN et al., 1994) e Hargreaves (HARGREAVES et al., 1988), respectivamente. É importante destacar que o modelo experimental utilizado neste trabalho mimetiza sintomas observados em pacientes, pois no modelo são identificados comportamentos duradouros sugestivos de alodinia e hiperalgesia (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). Dados do presente estudo reforçam esses achados, pois os camundongos induzidos ao modelo de neuropatia desenvolveram uma redução duradoura do limiar mecânico e térmico, demonstrando o estabelecimento da neuropatia experimental.

O efeito do tratamento com MSC e VE-MSC sobre o limiar nociceptivo de animais neuropáticos foi então avaliado comparativamente. Ambos os tratamentos com MSC e VE-MSC foram capazes de reverter completamente e de forma duradoura as alterações do limiar nociceptivo térmico e mecânico associadas à neuropatia. Em linha com estes achados, resultados similares em modelos de dor neuropática periférica por lesão do nervo periférico foram obtidos pelo tratamento endovenoso com células mesenquimais de medula óssea (GAMA et al., 2018; SINISCALCO, 2010) ou de tecido adiposo (LIU et al., 2017), pelo tratamento intratecal com células mesenquimais de cordão umbilical humano (CHEN et al., 2016), ou intraganglionar com células mesenquimais de medula óssea (MUSOLINO et al., 2007). Por outro lado, Teng e colaboradores verificaram um efeito antinociceptivo apenas transitório após o tratamento intratecal com células mesenquimais de medula óssea (TENG et al., 2019). Schäfer e colaboradores (2014) também descreveram que injeção intratecal de

células mesenquimais não apresenta efeito antinociceptivo em modelo de neuropatia em ratos fêmeas (SCHÄFER et al., 2014). Corroborando os resultados do presente trabalho nos ensaios de nocicepção, dados do teste de rota-rod evidenciaram que os tratamentos com MSC e VE-MSC não induzem comprometimento motor. Resultados similares foram observados em outros trabalhos (GAMA et al., 2018; SINISCALCO, 2010) e validam as análises de comportamento nociceptivo, que se baseiam nas respostas motoras dos animais. Em conjunto, esses resultados reforçam que células mesenquimais induzem de fato um efeito antinociceptivo.

Curiosamente, enquanto o perfil de antinocicepção mecânica produzido por MSC e VE-MSC não divergiu, o efeito antinociceptivo térmico global exibido por MSC foi levemente, porém significativamente, superior ao de VE-MSC. O efeito antinociceptivo de vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais de cordão umbilical (GAO et al., 2023b; SHIUE et al., 2019), ou de placenta (LU et al., 2022b) durante a dor neuropática também já foram descritos. Desta forma, os resultados do presente estudo em conjunto com a literatura indicam que tratamentos com VE-MSC podem induzir efeitos similares aos obtidos pelo transplante de MSC durante a neuropatia dolorosa. A transposição desse achado para o ambiente clínico ainda requer novas e extensas investigações.

Pessoas que sofrem com neuropatias dolorosas não convivem apenas com a dor crônica, mas apresentam uma série de outros sintomas e comorbidades, como cinesiofobia, dificuldade de marcha e redução da capacidade física, que comprometem de forma mais ampla a qualidade de vida (DE BRUIJN; GEERTZEN; DIJKSTRA, 2007; KARAYANNIS et al., 2017; STOMPÓR et al., 2019). De fato, a dor no contexto clínico leva a adaptações motoras desde compensações sutis durante a realização de uma atividade física até a completa evitação de atividades que desencadeiam respostas dolorosas (BEEBE et al., 2021; MERKLE; SLUKA; FREY-LAW, 2020). Dessa forma, para além de parâmetros nociceptivos evocados, a avaliação destes outros sintomas em modelos experimentais pode ser realizada de forma a se aproximar mais da doença real e aumentar a translacionabilidade das pesquisas pré-clínicas.

Alterações de marcha e função física têm sido avaliadas e se correlacionam positivamente com alterações de limiar nociceptivo mecânico durante a neuropatia experimental (VRINTEN; HAMERS, 2003; XU et al., 2019). Estas alterações decorrem da tentativa do animal de reduzir o estímulo doloroso, ao minimizar o contato da pata afetada durante a locomoção (VRINTEN; HAMERS, 2003). No presente estudo, ao analisar a capacidade física e função de marcha dos camundongos em uma esteira ergométrica, observou-se que, em comparação com animais naive e sham, animais neuropáticos permaneceram menos tempo e percorreram uma distância menor durante o teste na esteira. Uma observação

semelhante também foi realizada por Minami e colaboradores (2018) ao demonstrar que animais com compressão da cauda equina percorrem uma distância menor em esteira em comparação a animais sham-operados. Esses mesmos autores sugeriram que a redução da função física, evidenciada no estudo pela menor distância percorrida na esteira, é relacionada à nocicepção experienciada pelos animais, considerando que o tratamento agudo com o analgésico morfina normalizou o desempenho na esteira (MINAMI et al., 2018). O mesmo padrão foi observado em pacientes com sintomas neuropáticos, que percorreram uma distância menor no teste de caminhada em comparação aos indivíduos saudáveis. Neste estudo, a intensidade da dor dos pacientes com neuropatia se correlacionou com os resultados do teste de caminhada (NOVAK et al., 2004). Esses dados pré-clínicos e clínicos indicam que o desempenho em esteira ergométrica fornece um bom parâmetro de função física associada à nocicepção, com boa correlação clínica.

Os dados do presente trabalho demonstram que uma única injeção de MSC ou VE-MSC foi capaz de melhorar a capacidade física de animais neuropáticos, que passaram a apresentar, no pós-tratamento, níveis de tempo de permanência e distância percorrida em esteiras similares aos de animais naive. Esses resultados podem indicar que antinocicepção exercida por MSC e VE-MSC impactaram na melhoria da capacidade física dos animais. Em linha com esses resultados, outros trabalhos relataram a melhoria de parâmetros de marcha em animais neuropáticos após o tratamento com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CHEN et al., 2023; YEROFEYEVA et al., 2023) ou derivadas do líquido amniótico humano (CHIANG et al., 2016). Até o limite do nosso conhecimento, este é o primeiro relato da melhoria de capacidade física de animais neuropáticos pelo tratamento com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais.

Após a caracterização do efeito antinociceptivo das MSC e VE-MSC, os mecanismos envolvidos nestes efeitos foram investigados. Entender o mecanismo de ação das células mesenquimais e seus derivados representa ainda uma lacuna do conhecimento e uma barreira a ser transposta visando aumentar a aplicabilidade e uso em larga escala da terapia celular. A terapia com células mesenquimais ainda desperta preocupações que devem ser sanadas para subsidiar a ampla aceitação desta intervenção terapêutica. Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos associados aos efeitos dessas células é essencial, pois envolve a investigação dos benefícios, mas também dos riscos envolvendo essas terapias. Ainda, entender de que forma as células mesenquimais exercem seus efeitos terapêuticos pode indicar seu potencial terapêutico para outras condições ainda não exploradas. Além disso, levando em conta a variabilidade intrínseca de produtos terapêuticos baseados em material biológico, entender quais mecanismos

são essenciais ou secundários à ação terapêutica das células mesenquimais e seus derivados pode levar à identificação de marcadores de potência terapêutica de células mesenquimais e seus derivados (ROBB et al., 2019; SAGARADZE; MONAKOVA; EFIMENKO, 2023).

Estes marcadores podem ser úteis, no futuro, para selecionar as melhores linhagens de células mesenquimais e seus derivados, e também para o controle de qualidade de produtos baseados em células mesenquimais.

Levando em consideração o importante efeito imunomodulador das células-tronco mesenquimais e suas vesículas, já evidenciado em estudos pré-clínicos e clínicos (DABROWSKA et al., 2021), os efeitos das MSC e VE-MSc sobre a resposta de macrófagos estimulados em cultura foram investigados. Macrófagos são células do sistema imune inato que estão intrinsicamente associados com os mecanismos neuroimunes que levam ao estabelecimento ou resolução da dor neuropática (CHEN; DONNELLY; JI, 2020; KIGUCHI et al., 2017; SILVA; GUIMARÃES; CUNHA, 2021). Essas células são as mais abundantes nos locais de danos do tecido nervoso e produzem vários mediadores envolvidos com a sensibilização nociceptiva e neuroinflamação (KIGUCHI et al., 2017). Após o trauma de nervo periférico, tanto macrófagos circulantes recrutados para o local do dano, como macrófagos residentes associados a neurônios (SILVA; GUIMARÃES; CUNHA, 2021) são ativados e passam a secretar diversos mediadores inflamatórios, a exemplo das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β (SOMMER; SCHÄFFERS, 1998) e espécies reativas de oxigênio, que atuam na sensibilização direta ou indireta de neurônios aferentes primários (DE LOGU et al., 2017). Por outro lado, macrófagos também estão intimamente relacionados com o efeito terapêutico exercido por células-tronco mesenquimais (GALIPEAU, 2021). Experimentos envolvendo a depleção de macrófagos demonstraram que o efeito terapêutico de células-tronco (GUO et al., 2017; JIANG et al., 2022; NÉMETH et al., 2009) ou vesículas extracelulares derivadas de células-tronco (LUO et al., 2021; ZHAO et al., 2019) foi reduzido ou abolido devido à ausência destas células.

Desta forma, os tratamentos com MSC e VE-MSc foram avaliados *in vitro*, em macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ . Tanto a cocultura de macrófagos com MSC, como o tratamento dos macrófagos com VE-MSc reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β e aumentou os níveis de IL-10 liberados pelos macrófagos ativados, em comparação a macrófagos tratados com veículo. Isso indica que os tratamentos promovem a modulação citocinas para um perfil anti-inflamatório. Notavelmente, os tratamentos *in vitro* com MSC e VE-MSc modularam as repostas dos macrófagos de modo similar. Em linha com estes resultados, outros estudos demonstraram que macrófagos humanos em co-cultura com

células-tronco mesenquimais produzem maiores níveis de IL-10 em comparação com macrófagos controle (KIM; HEMATTI, 2009). Outro estudo demonstrou que macrófagos tratados com células mesenquimais produzem mais IL-10, e que o efeito protetivo destas células em um modelo de sepse é associado à produção de IL-10 por macrófagos (NÉMETH et al., 2009).

Levando em consideração os resultados dos testes *in vitro* realizados nesta pesquisa, em associação aos dados da literatura que apontam para a capacidade de MSC (KIM; HEMATTI, 2009; NÉMETH et al., 2009) e VE-MSC (ARABPOUR; SAGHAZADEH; REZAEI, 2021; LI et al., 2022) de induzir a aumento da produção de IL-10, além da relevância da polarização de macrófagos para o processo de resolução da dor neuropática (GALIPEAU, 2021; SILVA; GUIMARÃES; CUNHA, 2021), a contribuição desta citocina para os efeitos antinociceptivos de MSC e VE-MSC foi a seguir investigado. Para isso, animais C57Bl/6 deficientes em IL-10 e seus pares selvagens foram induzidos à neuropatia experimental e os efeitos de MSC e VE-MSC foram avaliados comparativamente durante todo o período experimental.

Curiosamente, animais knockout para IL-10 e tratados com MSC ou VE-MSC apresentaram efeito antinociceptivo na neuropatia experimental, entretanto o perfil deste efeito diferiu significativamente do perfil de efeito antinociceptivo apresentado por animais selvagens. O tratamento dos animais knockout para IL-10 com MSC e VE-MSC resultou em um efeito antinociceptivo de menor magnitude em comparação ao induzido por MSC e VE-MSC em animais selvagens. Isso indica que IL-10 está de fato envolvida no efeito antinociceptivo tanto de MSC, como de VE-MSC. Contudo, a indução de IL-10 provavelmente não é o único mecanismo que compõe o efeito terapêutico de MSC e VE-MSC.

O perfil temporal do efeito também apresentou diferenças. O efeito de MSC e VE-MSC em animais knockout apresentou um início mais tardio e a chegada ao platô do efeito antinociceptivo também foi retardada. Entretanto, assim como em animais selvagens, o tratamento dos animais knockout com MSC e VE-MSC foi capaz de reverter completamente as alterações de limiar nociceptivo características da neuropatia.

Uma explicação possível para esse fenômeno seria a de que níveis elevados de IL-10 poderiam contribuir primordialmente para o efeito antinociceptivo inicial de MSC e VE-MSC, mas com o passar do tempo outros mecanismos passariam a contribuir para a manutenção da antinocicepção exercida por MSC e VE-MSC. Os resultados obtidos nos ensaios de ELISA evidenciando o perfil cinético de expressão de IL-10 na medula espinal de animais neuropáticos tratados com MSC e VE-MSC, corroboram essa hipótese, dado que níveis elevados de IL-10 foram encontrados 14 dias após os tratamentos, mas não em tempo mais tardio.

Outros estudos também corroboram nossos achados pois associam o aumento da expressão tecidual de IL-10 à melhoria da neuropatia dolorosa promovida por células-tronco mesenquimais. O tratamento com células mesenquimais elevou os níveis de IL-10 na medula espinal de camundongos com neuropatia induzida por quimioterapia (DOS SANTOS et al., 2021; SEZER et al., 2022). Em camundongos diabéticos, o tratamento com células mesenquimais e meio condicionado derivado dessas células aumentou os níveis de IL-10 na medula espinal, gânglios da raiz dorsal e nervo ciático (BRINI et al., 2017). Do mesmo modo, níveis elevados de IL-10 foram encontrados na medula de animais neuropáticos tratados com células mesenquimais e meio condicionado no modelo de ligadura do nervo isquiático (GAMA et al., 2018).

Até o presente momento, apenas um estudo investigou o efeito de vesículas extracelulares derivadas de células mesenquimais sobre a modulação de IL-10 na dor neuropática. Em linha com os resultados apresentados no presente estudo, a injeção intratecal de exossomos derivados de células mesenquimais aumentou os níveis de IL-10 no gânglio da raiz dorsal de ratos em um modelo de dor neuropática induzida por lesão de nervo (SHIUE et al., 2019). Em conjunto, esses resultados indicam que IL-10 contribui para o efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC, embora a existência de mais de um mecanismo de ação tenha sido evidenciada.

O mecanismo pelo qual IL-10 induz antinocicepção pode estar associado à redução de mediadores nociceptivos e da resposta inflamatória (GALIPEAU, 2021; SILVA; GUIMARÃES; CUNHA, 2021; WU et al., 1993), mas também ao aumento da sinalização inibitória na medula espinal. Sabe-se que durante a instalação da dor neuropática, os sistemas de sinalização por opioides são alterados (TAVARES; COSTA-PEREIRA; MARTINS, 2021) e a ativação da sinalização por opioides endógenos promove o alívio da dor neuropática em diversos estudos, alguns dos quais envolvem células imunes (LOPES et al., 2022; MA et al., 2021; MARTIN et al., 2021; SILVA et al., 2022; ZHAI et al., 2022).

Um estudo realizado por Ma e colaboradores demonstrou que a inibição da plasticidade sináptica por IL-10 em um modelo de dor neuropática é mediada pelo aumento da produção de β -endorfinas pela micróglia espinal (MA et al., 2021). Curiosamente, outro estudo verificou níveis persistentes de metionina-enkefalina após o tratamento com talidomida em tempos que a concentração de IL-10 não se encontrava mais elevada (GEORGE et al., 2000). Os autores sugeriram que a manipulação precoce do balanço local de citocinas no local da lesão nervosa pode levar a alterações na regulação da metionina-enkefalina no corno dorsal da medula espinal em momentos posteriores (GEORGE et al., 2000). Desta forma, a sinalização por encefalinas

pode incluir um mecanismo complementar, mas independente da sinalização direta via IL-10, embora a contribuição desse fenômeno para o efeito antinociceptivo de MSC e VE-MSC não tenha sido objeto de estudo nesses trabalhos originais.

Com o objetivo de investigar se o efeito antinociceptivo persistente de MSC e VE-MSC pode ser mantido de forma complementar pela sinalização opioidérgica, a expressão gênica de preproencefalina foi avaliada na medula espinal dos camundongos. Os dados demonstraram que os níveis de RNA mensageiro de PENK em animais neuropáticos estavam reduzidos em relação aos animais naive, enquanto o tratamento com MSC ou VE-MSC elevou a expressão gênica de PENK, retornando a níveis basais. Em linha com esses resultados, outros estudos já demonstraram que os níveis espinais de mRNA de PENK estão diminuídos na dor neuropática experimental (OBARA et al., 2009).

A correlação entre os efeitos antinociceptivos de células mesenquimais e o sistema opioide endógeno já foi proposta. O efeito antinociceptivo produzido por células mesenquimais em modelos de dor neuropática foi atenuado pela administração sistêmica do antagonista opioide naloxona (GUO et al., 2011; SILVA, 2021). As células mesenquimais também atenuam a hiperexcitabilidade mediada pelo receptor N-metil-D-aspartato no nervo trigêmeo, efeito este também revertido pela naloxona (GUO et al., 2016). Embora a contribuição do sistema opioide para a antinocicepção de células mesenquimais já tenha sido proposta, até o presente momento nenhum estudo investigou seu papel nos efeitos de VE. Desta forma, os dados do presente estudo reforçam a hipótese de que MSC induzem antinocicepção por meio da sinalização opioide e descrevem pela primeira vez esse mecanismo de ação para as VE-MSC.

Levando em consideração o contexto de modulação neuroimune induzido por MSC e VE-MSC, e a relação já conhecida entre o sistema imunológico e opioides endógenos, é possível que células imunes contribuam para o aumento de expressão de encefalinas induzido por MSC e VE-MSC. Já foi relatado que leucócitos podem aliviar a dor neuropática em camundongos por meio da liberação de peptídeos opioides (CELIK et al., [s.d.]; LABUZ et al., 2009). Especificamente, a depleção de macrófagos foi associada à redução da analgesia induzida por opioides (BRACK et al., 2004a). O transplante de macrófagos M2 reduz a dor neuropática via liberação de peptídeos opioides (PANNELL et al., 2016), e foi descrito que o grau de antinocicepção é proporcional ao número de leucócitos produtores de peptídeos opioides (RITTNER et al., 2001). Além disso, evidências demonstraram que células T produzem endorfinas e encefalinas (LABUZ et al., 2010), e que camundongos deficientes em células T apresentam um aumento da sensibilização nociceptiva e diminuição da antinocicepção mediada por opioides (ROSEN et al., 2019). Além dos macrófagos, os neutrófilos também são

envolvidos na modulação da dor e analgesia, e com o sistema opioide endógeno. Neutrófilos são capazes de liberar peptídeos opioides no contexto da dor inflamatória (CARVALHO et al., 2015), e contribuem para o efeito analgésico local da eletroacupuntura (SHI et al., 2023). Neutrófilos também já foram associados a efeitos antinociceptivos na neuropatia dolorosa periférica por meio da sinalização da quimiocina CXCL1 e liberação de peptídeos opioides (CAO; MALON, 2018). A liberação de peptídeos opioides a partir de leucócitos pode ocorrer via ativação de receptores como CXCR2, presentes nestas células (RITTNER et al., 2006).

O envolvimento da via CXCL1/CXCR2 na antinocicepção de células mesenquimais já foi proposto (Guo et al., 2017) Desta forma, a ativação de receptores CXCR2 e liberação de opioides endógenos por células imunes pode estar envolvida na antinocicepção duradoura e independente de IL-10 apresentada por MSC e VE-MSC. Essa hipótese foi testada aqui por meio do antagonismo farmacológico de receptores CXCR2 utilizando o antagonista seletivo SB225002. Os resultados deste trabalho demonstraram que os efeitos antinociceptivos induzidos por MSC e VE-MSC foram revertidos pela administração aguda do antagonista SB225002. O antagonismo de CXCR2 levou a uma reversão completa da antinocicepção mecânica e uma reversão parcial da antinocicepção térmica induzidas por MSC e VE-MSC em camundongos com neuropatia. Esses resultados indicam que a ativação persistente de receptores CXCR2 está envolvida com a manutenção do efeito antinociceptivo tanto de MSC, como de VE-MSC.

A ativação de CXCR2 foi proposta como mecanismo antinociceptivo de células mesenquimais por Guo e colaboradores (2017), que verificaram a reversão do efeito antinociceptivo de células-tronco mesenquimais de medula óssea 3 horas após a administração de SB225002 (GUO et al., 2017), um tempo similar ao verificado neste trabalho. Estes mesmos pesquisadores também demonstraram que CXCR2 está expresso em áreas relacionadas à transmissão e modulação endógena da dor, como a substância cinzenta periaquedutal, gânglio trigeminal e bulbo rostral ventromedial (RVM). No RVM, CXCR2 apresentou co-marcação com neurônios contendo receptores μ opioides e o silenciamento do gene *Cxcr2* levou à diminuição da expressão gênica de receptores μ na RVM (GUO et al., 2017), o que indica um papel importante de CXCR2 na sinalização opioidérgica em níveis espinais e supraespinais. CXCR2 também está presente em oligodendrócitos e na micróglia (FILIPOVIC; JAKOVCEVSKI; ZECEVIC, 2003).

Analisando o perfil dos efeitos do antagonista SB225002 sobre a antinocicepção induzida por MSC e VE-MSC, é possível concluir que os receptores CXCR2 modulam a nocicepção mecânica de modo mais eficaz do que a nocicepção térmica. Em linha com esses

resultados, Rittner e colaboradores demonstraram que, em modelo de dor inflamatória em ratos, a ativação de CXCR2 em neutrófilos reverte completamente a hiperalgesia mecânica, enquanto reverte apenas parcialmente a hiperalgesia térmica (RITTNER et al., 2006).

Um dos ligantes endógenos de CXCR2 é CXCL1, uma quimiocina que possui ação dual na fisiopatologia da dor. Numerosos trabalhos apontam tanto um papel antinociceptivo e protetor (BRACK et al., 2004b; CAO; MALON, 2018; OMARI et al., 2009), como pró-nociceptivo (CARREIRA et al., 2013; MANJAVACHI et al., 2014) de CXCL1. A correlação entre CXCL1 e os efeitos antinociceptivos de células mesenquimais já foi proposto. O aumento de CXCL1 no soro de animais neuropáticos tratados com células mesenquimais está associado aos efeitos antinociceptivos induzidos por essas células, considerando que a antinocicepção é atenuada pela incubação do soro com anticorpo anti-CXCL1 (GUO et al., 2017). Com base na literatura e nos resultados obtidos com o ensaio de antagonismo de CXCR2, os níveis séricos de CXCL1 foram analisados em camundongos neuropáticos tratados com veículo, MSC ou VE-MSC. Contrariamente ao esperado, não houve diferença estatística das concentrações séricas de CXCL1 entre os grupos experimentais 21 dias após a indução da neuropatia, um tempo experimental no qual tanto a neuropatia sensorial, quanto os efeitos antinociceptivo de MSC e VE-MSC estão bem consolidados.

Uma possível explicação para esses resultados contrastantes em relação à literatura é o tempo de coleta do soro. No estudo de Guo e colaboradores (2017), os níveis séricos foram avaliados um dia após o tratamento e indicaram que a produção de CXCL1 por monócitos circulantes é induzida pelas células-tronco administradas nesse tempo. No presente estudo, por outro lado, os níveis séricos de CXCL1 foram avaliados 14 dias após os tratamentos, um tempo no qual é possível que os efeitos de MSC e VE-MSC sobre monócitos não sejam mais observados. Em adição, é possível ainda que a ativação de CXCR2 no presente estudo seja mantida por outro ligante, como CXCL2/3 e IL-8, que são agonistas conhecidos desses receptores (KORBECKI et al., 2022) e não foram quantificados aqui. É possível ainda que a produção de CXCL1 e sinalização em CXCR2 ocorra de forma parácrina e local, em áreas específicas de transmissão e modulação da dor. Astrócitos, por exemplo, secretam CXCL1 e IL-8 (CHOI et al., 2014) e são capazes de recrutar células imunes (KITADE et al., 2023; LIU et al., 2022), para o sistema nervoso central contribuindo para os mecanismos de manutenção ou resolução da dor neuropática (FIORE et al., 2023; SMITH, 2023).

É importante destacar que ao final do período experimental os níveis séricos de CXCL1 estavam elevados nos camundongos neuropáticos tratados com veículo. Estes níveis elevados de CXCL1 podem estar associados à não resolução da lesão nervosa periférica induzida no

modelo experimental, que mantem o recrutamento de células imunes e a secreção de mediadores inflamatórios e fatores quimioatrativos, como CXCL1 (AL AAMERI et al., 2023; SILVA et al., 2017; SMITH, 2023). Em contraste, os níveis séricos de CXCL1 de animais tratados com MSC ou VE-MSC foram similares aos níveis de animais naive, o que pode sugerir que esses tratamentos contribuíram para a resolução da neuroinflamação, embora parâmetros adicionais que comprovem esse efeito não tenham sido mensurados aqui.

Em resumo, este trabalho demonstrou que os tratamentos com MSC ou VE-MSC induziram antinocicepção duradoura e melhoraram parâmetros funcionais de capacidade física em modelo de dor neuropática. Os mecanismos associados a esses efeitos foram compartilhados por MSC e VE-MSC e envolveram a modulação da produção de citocinas por macrófagos, o aumento dos níveis de IL-10, a ativação de receptores CXCR2 e a produção de peptídeos opioides endógenos. Esses resultados corroboram evidências já propostas sobre o mecanismo de ação das células mesenquimais e trazem novos conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos de vesículas extracelulares.

É importante ressaltar que a demonstração de que os tratamentos com MSC e VE-MSC induzem efeitos terapêuticos com perfil similar e compartilham os mesmos mecanismos de ação durante a neuropatia, evidencia que VE-MSC podem ser consideradas para a substituição dos transplantes de células-tronco, no tratamento das síndromes de dor neuropática. Em adição, este trabalho reforça o potencial terapêutico dos derivados de células-tronco mesenquimais como possíveis produtos para a terapia *cell-free*.

1.3. REFERÊNCIAS

- ABOUZID, M. R. et al. The Safety and Efficacy of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure and Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of Clinical Trials. **Cureus**, v. 15, n. 11, p. e49645, nov. 2023.
- ABY, F. et al. Switch of serotonergic descending inhibition into facilitation by a spinal chloride imbalance in neuropathic pain. **Science Advances**, v. 8, n. 30, p. eabo0689, 29 jul. 2022.
- ADAM, F.; CHATELLIER, G.; ALFONSI, P. Assessment of the concordance between DN4 scores performed by the patient (self-assessment) or by the physician (hetero-assessment) to detect subacute neuropathic postoperative pain. **European Journal of Pain (London, England)**, 19 jan. 2024.
- AGUIAR, D. P. et al. Prevalence of chronic pain in Brazil: systematic review. **BrJP**, v. 4, p. 257–267, 1 set. 2021.
- AGUIAR KOGA, B. A. et al. Role of MSC-derived small extracellular vesicles in tissue repair and regeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 1047094, 1 mar. 2023.
- AHARONSON, B. S.; SCHILLING, M. A. Mapping the technological landscape: Measuring technology distance, technological footprints, and technology evolution. **Research Policy**, v. 45, n. 1, p. 81–96, 1 fev. 2016.
- AL AAMERI, R. F. H. et al. Targeting CXCL1 chemokine signaling for treating cisplatin ototoxicity. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1125948, 31 mar. 2023.
- ALLES, S. R. A.; SMITH, P. A. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 315–347, 1 abr. 2018.
- ARABPOUR, M.; SAGHAZADEH, A.; REZAEI, N. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes. **International Immunopharmacology**, v. 97, p. 107823, ago. 2021.
- BAGNO, L. L. et al. Mechanism of action of mesenchymal stem cells (MSCs): Impact of Delivery Method. **Expert opinion on biological therapy**, v. 22, n. 4, p. 449–463, abr. 2022.
- BALOG, B. M.; SONTI, A.; ZIGMOND, R. E. Neutrophil biology in injuries and diseases of the central and peripheral nervous systems. **Progress in Neurobiology**, v. 228, p. 102488, 1 set. 2023.
- BANNER, L. R. et al. Leukemia inhibitory factor is an anti-inflammatory and analgesic cytokine. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 14, p. 5456–5462, 15 jul. 1998.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 16 out. 2009.
- BEEBE, J. A. et al. Gait Variability and Relationships With Fear, Avoidance, and Pain in Adolescents With Chronic Pain. **Physical Therapy**, v. 101, n. 4, p. pzab012, 4 abr. 2021.
- BERNARDI, C. et al. GM-CSF in Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: from Graft-versus-Host Disease to Graft-versus-Tumor effect. **Transplantation and Cellular Therapy**, p. S2666- 6367(24)00141–6, 13 jan. 2024.
- BODART-SANTOS, V. et al. Extracellular vesicles derived from human Wharton’s jelly mesenchymal stem cells protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 332, 20 nov. 2019.
- BOGATCHEVA, N. V.; COLEMAN, M. E. Conditioned Medium of Mesenchymal Stromal Cells: A New Class of Therapeutics. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 84, n. 11, p. 1375–1389, nov. 2019.

- BRACK, A. et al. Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. **Anesthesiology**, v. 101, n. 1, p. 204–211, jul. 2004a.
- BRACK, A. et al. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 229–238, dez. 2004b.
- BREIVIK, H.; EISENBERG, E.; O'BRIEN, T. The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1229, 24 dez. 2013.
- BRINI, A. T. et al. Therapeutic effect of human adipose-derived stem cells and their secretome in experimental diabetic pain. **Scientific Reports**, v. 7, p. 9904, 29 ago. 2017.
- BRYK, M. et al. Mesenchymal stem cells and extracellular vesicles for the treatment of pain: Current status and perspectives. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 17, p. 4281–4299, 2022.
- CABAÑA-MUÑOZ, M. E. et al. Adult Mesenchymal Stem Cells from Oral Cavity and Surrounding Areas: Types and Biomedical Applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2109, 9 ago. 2023.
- CAFFERTY, W. B. et al. Leukemia inhibitory factor determines the growth status of injured adult sensory neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 18, p. 7161–7170, 15 set. 2001.
- CAO, L.; MALON, J. T. Anti-nociceptive role of CXCL1 in a murine model of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 372, p. 225–236, 21 fev. 2018.
- CAPLAN, A. I. Are All Adult Stem Cells The Same? **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 4–10, 1 dez. 2015.
- CARLSON, J. D. et al. Sensitization of pain-modulating neurons in the rostral ventromedial medulla after peripheral nerve injury. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 48, p. 13222–13231, 28 nov. 2007.
- CARREIRA, E. U. et al. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 5, p. 654–663, 2013.
- CARVALHO, T. T. et al. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)-induced mechanical hyperalgesia in mice: Role for peripheral TNF α , IL-1 β and IL-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 749, p. 62–72, 15 fev. 2015.
- CELIK, M. Ö. et al. IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids. **JCI insight**, v. 5, n. 4, p. e133093, 133093, 27 fev. 2020.
- CELIK, M. Ö. et al. IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids. **JCI Insight**, v. 5, n. 4, p. e133093, [s.d.].
- CHAKRAVARTHY, K. et al. Stem Cell Therapy for Chronic Pain Management: Review of Uses, Advances, and Adverse Effects. **Pain Physician**, v. 20, n. 4, p. 293–305, maio 2017.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1 jul. 1994.
- CHEN, C. et al. Intrathecal Injection of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Neuropathic Pain in Rats. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 12, p. 3250–3260, 1 dez. 2016.
- CHEN, G. et al. Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 137, n. Pt 8, p. 2193–2209, ago. 2014.
- CHEN, G. et al. Intrathecal bone marrow stromal cells inhibit neuropathic pain via TGF- β secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 8, p. 3226–3240, 3 ago. 2015.
- CHEN, H. et al. Exploring the Correlation Between the Regulation of Macrophages by Regulatory T Cells and Peripheral Neuropathic Pain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 813751, 2022.

- CHEN, O.; DONNELLY, C. R.; JI, R.-R. Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. **Current Opinion in Neurobiology**, Brain, gut, and immune system interactions. v. 62, p. 17–25, 1 jun. 2020.
- CHEN, S.-H. et al. Adipose-derived stem cells modulate neuroinflammation and improve functional recovery in chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. **Frontiers in Neuroscience**, v. 17, p. 1172740, 29 jun. 2023.
- CHENAF, C. et al. Prevalence of chronic pain with or without neuropathic characteristics in France using the capture-recapture method: a population-based study. **Pain**, v. 159, n. 11, p. 2394–2402, nov. 2018.
- CHENG, T.; XU, Z.; MA, X. The role of astrocytes in neuropathic pain. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 1007889, 20 set. 2022.
- CHIANG, C.-Y. et al. Feasibility of Human Amniotic Fluid Derived Stem Cells in Alleviation of Neuropathic Pain in Chronic Constrictive Injury Nerve Model. **PloS One**, v. 11, n. 7, p. e0159482, 2016.
- CHOI, J.-J. et al. Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 153, n. 2, p. 269–276, ago. 2008.
- CHOI, S. S. et al. Human Astrocytes: Secretome Profiles of Cytokines and Chemokines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e92325, 1 abr. 2014.
- CHU, M. et al. Nebulization Therapy with Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for COVID-19 Pneumonia. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, n. 6, p. 2152–2163, ago. 2022.
- CHUNG, K. et al. Sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia of the injured peripheral nerve in a rat neuropathic pain model. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 376, n. 2, p. 241–252, 9 dez. 1996.
- COBOS, E. J.; PORTILLO-SALIDO, E. “Bedside-to-Bench” Behavioral Outcomes in Animal Models of Pain: Beyond the Evaluation of Reflexes. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 6, p. 560–591, dez. 2013.
- COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 16 fev. 2017.
- CORDER, G. et al. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. **Annual review of neuroscience**, v. 41, p. 453–473, 8 jul. 2018.
- CORNESS, J. et al. Influence of leukemia inhibitory factor on galanin/GMAP and neuropeptide Y expression in mouse primary sensory neurons after axotomy. **Experimental Brain Research**, v. 112, n. 1, p. 79–88, nov. 1996.
- CURTIS, R. et al. Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. **Neuron**, v. 12, n. 1, p. 191–204, jan. 1994.
- DABROWSKA, S. et al. Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 591065, 5 fev. 2021.
- DAHLHAMER, J. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults — United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, 2018.
- DALTRO, P. S. et al. Therapy with mesenchymal stromal cells or conditioned medium reverse cardiac alterations in a high-fat diet-induced obesity model. **Cytotherapy**, v. 19, n. 10, p. 1176–1188, 1 out. 2017.
- DAMASCENO, P. K. F. et al. Genetic Engineering as a Strategy to Improve the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.

- DAOU, I. et al. Optogenetic Silencing of Nav1.8-Positive Afferents Alleviates Inflammatory and Neuropathic Pain. **eNeuro**, v. 3, n. 1, 1 jan. 2016.
- DAVIS, S. M.; PENNYPACKER, K. R. The role of the leukemia inhibitory factor receptor in neuroprotective signaling. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 183, p. 50–57, mar. 2018.
- DAVOLI-FERREIRA, M. et al. Regulatory T cells counteract neuropathic pain through inhibition of the Th1 response at the site of peripheral nerve injury. **Pain**, v. 161, n. 8, p. 1730–1743, ago. 2020.
- DE BRUIJN, I. L.; GEERTZEN, J. H. B.; DIJKSTRA, P. U. Functional outcome after peroneal nerve injury. **International Journal of Rehabilitation Research**, v. 30, n. 4, p. 333, dez. 2007.
- DE FREITAS-SUAREZ, A. et al. An Integrative Approach to the Current Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorders and the Implementation of Leukemia Inhibitor Factor as a Mediator of Neurocognitive Preservation. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 11, p. 2194, 11 nov. 2023.
- DE LOGU, F. et al. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1887, 1 dez. 2017.
- DE RIDDER, D.; ADHIA, D.; VANNESTE, S. The anatomy of pain and suffering in the brain and its clinical implications. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 130, p. 125–146, 1 nov. 2021.
- DI STEFANO, G. et al. Pharmacotherapeutic Options for Managing Neuropathic Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pain Research and Management**, v. 2021, p. e6656863, 26 abr. 2021.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.
- DOS SANTOS, G. G. L. et al. Mesenchymal stem cells reduce the oxaliplatin-induced sensory neuropathy through the reestablishment of redox homeostasis in the spinal cord. **Life Sciences**, v. 265, p. 118755, 15 jan. 2021.
- DULUC, D. et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4319–4330, 15 dez. 2007.
- DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **PAIN**, v. 132, n. 3, p. 237, dez. 2007.
- DWORKIN, R. H. et al. Diagnosis and assessment of pain associated with herpes zoster and postherpetic neuralgia. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 1 Suppl 1, p. S37-44, jan. 2008.
- EDELMANN, M. J.; KIMA, P. E. Current understanding of extracellular vesicle homing/tropism. **Zoonoses (Burlington, Mass.)**, v. 2, p. 14, 2022.
- ESCH, T.; KREAM, R. M.; STEFANO, G. B. Emerging regulatory roles of opioid peptides, endogenous morphine, and opioid receptor subtypes in immunomodulatory processes: Metabolic, behavioral, and evolutionary perspectives. **Immunology Letters**, v. 227, p. 28–33, nov. 2020.
- EVANGELISTA, A. F. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, p. 189, 22 jun. 2018.
- EVANGELISTA, A. F. **Mecanismos envolvidos no efeito terapêutico de células mesenquimais de medula óssea em modelo experimental de neuropatia diabética sensorial**. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)—Salvador: Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

- EVANGELISTA, A. F.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Cell-free therapy: a neuroregenerative approach to sensory neuropathy? **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 8, p. 1383, ago. 2019.
- FAN, M. et al. Detrimental alteration of mesenchymal stem cells by an articular inflammatory microenvironment results in deterioration of osteoarthritis. **BMC Medicine**, v. 21, n. 1, p. 215, 19 jun. 2023.
- FAN, X.-L. et al. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 14, p. 2771–2794, 2020.
- FERREIRA, G. E. et al. Efficacy, safety, and tolerability of antidepressants for pain in adults: overview of systematic reviews. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 380, p. e072415, 1 fev. 2023.
- FILIPOVIC, R.; JAKOVCEVSKI, I.; ZECEVIC, N. GRO- α and CXCR2 in the Human Fetal Brain and Multiple Sclerosis Lesions. **Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 2–4, p. 279–290, 15 set. 2003.
- FINNERUP, N. B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 2, p. 162–173, 1 fev. 2015.
- FIGLIORE, N. T. et al. Pain-resolving immune mechanisms in neuropathic pain. **Nature Reviews. Neurology**, v. 19, n. 4, p. 199–220, abr. 2023.
- FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain**, v. 122, n. 3, p. 245–257, jun. 2006.
- FONSECA-RODRIGUES, D.; ALMEIDA, A.; PINTO-RIBEIRO, F. A New Gal in Town: A Systematic Review of the Role of Galanin and Its Receptors in Experimental Pain. **Cells**, v. 11, n. 5, p. 839, 1 mar. 2022.
- FOROUZANFAR, F. et al. New approach for the treatment of neuropathic pain: Fibroblast growth factor 1 gene-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 22, n. 2, p. 295–310, fev. 2018.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, n. 3, p. 381–390, dez. 1966.
- GABAY, E. et al. Chronic blockade of interleukin-1 (IL-1) prevents and attenuates neuropathic pain behavior and spontaneous ectopic neuronal activity following nerve injury. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 15, n. 3, p. 242–248, mar. 2011.
- GALIPEAU, J. Macrophages at the nexus of mesenchymal stromal cell potency: The emerging role of chemokine cooperativity. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 39, n. 9, p. 1145–1154, set. 2021.
- GALVIN, D. A.; C, M. The role of T-lymphocytes in neuropathic pain initiation, development of chronicity and treatment. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 18, p. 100371, dez. 2021.
- GAMA, K. B. et al. Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 8179013, 2018.
- GANE, J. M.; STOCKLEY, R. A.; SAPEY, E. TNF- α Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF- α Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1079851, 2016.
- GAO, W. et al. Treg versus Th17 lymphocyte lineages are cross-regulated by LIF versus IL-6. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 8, n. 9, p. 1444–1450, 1 maio 2009.

- GAO, X. et al. Huc-MSCs-derived exosomes attenuate neuropathic pain by inhibiting activation of the TLR2/MyD88/NF- κ B signaling pathway in the spinal microglia by targeting Rsad2. **International Immunopharmacology**, v. 114, p. 109505, jan. 2023a.
- GAO, X. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles carrying miR-99b-3p restrain microglial activation and neuropathic pain by stimulating autophagy. **International Immunopharmacology**, v. 115, p. 109695, fev. 2023b.
- GAO, Y. et al. Transfer of inflammatory mitochondria via extracellular vesicles from M1 macrophages induces ferroptosis of pancreatic beta cells in acute pancreatitis. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12410, fev. 2024.
- GARDINER, N. J. et al. Expression of gp130 and leukaemia inhibitory factor receptor subunits in adult rat sensory neurones: regulation by nerve injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, n. 1, p. 100–109, out. 2002.
- GE, M. et al. Effects of mesenchymal stem cells transplantation on cognitive deficits in animal models of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **Brain and Behavior**, v. 8, n. 7, p. e00982, jul. 2018.
- GEARING, D. P. et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). **The EMBO Journal**, v. 6, n. 13, p. 3995–4002, 20 dez. 1987.
- GEORGE, A. et al. Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor-alpha, increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. **Pain**, v. 88, n. 3, p. 267–275, 1 dez. 2000.
- GHEORGHE, R.-O. et al. The Yin/Yang Balance of Communication between Sensory Neurons and Macrophages in Traumatic Peripheral Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12389, jan. 2022.
- GNECCHI, M. et al. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. Em: GNECCHI, M. (Ed.). **Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2016. p. 123–146.
- GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–231, abr. 2014.
- GUO, W. et al. Bone Marrow Stromal Cells Produce Long-Term Pain Relief in Rat Models of Persistent Pain. **Stem Cells**, v. 29, n. 8, p. 1294–1303, 1 ago. 2011.
- GUO, W. et al. Further observations on the behavioral and neural effects of bone marrow stromal cells in rodent pain models. **Molecular Pain**, v. 12, p. 1744806916658043, 1 jan. 2016.
- GUO, W. et al. In vivo immune interactions of multipotent stromal cells underlie their long-lasting pain-relieving effect. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10107, 31 ago. 2017.
- GUO, Y. et al. Small extracellular vesicles-based cell-free strategies for therapy. **MedComm**, v. 2, n. 1, p. 17–26, 2021.
- HAN, Y. et al. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 886, 13 ago. 2019.
- HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 77–88, 1 jan. 1988.
- HARRELL, C. R. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1605, 11 dez. 2019.
- HENDRY, I. A. et al. Binding and retrograde transport of leukemia inhibitory factor by the sensory nervous system. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3427–3434, set. 1992.
- HIGGINS, C. et al. Cross-sectional study examining the epidemiology of chronic pain in Nepal. **Pain Reports**, v. 8, n. 2, p. e1067, 2023.

- HIRAI, H.; KARIAN, P.; KIKYO, N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. **The Biochemical Journal**, v. 438, n. 1, p. 11–23, 15 ago. 2011.
- HMADCHA, A. et al. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 43, 2020.
- HOERDER, S. et al. Acupuncture in diabetic peripheral neuropathy-neurological outcomes of the randomized acupuncture in diabetic peripheral neuropathy trial. **World Journal of Diabetes**, v. 14, n. 12, p. 1813–1823, 15 dez. 2023.
- HSU, J.-M. et al. Locally Applied Stem Cell Exosome-Scaffold Attenuates Nerve Injury-Induced Pain in Rats. **Journal of Pain Research**, v. 13, p. 3257–3268, 2020.
- HU, Y. et al. Progress in Pathological and Therapeutic Research of HIV-Related Neuropathic Pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 43, n. 7, p. 3343–3373, out. 2023.
- HUA, T. et al. Huc-MSCs-derived exosomes attenuate inflammatory pain by regulating microglia pyroptosis and autophagy via the miR-146a-5p/TRAF6 axis. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 324, 14 jul. 2022.
- HUNG, A. L.; LIM, M.; DOSHI, T. L. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 17, p. 287–293, out. 2017.
- HUNT, C. et al. Prevalence of chronic pain after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. **Regional Anesthesia & Pain Medicine**, v. 46, n. 4, p. 328–336, 1 abr. 2021.
- IASP, I. A. FOR THE S. OF P. **Terminology | International Association for the Study of Pain**. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>>. Acesso em: 6 fev. 2024.
- IASP, I. A. FOR THE S. OF P. **IASP Guidelines for the Use of Animals in Research. International Association for the Study of Pain (IASP)**, 2023. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/resources/guidelines/iasp-guidelines-for-the-use-of-animals-in-research/>>. Acesso em: 30 jan. 2024
- IMAZIO, M. et al. Anti-interleukin-1 agents for pericarditis: a primer for cardiologists. **European Heart Journal**, v. 43, n. 31, p. 2946–2957, 14 ago. 2022.
- ISLAM, M. A. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 19, p. 6311, 30 set. 2023.
- JANSSENS, K.; SLAETS, H.; HELTINGS, N. Immunomodulatory properties of the IL-6 cytokine family in multiple sclerosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1351, p. 52–60, set. 2015.
- JEANNIN, P.; DULUC, D.; DELNESTE, Y. IL-6 and leukemia-inhibitory factor are involved in the generation of tumor-associated macrophage: regulation by IFN- γ . **Immunotherapy**, v. 3, n. 4 Suppl, p. 23–26, abr. 2011.
- JHENG, Y.-W. et al. Neuropathic Pain Affects Quality of Life in Breast Cancer Survivors with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Pain Management Nursing: Official Journal of the American Society of Pain Management Nurses**, p. S1524- 9042(23)00250–3, 25 jan. 2024.
- JL, Y. et al. Effect of sympathetic sprouting on the excitability of dorsal root ganglion neurons and afferents in a rat model of neuropathic pain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 587, p. 49–57, 8 jan. 2022.
- JIANG, X. et al. Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells alleviate skeletal muscle injury induced by acute compartment syndrome. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 1, p. 313, 15 jul. 2022.
- JIANG, Y. et al. Structural Designs and Mechanogating Mechanisms of the Mechanosensitive Piezo Channels. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 6, p. 472–488, jun. 2021.
- JORGENSEN, M. M.; DE LA PUENTE, P. Leukemia Inhibitory Factor: An Important Cytokine in Pathologies and Cancer. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 217, 27 jan. 2022.

- JOSHI, H. P. et al. Stem Cell Therapy for Modulating Neuroinflammation in Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4853, 3 maio 2021.
- KALVALA, A. K. et al. Cannabidiol-Loaded Extracellular Vesicles from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 554, 7 fev. 2023.
- KARAYANNIS, N. V. et al. Pain interference and physical function demonstrate poor longitudinal association in people living with pain: a PROMIS investigation. **PAIN**, v. 158, n. 6, p. 1063, jun. 2017.
- KARIMI, S. A.; ZAHRA, F. T.; MARTIN, L. J. IUPHAR review: Navigating the role of preclinical models in pain research. **Pharmacological Research**, v. 200, p. 107073, fev. 2024.
- KERCKHOVE, N. et al. Cross-Sectional Study of Prevalence, Characterization and Impact of Chronic Pain Disorders in Workers. **The Journal of Pain**, v. 22, n. 5, p. 520–532, 1 maio 2021.
- KEREKES, N.; LANDRY, M.; HÖKFELT, T. Leukemia inhibitory factor regulates galanin/galanin message-associated peptide expression in cultured mouse dorsal root ganglia; with a note on in situ hybridization methodology. **Neuroscience**, v. 89, n. 4, p. 1123–1134, 1999.
- KESHTKAR, S.; AZARPIRA, N.; GHAREMANI, M. H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 63, 9 mar. 2018.
- KIGUCHI, N. et al. Pharmacological Regulation of Neuropathic Pain Driven by Inflammatory Macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2296, 1 nov. 2017.
- KILPATRICK, T. J. et al. Leukaemia inhibitory factor abrogates Paclitaxel-induced axonal atrophy in the Wistar rat. **Brain Research**, v. 911, n. 2, p. 163–167, 24 ago. 2001.
- KIM, J.; HEMATTI, P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. **Experimental hematology**, v. 37, n. 12, p. 1445–1453, dez. 2009.
- KISSOON, N. R. et al. Quantitative assessment of painful diabetic peripheral neuropathy after high-frequency spinal cord stimulation: a pilot study. **Pain Medicine (Malden, Mass.)**, v. 24, n. Supplement_2, p. S41–S47, 13 out. 2023.
- KITADE, K. et al. Reduced Neuroinflammation Via Astrocytes and Neutrophils Promotes Regeneration After Spinal Cord Injury in Neonatal Mice. **Journal of Neurotrauma**, v. 40, n. 23–24, p. 2566–2579, dez. 2023.
- KOPSKY, D. J.; KEPPEL HESSELINK, J. M.; CASALE, R. Walking with Neuropathic Pain: Paradoxical Shift from Burden to Support? **Case Reports in Medicine**, v. 2015, p. 764950, 2015.
- KORBECKI, J. et al. CXCR2 Receptor: Regulation of Expression, Signal Transduction, and Involvement in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2168, 16 fev. 2022.
- KORHONEN, T. et al. Efficacy of infliximab for disc herniation-induced sciatica: one-year follow-up. **Spine**, v. 29, n. 19, p. 2115–2119, 1 out. 2004.
- KRISHNA MOHAN, G. V. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy for a Better Prognosis of Heart Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Cureus**, v. 15, n. 8, p. e43037, ago. 2023.
- LABUZ, D. et al. Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 2, p. 278–286, 2 fev. 2009.

- LABUZ, D. et al. T lymphocytes containing β -endorphin ameliorate mechanical hypersensitivity following nerve injury. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 7, p. 1045–1053, out. 2010.
- LAMBARTH, A. et al. Prevalence of chronic pain or analgesic use in children and young people and its long-term impact on substance misuse, mental illness, and prescription opioid use: a retrospective longitudinal cohort study. **The Lancet Regional Health - Europe**, v. 35, p. 100763, 15 nov. 2023.
- LAURIA, P. S. S. et al. Ayahuasca and its major component harmine promote antinociceptive effects in mouse models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 323, p. 117710, 6 abr. 2024.
- LI, K. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of the extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells on osteoarthritis via M2 macrophages. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, p. 38, 20 jan. 2022.
- LIGHTNER, A. L. et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle Infusion for the Treatment of Respiratory Failure From COVID-19: A Randomized, Placebo-Controlled Dosing Clinical Trial. **Chest**, v. 164, n. 6, p. 1444–1453, dez. 2023.
- LINS, F. S. V. et al. New Pregnane Glycosides from *Mandevilla dardanoi* and Their Anti-Inflammatory Activity. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 5992, jan. 2022.
- LIU, K. et al. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia–reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. **Microvascular Research**, v. 92, p. 10–18, 1 mar. 2014.
- LIU, L. et al. Comparative Efficacy of Multiple Variables of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of Neuropathic Pain in Rats. **Military Medicine**, v. 182, n. suppl_1, p. 175–184, 1 mar. 2017.
- LIU, P. et al. Collaborative Action of Microglia and Astrocytes Mediates Neutrophil Recruitment to the CNS to Defend against *Escherichia coli* K1 Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6540, 11 jun. 2022.
- LIU, T.; VAN ROOIJEN, N.; TRACEY, D. J. Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. **Pain**, v. 86, n. 1, p. 25–32, 1 maio 2000.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LONDON, A.; COHEN, M.; SCHWARTZ, M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 34, 8 abr. 2013.
- LOPES, D. M. et al. Sex differences in peripheral not central immune responses to pain-inducing injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16460, 28 nov. 2017.
- LOPES, F. S. R. et al. Crotalphine Modulates Microglia M1/M2 Phenotypes and Induces Spinal Analgesia Mediated by Opioid-Cannabinoid Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11571, 30 set. 2022.
- LOTFY, A.; ABOQUELLA, N. M.; WANG, H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, p. 66, 7 abr. 2023.
- LU, W. et al. Efficacy and safety of mesenchymal stem cell therapy in liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, n. 1, p. 301, 20 out. 2023.
- LU, Y. et al. Human PMSCs-derived small extracellular vesicles alleviate neuropathic pain through miR-26a-5p/Wnt5a in SNI mice model. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 221, 7 set. 2022a.

- LU, Y. et al. Human PMSCs-derived small extracellular vesicles alleviate neuropathic pain through miR-26a-5p/Wnt5a in SNI mice model. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 221, 7 set. 2022b.
- LUO, D. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a promising cell-free therapy for knee osteoarthritis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1309946, 2024.
- LUO, Z. et al. Bone Marrow Stromal Cell-Derived Exosomes Promote Muscle Healing Following Contusion Through Macrophage Polarization. **Stem Cells and Development**, v. 30, n. 3, p. 135–148, fev. 2021.
- MA, L. et al. Spinal microglial β -endorphin signaling mediates IL-10 and exenatide-induced inhibition of synaptic plasticity in neuropathic pain. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 27, n. 10, p. 1157–1172, 10 jun. 2021.
- MAGGINI, J. et al. Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9252, 16 fev. 2010.
- MANJAVACHI, M. N. et al. The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 14, n. 1, p. 23–31, jan. 2010.
- MANJAVACHI, M. N. et al. The role of keratinocyte-derived chemokine (KC) on hyperalgesia caused by peripheral nerve injury in mice. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 17–27, abr. 2014.
- MARCATO, J. DE M.; NORONHA, D. P. Indicadores bibliométricos e cientométricos em CT&I: apontamentos históricos, metodológicos e tendências de aplicação. 2013.
- MARTIN, L. F. et al. Green Light Antinociceptive and Reversal of Thermal and Mechanical Hypersensitivity Effects Rely on Endogenous Opioid System Stimulation. **The Journal of Pain**, v. 22, n. 12, p. 1646–1656, dez. 2021.
- MCLACHLAN, E. M. et al. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. **Nature**, v. 363, n. 6429, p. 543–546, jun. 1993.
- MEAADI, J. et al. The safety and efficacy of gabapentinoids in the management of neuropathic pain: a systematic review with meta-analysis of randomised controlled trials. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 45, n. 3, p. 556–565, jun. 2023.
- MENDONÇA, M. V. P. et al. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 6, p. 126, 17 nov. 2014.
- MERKLE, S. L.; SLUKA, K. A.; FREY-LAW, L. A. The interaction between pain and movement. **Journal of hand therapy : official journal of the American Society of Hand Therapists**, v. 33, n. 1, p. 60–66, 2020.
- MESSAOUDI, O. et al. Stem Cells and Extrusion 3D Printing for Hyaline Cartilage Engineering. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 2, jan. 2021.
- MICLESCU, A. et al. Chronic neuropathic pain after traumatic peripheral nerve injuries in the upper extremity: prevalence, demographic and surgical determinants, impact on health and on pain medication. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 20, n. 1, p. 95–108, 18 dez. 2019.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, abr. 2002.
- MILLIGAN, E. D. et al. Spinal Interleukin-10 Therapy to Treat Peripheral Neuropathic Pain. **Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society**, v. 15, n. 6, p. 520–526, nov. 2012.
- MINAMI, K. et al. Effects of duloxetine on pain and walking distance in neuropathic pain models via modulation of the spinal monoamine system. **European Journal of Pain**, v. 22, n. 2, p. 355–369, fev. 2018.

- MIRANPURI, G. S. et al. Role of Microglia and Astrocytes in Spinal Cord Injury Induced Neuropathic Pain. **Annals of Neurosciences**, v. 28, n. 3–4, p. 219–228, jul. 2021.
- MOCCHI, M. et al. Freeze-Dried Mesenchymal Stem Cell-Secretome Pharmaceuticalization: Optimization of Formulation and Manufacturing Process Robustness. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1129, 23 jul. 2021.
- MONTOTO-MEIJIDE, R. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Traumatic Spinal Cord Injury: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11719, 20 jul. 2023.
- MOORE, D. et al. Characterisation of the effects of pulsed radio frequency treatment of the dorsal root ganglion on cerebrospinal fluid cellular and peptide constituents in patients with chronic radicular pain: A randomised, triple-blinded, controlled trial. **Journal of Neuroimmunology**, v. 343, p. 577219, 15 jun. 2020.
- MØRCH, C. D. et al. Oxaliplatin causes increased offset analgesia during chemotherapy - a feasibility study. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 23, n. 4, p. 729–734, 26 out. 2023.
- MUSOLINO, P. L. et al. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. **Neuroscience Letters**, v. 418, n. 1, p. 97–101, 11 maio 2007.
- NÉMETH, K. 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, jan. 2009.
- NICOLA, N. A.; BABON, J. J. Leukemia inhibitory factor (LIF). **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 533–544, out. 2015.
- NIEMEYER, C. S. et al. Trigeminal Postherpetic Neuralgia: From Pathophysiology to Treatment. **Current Pain and Headache Reports**, 23 jan. 2024.
- NOVAK, P. et al. Influence of foot pain on walking ability of diabetic patients. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 36, n. 6, p. 249–252, nov. 2004.
- OBARA, I. et al. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. **Pain**, v. 141, n. 3, p. 283–291, fev. 2009.
- OLIVEIRA, A. L. L. et al. Reestablishment of Redox Homeostasis in the Nociceptive Primary Afferent as a Mechanism of Antinociception Promoted by Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Oxaliplatin-Induced Chronic Peripheral Neuropathy. **Stem Cells International**, v. 2021, p. 8815206, 2021.
- OLIVEIRA COSTA, J. F. et al. Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 469–474, 1 dez. 2014.
- OMARI, K. M. et al. Neuroprotection and Remyelination after Autoimmune Demyelination in Mice that Inducibly Overexpress CXCL1. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 164–176, 1 jan. 2009.
- ONORATO, C. et al. Navigating the mycelium patent maze: A holistic approach to patent mapping in production technologies. **World Patent Information**, v. 76, p. 102265, 1 mar. 2024.
- OZTÜRK, G. et al. Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice. **Cytokine**, v. 29, n. 1, p. 31–41, 7 jan. 2005.
- PADDA, J. et al. Stem Cell Therapy and Its Significance in Pain Management. **Cureus**, v. 13, n. 8, 2021.
- PAICIUS, R. et al. Safety and Efficacy of Intravenous ExoFlo in the Treatment of Complex Regional Pain Syndrome. **Pain Physician**, v. 26, n. 7, p. E851–E857, nov. 2023.
- PANDELANI, F. F. et al. Chronic pain: its impact on the quality of life and gender. **Frontiers in Pain Research (Lausanne, Switzerland)**, v. 4, p. 1253460, 2023.

- PANNELL, M. et al. Adoptive transfer of M2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 262, 7 out. 2016.
- PEREIRA, S. et al. Cancer-Related Neuropathic Pain, Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy and Cognitive Decline in a 5-Year Prospective Study of Patients with Breast Cancer-NEON-BC. **Healthcare (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 24, p. 3132, 9 dez. 2023.
- PHINNEY, D. G.; PITTENGER, M. F. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 35, n. 4, p. 851–858, abr. 2017.
- PITCHER, G. M.; HENRY, J. L. Governing role of primary afferent drive in increased excitation of spinal nociceptive neurons in a model of sciatic neuropathy. **Experimental Neurology**, v. 214, n. 2, p. 219–228, 1 dez. 2008.
- POKROVSKAYA, L. A. et al. Biological activity of mesenchymal stem cells secretome as a basis for cell-free therapeutic approach. **Research Results in Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 57–68, 30 mar. 2020.
- POTTORF, T. S. et al. The Role of Microglia in Neuroinflammation of the Spinal Cord after Peripheral Nerve Injury. **Cells**, v. 11, n. 13, p. 2083, 30 jun. 2022.
- RAJA, S. N. et al. The Revised IASP definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 1 set. 2020.
- RAMEZANKHANI, R. et al. Two Decades of Global Progress in Authorized Advanced Therapy Medicinal Products: An Emerging Revolution in Therapeutic Strategies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 547653, 17 dez. 2020.
- RAPOSO, G.; STAHL, P. D. Extracellular vesicles, genetic programmers. **Nature Cell Biology**, v. 26, n. 1, p. 22–23, jan. 2024.
- RATTÉ, S.; PRESCOTT, S. A. Afferent hyperexcitability in neuropathic pain and the inconvenient truth about its degeneracy. **Current Opinion in Neurobiology**, Neurobiology of disease. v. 36, p. 31–37, 1 fev. 2016.
- REINERT, J. P.; VERONIN, M. A.; MEDINA, C. Tricyclic Antidepressants in Nociceptive and Neuropathic Pain: A Review of Their Analgesic Properties in Combination With Opioids. **The Journal of Pharmacy Technology: jPT: Official Publication of the Association of Pharmacy Technicians**, v. 39, n. 1, p. 35–40, fev. 2023.
- RITTNER, H. L. et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. **Anesthesiology**, v. 95, n. 2, p. 500–508, ago. 2001.
- RITTNER, H. L. et al. Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 14, p. 2627–2629, dez. 2006.
- RIZZO, M. G. et al. Therapeutic Perspectives for Inflammation and Senescence in Osteoarthritis Using Mesenchymal Stem Cells, Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Senolytic Agents. **Cells**, v. 12, n. 10, p. 1421, 18 maio 2023.
- ROBB, K. P. et al. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. **Cytotherapy**, v. 21, n. 3, p. 289–306, mar. 2019.
- ROSEN, S. F. et al. Increased pain sensitivity and decreased opioid analgesia in T-cell-deficient mice and implications for sex differences. **Pain**, v. 160, n. 2, p. 358–366, fev. 2019.
- SAGARADZE, G.; MONAKOVA, A.; EFIMENKO, A. Potency Assays for Mesenchymal Stromal Cell Secretome-Based Products for Tissue Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9379, 27 maio 2023.
- SANSONE, P. et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 43, p. E9066–E9075, 24 out. 2017.

- SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. The NOD2 signaling in peripheral macrophages contributes to neuropathic pain development. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 102–116, jan. 2019.
- SANTOS, G. C. et al. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Overexpression Increases the Angiogenic Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 778, 2020.
- SANTOS, J. R.; ROCHA, A. M. Perfil das Bases de Dados Científicas e Tecnológicas Utilizadas por Pesquisadores Brasileiros em Estudos nas áreas de Ciências da Vida. **Cadernos de Prospecção**, v. 14, n. 3, p. 784–784, 1 jul. 2021.
- SCHÄFER, S. et al. Influence of intrathecal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on spinal inflammation and pain hypersensitivity in a rat model of peripheral nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 157, 12 set. 2014.
- SCHEFF, N. N. et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor-Induced Neutrophil Recruitment Provides Opioid-Mediated Endogenous Anti-nociception in Female Mice With Oral Squamous Cell Carcinoma. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 217, 2019.
- SCOTT, R. L. et al. Expression of leukemia inhibitory factor receptor mRNA in sensory dorsal root ganglion and spinal motor neurons of the neonatal rat. **Neuroscience Letters**, v. 295, n. 1–2, p. 49–53, 1 dez. 2000.
- 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, 1 nov. 1990.
- SEZER, G. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells alleviate paclitaxel-induced mechanical allodynia in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 36, n. 12, p. e23207, dez. 2022.
- SHAHOROR, R. A. et al. Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: The Next Generation of Stem Cell-Based Therapy for TBI. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4051, 5 jun. 2020.
- SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The Cytokine Network of Wallerian Degeneration: Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 α , and Interleukin-1 β . **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3052–3060, 15 abr. 2002.
- SHAMMAA, R. et al. Mesenchymal Stem Cells Beyond Regenerative Medicine. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.
- SHELASH AL-HAWARY, S. I. et al. The microRNAs (miRs) overexpressing mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in neurological disorders; hope or hype. **Biotechnology Progress**, v. 39, n. 6, p. e3383, 2023.
- SHEN, K.-F. et al. Interleukin-10 down-regulates voltage gated sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. **Experimental Neurology**, v. 247, p. 466–475, set. 2013.
- SHI, J.-T. et al. Local analgesia of electroacupuncture is mediated by the recruitment of neutrophils and released β -endorphins. **Pain**, v. 164, n. 9, p. 1965–1975, 1 set. 2023.
- SHIMOJI, K.; KUROKAWA, S. Anatomical Physiology of Pain. Em: SHIMOJI, K.; NADER, A.; HAMANN, W. (Eds.). **Chronic Pain Management in General and Hospital Practice**. Singapore: Springer, 2021. p. 21–42.
- SHIUE, S.-J. et al. Mesenchymal stem cell exosomes as a cell-free therapy for nerve injury-induced pain in rats. **PAIN**, v. 160, n. 1, p. 210, jan. 2019.
- SILVA, C. E. A.; GUIMARÃES, R. M.; CUNHA, T. M. Sensory neuron-associated macrophages as novel modulators of neuropathic pain. **Pain Reports**, v. 6, n. 1, p. e873, 9 mar. 2021.
- SILVA, D. N. et al. Intramyocardial transplantation of cardiac mesenchymal stem cells reduces myocarditis in a model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 4, p. 81, 1 jul. 2014.

- SILVA, D. N. et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Exhibit Enhanced Immunomodulatory Actions Through the Recruitment of Suppressor Cells in Experimental Chagas Disease Cardiomyopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.
- SILVA, G. S. D. A. **POTENCIAL TERAPÊUTICO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS NA NEUROPATIA SENSORIAL DIABÉTICA EM CAMUNDONGOS**. Dissertação (Mestrado em Farmácia)—Salvador: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - Programa de Pós-graduação em Farmácia, 2021.
- SILVA, R. et al. CD206+/MHCII⁻ macrophage accumulation at nerve injury site correlates with attenuation of allodynia in TASTPM mouse model of Alzheimer's disease. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 26, p. 100548, 1 dez. 2022.
- SILVA, R. L. et al. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: Role in peripheral and central sensitization. **Neurobiology of Disease**, v. 105, p. 109–116, set. 2017.
- SINICA, V.; VLACHOVÁ, V. Transient receptor potential ankyrin 1 channel: An evolutionarily tuned thermosensor. **Physiological Research**, v. 70, n. 3, p. 363–381, 12 jul. 2021.
- SINISCALCO, D. Transplantation of human mesenchymal stem cells in the study of neuropathic pain. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 617, p. 337–345, 2010.
- 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**, v. 5, p. 79, 2011.
- SMITH, P. A. Neuropathic pain; what we know and what we should do about it. **Frontiers in Pain Research**, v. 4, p. 1220034, 22 set. 2023.
- SMOLINSKA, V. et al. Stem Cells and Their Derivatives: An Implication for the Regeneration of Nonunion Fractures. **Cell Transplantation**, v. 32, p. 09636897231183530, 18 jul. 2023.
- SMOLINSKÁ, V.; BOHÁČ, M.; DANÍŠOVIČ, Ľ. Current Status of the Applications of Conditioned Media Derived from Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. **Physiological Research**, v. 72, n. Suppl 3, p. S233–S245, 31 out. 2023.
- SOKIC-MILUTINOVIC, A.; MILOSAVLJEVIC, T. IBD: From conventional immunosuppression to biological therapy. **Digestive Diseases (Basel, Switzerland)**, 14 dez. 2023.
- SOMMER, C.; SCHÄFERS, M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. **Brain Research**, v. 784, n. 1–2, p. 154–162, 16 fev. 1998.
- SONG, K. et al. Microneedle-mediated delivery of Ziconotide-loaded liposomes fused with exosomes for analgesia. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 356, p. 448–462, abr. 2023.
- SORGE, R. E. et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1081–1083, ago. 2015.
- SORKIN, L. S. et al. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. **Neuroscience**, v. 81, n. 1, p. 255–262, nov. 1997.
- SPOFFORD, C. M. et al. Evaluation of leukemia inhibitory factor (LIF) in a rat model of postoperative pain. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 7, p. 819–832, jul. 2011.
- STAEHELIN JENSEN, T. The pathogenesis of painful diabetic neuropathy and clinical presentation. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 206 Suppl 1, p. 110753, dez. 2023.

- STOMPÓR, M. et al. Prevalence of Chronic Pain, Particularly with Neuropathic Component, and Its Effect on Overall Functioning of Elderly Patients. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 25, p. 2695–2701, 12 abr. 2019.
- STUBHAUG, A. et al. The costs of chronic pain-Long-term estimates. **European Journal of Pain (London, England)**, 12 jan. 2024.
- SU, P.-Y. P. et al. The Role of Neuro-Immune Interactions in Chronic Pain: Implications for Clinical Practice. **Journal of Pain Research**, v. 15, p. 2223–2248, 2022.
- SUMAN, S. et al. Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1201, p. 1–22, 2019a.
- SUMAN, S. et al. Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine. Em: RATAJCZAK, M. Z. (Ed.). **Stem Cells: Therapeutic Applications**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2019b. p. 1–22.
- SUN, Y. et al. Intrathecal administration of human bone marrow mesenchymal stem cells genetically modified with human proenkephalin gene decrease nociceptive pain in neuropathic rats. **Molecular Pain**, v. 13, p. 1744806917701445, jan. 2017.
- TAKEDA, Y. et al. Nanobiotechnology as an emerging research domain from nanotechnology: A bibliometric approach. **Scientometrics**, v. 80, n. 1, p. 23–38, 20 mar. 2009.
- TAVAKKOLI, S. et al. EL4-derived Exosomes Carry Functional TNF-related Apoptosis-inducing Ligand that are Able to Induce Apoptosis and Necrosis in the Target Cells. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 207–215, 2020.
- TAVARES, I.; COSTA-PEREIRA, J. T.; MARTINS, I. Monoaminergic and Opioidergic Modulation of Brainstem Circuits: New Insights Into the Clinical Challenges of Pain Treatment? **Frontiers in Pain Research**, v. 2, p. 696515, 5 jul. 2021.
- TENG, Y. et al. Intrathecal injection of bone marrow stromal cells attenuates neuropathic pain via inhibition of P2X4R in spinal cord microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 271, 17 dez. 2019.
- THAM, S. et al. Leukemia inhibitory factor enhances the regeneration of transected rat sciatic nerve and the function of reinnervated muscle. **Journal of Neuroscience Research**, v. 47, n. 2, p. 208–215, 15 jan. 1997.
- THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.
- THOMPSON, S. W.; DRAY, A.; URBAN, L. Leukemia inhibitory factor induces mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in the juvenile rat. **Neuroscience**, v. 71, n. 4, p. 1091–1094, abr. 1996.
- TIAN, J. et al. Intrathecal Injection of SIRT1-modified Human Mesenchymal Stem Cells Alleviates Neuropathic Pain in Rat. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n. 5, p. 972–980, 1 maio 2021.
- TIAN, Z. et al. Chapter One - Introduction to stem cells. Em: HIGUCHI, A.; ZHOU, Y.; CHIOU, S.-H. (Eds.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. Stem Cell in Medicine. [s.l.] Academic Press, 2023. v. 199p. 3–32.
- TOGIOKA, B. M. et al. Frequency and Characteristics of Postoperative Neuropathy in Individuals on Gender-Affirming Hormone Therapy Undergoing Gender Affirmation Surgery: A Retrospective Cohort Study. **Cureus**, v. 15, n. 10, p. e47988, out. 2023.

- TOTH, C.; LANDER, J.; WIEBE, S. The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population. **Pain Medicine (Malden, Mass.)**, v. 10, n. 5, p. 918–929, 2009.
- TRAN, H. et al. Descending mechanism by which medial prefrontal cortex endocannabinoid signaling controls the development of neuropathic pain and neuronal activity of dorsal root ganglion. **Pain**, v. 165, n. 1, p. 102–114, 1 jan. 2024.
- TU, H. J. et al. Leukemia inhibitory factor (LIF) potentiates antinociception activity and inhibits tolerance induction of opioids. **British Journal of Anaesthesia**, v. 117, n. 4, p. 512–520, 1 out. 2016.
- VELIKIC, G. et al. Harnessing the Stem Cell Niche in Regenerative Medicine: Innovative Avenue to Combat Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, 2024.
- VERA-PORTOCARRERO, L. P. et al. Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization. **Neuroscience**, v. 140, n. 4, p. 1311–1320, 21 jul. 2006.
- VIDERMAN, D. et al. The Prevalence of Pain in Chronic Diseases: An Umbrella Review of Systematic Reviews. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 23, p. 7302, 25 nov. 2023.
- VILLARREAL-MARTÍNEZ, L. et al. Stem Cell Therapy in the Treatment of Patients With Autism Spectrum Disorder: a Systematic Review and Meta-analysis. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, n. 1, p. 155–164, jan. 2022.
- VIZOSO, F. J. et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1852, 25 ago. 2017.
- VRINTEN, D. H.; HAMERS, F. F. T. “CatWalk” automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. **Pain**, v. 102, n. 1–2, p. 203–209, mar. 2003.
- WALTERS, E. T. Exaptation and Evolutionary Adaptation in Nociceptor Mechanisms Driving Persistent Pain. **Brain, Behavior and Evolution**, 30 nov. 2023.
- WANG, J. et al. Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. **Tissue & Cell**, v. 64, p. 101330, jun. 2020a.
- WANG, J. et al. Leukemia inhibitory factor, a double-edged sword with therapeutic implications in human diseases. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 31, n. 2, p. 331–343, 1 fev. 2023.
- WANG, Q. et al. Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Neuropathic Pain Induced By Peripheral Nerve Injury in Animal Models: A Systematic Review. **Stem Cells and Development**, v. 29, n. 22, p. 1420–1428, 15 nov. 2020b.
- WANG, R. et al. Stem cell therapy for Crohn’s disease: systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 463, 18 ago. 2021.
- WANG, X. et al. Small Extracellular Vesicles Released from miR-211-5p-Overexpressed Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Spinal Cord Injuries in Rats. **eNeuro**, v. 11, n. 2, p. ENEURO.0361-23.2023, fev. 2024.
- WEBER, M. A. et al. Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 85, n. 2, p. 276–284, fev. 2005.
- WEI, H. et al. Reduced mechanical hypersensitivity by inhibition of the amygdala in experimental neuropathy: Sexually dimorphic contribution of spinal neurotransmitter receptors. **Brain Research**, v. 1797, p. 148128, 15 dez. 2022.

- WELSH, J. A. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12404, fev. 2024.
- WEST, S. J. et al. Circuitry and plasticity of the dorsal horn – Toward a better understanding of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 300, p. 254–275, ago. 2015.
- WORTON, R. G.; MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 74, n. 2, p. 171–182, 1969.
- WU, J. et al. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 8, p. 4325–4332, 15 out. 1993.
- WYSE, R. D.; DUNBAR, G. L.; ROSSIGNOL, J. Use of Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells to Treat Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 1719–1745, 23 jan. 2014.
- XIUMEI, G. et al. Clinical effect of acupuncture along fascia, meridians, and nerves combined with ultrasound-guided paravertebral nerve block in the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized parallel-controlled study. **Journal of Traditional Chinese Medicine = Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan**, v. 43, n. 2, p. 359–364, abr. 2023.
- XU, Y. et al. Gait Assessment of Pain and Analgesics: Comparison of the DigiGait™ and CatWalk™ Gait Imaging Systems. **Neuroscience Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 401–418, jun. 2019.
- XU, Z. et al. Pain Relief Dependent on IL-17-CD4+ T Cell-β-Endorphin Axis in Rat Model of Brachial Plexus Root Avulsion After Electroacupuncture Therapy. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 596780, 2020.
- YAMANAKA, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. **Cell Stem Cell**, v. 27, n. 4, p. 523–531, 1 out. 2020.
- YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p. 27066, 1 jan. 2015.
- YANG, G. et al. Immunomodulatory Mechanisms and Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 19, n. 5, p. 1214–1231, 2023.
- YAO, Y. et al. Alendronate Attenuates Spinal Microglial Activation and Neuropathic Pain. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 8, p. 889–903, 1 ago. 2016.
- YATZIV, S.-L.; DEVOR, M. Suppression of neuropathic pain by selective silencing of dorsal root ganglion ectopia using nonblocking concentrations of lidocaine. **Pain**, v. 160, n. 9, p. 2105–2114, set. 2019.
- YEH, J. J.; FERNANDEZ, D. Patent prosecution strategies for biotechnological inventions. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 2, n. 6, p. 697–702, dez. 2004.
- YEROFEYEVA, A. V. et al. The role of cannabinoid CB1 receptors in the antinociceptive and reparative actions of mesenchymal stem cells in rats with peripheral neuropathic pain. **Ibrain**, v. 9, n. 3, p. 245–257, 24 ago. 2023.
- YOU, J.; SHIN, Y. K.; SEOL, G. H. Alleviating effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) and its major components on postherpetic pain: a randomized blinded controlled trial. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 24, n. 1, p. 54, 24 jan. 2024.
- YU, H. et al. Analgesia for neuropathic pain by dorsal root ganglion transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells: initial results. **Molecular Pain**, v. 11, p. 5, 12 fev. 2015.
- YU, S. et al. Tumor-derived LIF promotes chemoresistance via activating tumor-associated macrophages in gastric cancers. **Experimental Cell Research**, v. 406, n. 1, p. 112734, 1 set. 2021.
- YU, X. et al. Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 264, 14 jan. 2020.

- YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, p. 173090, 15 jun. 2020.
- ZAKRZEWSKI, W. et al. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, p. 68, 26 fev. 2019.
- ZARRABI, M. et al. Allogenic mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles in COVID-19 induced ARDS: a randomized controlled trial. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, n. 1, p. 169, 26 jun. 2023.
- ZELENKA, M.; SCHÄFERS, M.; SOMMER, C. Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 257–263, ago. 2005.
- ZHAI, F.-J. et al. Involvement of Opioid Peptides in the Analgesic Effect of Spinal Cord Stimulation in a Rat Model of Neuropathic Pain. **Neuroscience Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 403–416, abr. 2022.
- ZHAI, X. et al. Extracellular vesicles derived from CD73 modified human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate inflammation after spinal cord injury. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, p. 274, 8 set. 2021.
- ZHANG, Q. et al. Brain Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Transfected Bone Mesenchymal Stem Cells for the Repair of Periphery Nerve Injury. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.
- ZHANG, X.-L. et al. Stem Cell-Based Therapy for Experimental Ischemic Stroke: A Preclinical Systematic Review. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 628908, 2021.
- ZHAO, J. et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. **Cardiovascular Research**, v. 115, n. 7, p. 1205–1216, 1 jun. 2019.
- ZHOU, H. et al. MSC based gene delivery methods and strategies improve the therapeutic efficacy of neurological diseases. **Bioactive Materials**, v. 23, p. 409–437, maio 2023.
- ZHOU, Y.-Q. et al. Minocycline as a promising therapeutic strategy for chronic pain. **Pharmacological Research**, v. 134, p. 305–310, ago. 2018.
- ZHU, X. et al. Somatosensory cortex and central amygdala regulate neuropathic pain-mediated peripheral immune response via vagal projections to the spleen. **Nature Neuroscience**, 30 jan. 2024.
- ZIS, P. et al. Prevalence and Determinants of Chronic Pain Post-COVID; Cross-Sectional Study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 19, p. 5569, 22 set. 2022.

2. CAPÍTULO 2

Avaliação do efeito de uma linhagem de células-tronco mesenquimais super-expressando LIF e suas vesículas extracelulares na dor neuropática experimental

2.1. INTRODUÇÃO

Os efeitos regenerativos e imunomoduladores das células-tronco mesenquimais tem sido amplamente explorados quanto ao seu potencial terapêutico em doenças sem tratamento efetivo disponível, especialmente aquelas que cursam com perda de função tecidual ou degeneração (SHAMMAA et al., 2020). Recentemente tem havido, entretanto, uma mudança de perspectiva e abordagem em relação ao uso de células-tronco na medicina regenerativa (SHAMMAA et al., 2020). Mais do que sua aplicabilidade direta como agente terapêutico, as células mesenquimais têm sido consideradas como uma plataforma terapêutica para o desenvolvimento de novas terapias, como na produção de terapias *cell-free* (GUO et al., 2021; PHINNEY; PITTENGER, 2017; POKROVSKAYA et al., 2020), engenharia genética (DAMASCENO et al., 2020; WYSE; DUNBAR; ROSSIGNOL, 2014) ou bioengenharia tecidual (SMOLINSKA et al., 2023).

A engenharia genética de células-tronco pode ser realizada com diversos objetivos, incluindo o uso da sua capacidade de “homing” para a entrega local de genes terapêuticos superexpressos (HMADCHA et al., 2020), bem como uma estratégia para melhorar a eficácia terapêutica das células-tronco mesenquimais (DAMASCENO et al., 2020).

O entendimento mais recente sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos terapêuticos das células mesenquimais aponta um envolvimento majoritário da liberação de fatores parácrinos (GAMA et al., 2018; GNECCHI et al., 2016), vesículas extracelulares (AGUIAR KOGA et al., 2023; DABROWSKA et al., 2021) e da transferência mitocondrial (LIU et al., 2014). Desta forma, uma abordagem que tem sido explorada para potencializar os efeitos terapêuticos das células mesenquimais é utilizar a engenharia genética para produzir células capazes de superexpressar fatores específicos com propriedades bioativas.

Alguns dos benefícios da manipulação genética de células mesenquimais incluem a possibilidade de alcançar um tratamento eficaz com uma dose menor de células, devido ao grande aumento de fatores terapêuticos expressos pelas células (CHOI et al., 2008; YU et al., 2015); à potencialização de efeitos subótimos, como no câncer e quando o microambiente da

doença impacta na ação da células (DAMASCENO et al., 2020; FAN et al., 2023); e à seleção de fatores terapêuticos específicos que se relacionem com a etiologia da doença a ser tratada (WYSE; DUNBAR; ROSSIGNOL, 2014). Nesse sentido, células mesenquimais modificadas geneticamente para superexpressar uma ampla gama de fatores têm sido investigadas quanto à aplicabilidade no tratamento do câncer, doenças cardiovasculares, respiratórias, gastrointestinais, renais e hepáticas, além de desordens neurológicas (DAMASCENO et al., 2020). Levando em consideração que as vesículas extracelulares refletem o perfil secretório das células de origem, a bioengenharia de células mesenquimais também já foi aplicada para gerar vesículas extracelulares modificadas geneticamente (WANG et al., 2024).

A engenharia genética de células mesenquimais também tem sido utilizada com a finalidade de aprimorar o efeito analgésico das células mesenquimais em síndromes de dor neuropática. Outros grupos de pesquisa utilizaram a transfecção genética para obter células mesenquimais superexpressando fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (YU et al., 2015), gene da proencefalina humana (SUN et al., 2017) e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF-1) (FOROUZANFAR et al., 2018), e demonstraram que o efeito antinociceptivo dessas células é superior ao de células mesenquimais selvagens em modelos de dor neuropática em roedores. Com base nesses achados, é possível propor que diversos fatores endógenos que contribuam para analgesia ou neuroregeneração em estados de dor neuropática podem ter seu uso terapêutico potencializado pela engenharia genética de células mesenquimais.

O fator inibidor de leucemia (LIF) é uma citocina pleiotrópica associada tanto a processos fisiológicos como patológicos, e suas propriedades biológicas e potenciais aplicações terapêuticas têm sido extensamente investigadas (NICOLA; BABON, 2015; SANTOS et al., 2020; TU et al., 2016). LIF foi inicialmente identificada como um inibidor da proliferação de uma linhagem celular mielóide leucêmica (GEARING et al., 1987), entretanto ao longo dos anos foi identificado o envolvimento desta citocina na regulação da auto-renovação e pluripotência das células-tronco embrionárias (HIRAI; KARIAN; KIKYO, 2011; NICOLA; BABON, 2015), em processos fisiopatológicos relacionados ao câncer (JORGENSEN; DE LA PUENTE, 2022; WANG et al., 2023), além de seus efeitos neuroprotetores (DAVIS; PENNYPACKER, 2018; DE FREITAS-SUAREZ et al., 2023) e imunomoduladores (JANSSENS; SLAETS; HELLINGS, 2015).

Adicionalmente, LIF parece ter um papel na fisiopatologia da dor. Receptores de LIF estão presentes em neurônio sensoriais e células imunes envolvidos em vias de ativação e/ou resolução da dor (DAVOLI-FERREIRA et al., 2020; DULUC et al., 2007; GAO et al., 2009; GARDINER et al., 2002; SCOTT et al., 2000). Banner e colaboradores (1998) identificaram a

contribuição de LIF para a sensibilização nociceptiva no modelo de dor inflamatória induzido por CFA. Por outro lado, LIF potencializa a ação analgésica da morfina e retarda o desenvolvimento de tolerância (TU et al., 2016), sugerindo potencial analgésico. Em adição, LIF induz o aumento dos níveis de galanina nos gânglios das raízes dorsais após o dano ao nervo (CORNESS et al., 1996; KEREKES; LANDRY; HÖKFELT, 1999). A galanina é um peptídeo com ação antinociceptiva e neuroregenerativa, com ações espinais e supraespinhais (FONSECA-RODRIGUES; ALMEIDA; PINTO-RIBEIRO, 2022), e o aumento de seus níveis, mediado por LIF, pode contribuir para a melhora da dor neuropática.

Além das propriedades de LIF modulando a nocicepção, diversos trabalhos indicam que LIF parece estar intimamente relacionada com a regeneração e o reestabelecimento funcional do nervo sensorial após algum dano (CAFFERTY et al., 2001; CURTIS et al., 1994; HENDRY et al., 1992; THAM et al., 1997). No modelo de neuropatia induzida por cisplatina em camundongos LIF melhorou as alterações funcionais e morfológicas, especialmente aquelas associados às células de Schwann, sensorial (OZTÜRK et al., 2005). Corroborando este efeito, a administração sistêmica de LIF inibe a atrofia axonal induzida por paclitaxel em ratos (KILPATRICK et al., 2001) no rato Wistar. LIF também melhorou a velocidade de condução nervosa, o diâmetro do axônio mielinizado e o número de axônios mielinizados em ratos 6 e 12 semanas após a transecção do nervo isquiático (THAM et al., 1997).

O efeito imunomodulador de LIF também é um componente importante para o alívio da dor neuropática. No contexto da dor neuropática, a sinalização neuroimune possui um papel vital tanto no estabelecimento como na resolução da dor (FIORE et al., 2023; SU et al., 2022). Dados da literatura sugerem que LIF promove a expansão de células T regulatórias (GAO et al., 2009; JANSSENS; SLAETS; HELLINGS, 2015), cujas ações imunomoduladoras e antinociceptivas na dor neuropática envolvem a produção de IL-10, que regula a resposta de células CD4⁺TH₁ (DAVOLI-FERREIRA et al., 2020) e a polarização de macrófagos para um perfil M2 anti-inflamatório (CHEN et al., 2022). Adicionalmente, LIF também está associado com a diferenciação de monócitos/macrófagos humanos no subgrupo M2 anti-inflamatório, que produz altos níveis de IL-10 e TGF- β e baixos níveis de IL-12 (DULUC et al., 2007; JEANNIN; DULUC; DELNESTE, 2011; YU et al., 2021).

Com base no acima exposto e levando em consideração que as propriedades imunomoduladoras, antinociceptivas e neuroregenerativas de LIF podem trazer benefício terapêutico durante as síndromes de dor neuropática, o presente estudo foi delineado para investigar se a superexpressão desta citocina pode otimizar os efeitos terapêuticos de células mesenquimais na dor neuropática experimental.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos envolvendo materiais derivados de humanos foram aprovados e seguiram as diretrizes do Comitê Institucional de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ 519.235). Os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – IGM/FIOCRUZ (020/2022) e realizados conforme as recomendações da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2023).

2.2.2. TRANSDUÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DE CORDÃO UMBILICAL

As células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical utilizadas neste projeto foram gentilmente cedidas pela Dra. Rosália Mendes Otero a partir do biorrepositório do projeto “Otimização da Produção de Embriões in Vitro Utilizando Co-Culturas de Células-Tronco Mesenquimais” (CAAE: 22734213.0.3001.5275). Os protocolos de obtenção dessas células foram descritos por BODART-SANTOS et al. (2019). As células-tronco mesenquimais humanas superexpressando LIF (MSC-LIF) foram produzidas seguindo o protocolo descrito por Santos e colaboradores (2020) e gentilmente cedidas pela Dra. Milena Botelho Pereira Soares (FIOCRUZ/BA). As culturas de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical (MSC-WT) e células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical superexpressando LIF (MSC-LIF) foram mantidas em meio DMEM suplementado com 15% de SBF, a 37°C com 5% de CO₂.

2.2.3. CARACTERIZAÇÃO DAS MSC

As MSC foram caracterizadas por citometria de fluxo, para avaliação de marcadores relacionados a células mesenquimais, e pela sua capacidade de diferenciação in vitro nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, como recomendado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica (DOMINICI et al., 2006).

2.2.3.1. *Citometria de fluxo*

A caracterização das MSC também foi realizada pela identificação de marcadores de superfície utilizando o kit de marcação (Human MSC Analysis Kit, BD Biosciences) que inclui

o painel proposto pelo ISCT (DOMINICI et al., 2006), de acordo com as recomendações do fabricante. MSC na 10ª passagem, foram tripsinizadas e a suspensão celular foi lavada 2 vezes com PBS 1x. Um total de 5×10^6 células foram incubada a 4°C por 30 minutos: 1. Coquetel positivo: Coquetel para identificar positivamente MSC contendo CD90 (Clone: 5E10), CD105 (Clone: 266), CD73 (Clone: AD2); ou 2. Coquetel negativo: Coquetel para identificar potenciais contaminantes contendo CD34 (Clone:581), CD11b (Clone: ICRF44), CD19 (Clone: HIB19), CD45 (Clone: HI30), HLA-DR (Clone: G46-6); ou 3. Anticorpos para compensação: CD90, CD105, CD73 e CD44. Após incubação, foram realizadas mais duas lavagens com PBS 1x e, em seguida, realizada a aquisição dos dados e análise no citômetro de fluxo BD LRS Fortessa (BD Biosciences). Pelo menos 50.000 eventos foram coletados e analisados.

2.2.3.2. Diferenciação *in vitro*

A capacidade de diferenciação das MSC na décima passagem em adipócitos, condrócitos e osteócitos, foi investigada com a utilização de meio suplementado com fatores indutores de diferenciação, como previamente descrito (EVANGELISTA, 2019).

Para a diferenciação adipogênica, MSC foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo (1×10^4 células/poço). Após atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e substituído por meio de indução adipogênica StemPro Adipogenesis Differentiation Kit (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado com meio completo. Para observar a deposição de gordura, após quinze dias em cultivo, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. Em seguida, foram coradas com solução de Oil red por 5 minutos e em seguidas lavadas com álcool 70%. As imagens foram capturadas por microscópio AX70 (OLYMPUS) utilizando o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

Para a diferenciação condrogênica, MSC foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo (10^5 células/poço). Após atingirem 40-50% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas, durante 21 dias, com meio de diferenciação condrogênica Stem Pro Chondrogenesis Differentiation Kit (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio

completo. Para avaliação da síntese de proteoglicanos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com solução de Alcian Blue (GIBCO) em HCl 0,1N por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com solução de HCl 0,1N e, em seguida, foi adicionada água destilada para a neutralização da acidez. As imagens das células diferenciadas em condrócitos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

Para diferenciação osteogênica, 5×10^5 MSC foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas de 13 mm em meio completo. Ao atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas por até 14 dias, com meio de diferenciação osteogênica Stem Pro Osteogenesis Differentiation Kit (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias e a evolução da diferenciação foi acompanhada em microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo. A deposição de cálcio foi observada pela coloração com vermelho de Alizarina 2%. Após fixação em paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavagem com água destilada, as células foram coradas com solução de vermelho de Alizarina 2% por 3 minutos e, em seguida, foram realizadas duas lavagens com água destilada. As imagens das células diferenciadas em osteoblastos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

2.2.4. ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSC

MSC-WT ou MSC-LIF foram cultivadas até atingir a de confluência de 90% foram lavadas com solução salina estéril e cultivadas por 48 horas em meio DMEM sem soro. O sobrenadante foi coletado e submetido a centrifugações diferenciais para o isolamento das VE. Inicialmente, realizou-se uma centrifugação a $700 \times g$ por 5 minutos a 8°C para eliminar o debri celular, seguida de uma centrifugação a $4.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C . Após a realização de duas centrifugações diferenciais, o sobrenadante obtido foi ultracentrifugado a $100.000 \times g$ por 1h20m a 4°C , utilizando uma ultracentrífuga Optima XE-100, rotor SW32.1 (Beckman Coulter). Após a ultracentrifugação para a sedimentação das vesículas extracelulares, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de vesículas ressuspendido em solução salina. Foram adicionados 100 μL de PBS, seguido da agitação vigorosa em vórtex, o procedimento foi repetido 3 vezes para máxima recuperação das VE. O material obtido foi armazenado em ultrafreezer -80°C até posterior utilização (EVANGELISTA, 2019).

2.2.5. CARACTERIZAÇÃO DAS VE

As VE foram caracterizadas seguindo as recomendações da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (THÉRY et al., 2018). A análise de rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle tracking analysis* - NTA) foi utilizada para obter informações sobre tamanho e concentração das VE. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) informou acerca do tamanho e morfologia das vesículas. Marcadores de superfície foram caracterizados por Dotblot. Os detalhes metodológicos estão descritos abaixo.

2.2.5.1. Análise de rastreamento de nanopartículas

A análise de rastreamento de nanopartículas é um método de quantificação direta de partículas em suspensão que se baseia nas propriedades de dispersão da luz e no movimento browniano das partículas. As amostras de VE foram analisadas no equipamento Nanosight modelo NS300 (Malvern Panalytical, Reino Unido), equipado com um compartimento de amostras e um laser de 532 nm. Inicialmente, as vesículas foram diluídas (1:50) em água ultrapura e injetadas no compartimento de amostras com o auxílio de um injetor automático. O software utilizado para a captura e análise dos dados foi a NTA 3.4 Build 3.4.4. Para a determinação da média de tamanho de partícula e concentração da amostra (partículas/mL), as partículas foram injetadas em fluxo contínuo e analisadas a partir das gravações de 5 registros com 30 segundos cada.

2.2.5.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Informações sobre a morfologia das vesículas extracelulares foram obtidas por meio da microscopia eletrônica de transmissão. Vinte microlitros de amostras de VE foram aplicados em uma grade de cobre revestida com carbono/formvar e mantidos por 5 min para adsorção. A amostra não adsorvida foi removida com auxílio de papel filtro e em seguida foi contrastada com 10 µL citrato de uranila aquoso a 2% por 30 segundos. O excesso foi removido novamente com de papel filtro e a grade foi reservada por 24h para secar ao ar. As amostras foram observadas em microscópio JEOL 1230 (JEOL, Tóquio, Japão) a 80 kV, como descrito previamente, com adaptações (EVANGELISTA, 2019).

2.2.5.3. Dotblot

A caracterização da composição proteica foi realizada por Dotblot utilizando marcadores enriquecidos em VE, como descrito previamente, com adaptações (TAVAKKOLI et al., 2020). A presença de proteínas transmembrana ou ancoradas a

glicosilfosfatidilinosito associadas à membrana plasmática (CD9 e CD81) e de proteínas citosólicas recuperadas em vesículas extracelulares (TSG101) foi avaliada, como recomendado pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (THÉRY et al., 2018). Para execução da análise por Dotblot, 50 µL das amostras foram adicionadas a uma membrana de nitrocelulose com tamanho de poro de 0,45 µm (BioRad, CA, Estados Unidos). Após a secagem completa das amostras, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado a 5%. A membrana foi incubada com anticorpos monoclonais primários CD9 anti-humano (1:1000; Invitrogen, MA, Estados Unidos), CD81 anti-humano (1:1000; Invitrogen) ou TSG101 anti-humano (1:1000; Invitrogen), durante a noite a 4 °C. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com Tris adicionada de 0,1% de Tween-20 e incubadas com o anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo conjugada com HRP (Santa Cruz, TX, Estados Unidos) por 1 hora em temperatura ambiente com balanço suave. Após a lavagem, a detecção foi realizada por quimioluminescência utilizando o substrato Clarity Western ECL Substrate (BioRad) de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram capturadas com um fotodocumentador iBright 1500 (Thermo Fisher).

2.2.6. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Uma possível citotoxicidade das VE sobre os macrófagos murinos da linhagem J774 estimulados com LPS e IFN- γ foi investigada no ensaio de Alamar Blue, como descrito previamente (LINS et al., 2022). Os macrófagos foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO, Waltham, MA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; GIBCO) e 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (GIBCO). Após a dissociação enzimática das células utilizando tripsina (GIBCO), os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço), e incubados por 2h a 37 °C e 5% CO₂. Após esse tempo, as células foram estimuladas com LPS (500 ng/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e IFN- γ (5 ng/ml; Sigma) e as VE-LIF foram adicionadas em concentrações seriadas em triplicatas e incubadas por 24h. Posteriormente, 20 µL de Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA) foi adicionado a cada poço e as amostras foram incubadas por 4h a 6h. Leituras colorimétricas foram realizadas a 570 e 600 nm. Tween 20 (Thermo Scientific) a 20% foi utilizado como controle positivo.

2.2.7. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS ATIVADOS - ELISA (*ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

Para a determinação dos níveis citocinas, células J774 foram plaqueadas em placas de 96 poços (2×10^5 células/poço) em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (GIBCO) durante 2h a 37 °C e 5% CO₂. As células foram então estimuladas com LPS (500 ng/ml; Sigma) e IFN- γ (5 ng/ml; Sigma) na presença de MSC-WT, MSC-LIF, VE-MSC, VE-LIF ou dexametasona (droga de referência no teste, 20 μ M) e incubadas a 37 °C. O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas sendo então mantido a -80 °C até o momento do ensaio. Os níveis das citocinas TNF- α , IL1- β , e IL-10 foram estimados utilizando kits de imunoenensaio ELISA para camundongos (R&D SYSTEM, Minneapolis, MN, USA) para cada citocina.

2.2.8. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, provenientes do Biotério do CPqGM, FIOCRUZ – BA pesando entre 20 e 28 gramas, com idade entre 40 e 90 dias. Todos os animais foram mantidos em sala climatizada sem restrição hídrica ou alimentar durante todo o período experimental. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – IGM/FIOCRUZ (020/2022) e realizados conforme as recomendações da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (IASP, 2023). Todos os testes comportamentais foram realizados entre 07:00 e 16:00 horas.

2.2.9. MODELO DE DOR NEUROPÁTICA POR LIGADURA DO NERVO ISQUIÁTICO

O modelo de dor neuropática adaptado de (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990), foi descrito por (LAURIA et al., 2024). Os camundongos foram submetidos a anestesia com cetamina (100 mg/kg; Syntec, SP, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, Syntec) por via intraperitoneal. Foi realizada a depilação do local da incisão seguida de antissepsia com álcool 70%. O membro posterior direito foi depilado e desinfetado com etanol 70%. Uma pequena incisão na pele foi realizada para promover a exposição do músculo bíceps femoral. As fibras musculares foram afastadas para cuidadosamente expor o nervo ciático, que foi então transfixado e ligado com um fio de sutura de polipropileno 7-0 (Shalon Fios Cirúrgicos, São Luís de Montes Belos - GO), contraindo 1/3 a 1/2 do diâmetro do nervo. Em seguida, a pele foi suturada fio de polipropileno 6-0 (Shalon®) e os camundongos foram acomodados em caixas aquecidas e

monitorados até a recuperação completa da anestesia. No grupo sham (falsa ligadura), o nervo foi exposto sem constrição.

2.2.10. AVALIAÇÃO DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO: FILAMENTOS DE VON FREY

O limiar de resposta ao estímulo mecânico foi mensurado utilizando filamentos de von Frey pelo método *up-and-down* (CHAPLAN et al., 1994). Estes filamentos consistem em segmentos de fio de nylon cuja rigidez à tensão é previamente determinada em gramas pelo fabricante (Stoelting, Chigaco, EUA). Os animais foram acomodados em caixas de acrílico transparentes, com fundo em tela de arame galvanizado, elevadas sobre um espelho de modo a permitir o acesso à superfície plantar e visualização da resposta do animal. Os animais permaneceram na caixa para adaptação por um período de trinta minutos. A pata foi tocada verticalmente com um de uma série dos filamentos, considerando um total de seis respostas consecutivas, tendo início quando o animal inverte o comportamento não responsivo (negativo) por um comportamento responsivo (positivo). Considerou-se como resposta positiva a retirada brusca da pata testada. A série foi interrompida quando o animal exibiu resposta positiva. As medidas foram realizadas tendo como princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo de filamento inferior, enquanto uma resposta negativa é seguida de um estímulo com filamento superior. O limiar é estimado considerando: o valor em logaritmo da força proporcional ao último filamento (X_f), o valor equivalente ao padrão de respostas positivas e negativas (k), e a média da diferença entre os estímulos em unidades logarítmicas (δ), conforme fórmula abaixo. O limiar assim calculado representa 50% do limiar nociceptivo em gramas, ou seja, a força em que o camundongo responde em 50% das apresentações.

$$50\% \text{ gramas Limiar} = \frac{10^{(X_f + k \cdot \delta)}}{10.000}$$

2.2.11. AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO TÉRMICO: TESTE DE HARGREAVES

Com o objetivo de avaliar o limiar de resposta ao estímulo térmico foi realizado o teste plantar em aparelho Hargreaves (Ugo Basile, Varese, Itália), como descrito previamente (HARGREAVES et al., 1988). Para isso, os animais foram alocados em compartimentos individuais de acrílico e posicionados sobre uma superfície de vidro especial que permite a passagem homogênea da luz e do calor, durante cinco minutos para adaptação ao ambiente.

Após esse período, uma fonte de luz infravermelha foi posicionada sob uma das patas traseiras do animal, enquanto um cronômetro eletrônico foi acionado. Quando o animal exibe resposta positiva (*flinch* ou retirada da pata) a fonte de luz e o relógio param automaticamente. Um tempo de corte de 20 segundos foi utilizado para evitar danos teciduais. Em cada animal foram realizadas três medidas de latência de retirada da pata, com um intervalo de 5 a 10 minutos entre elas e o resultado foi expresso como a média das três leituras em segundos.

2.2.12. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA NO TESTE DE ROTA-ROD

O desempenho no teste de rota-rod foi avaliado, como previamente descrito (GAMA et al., 2018), para avaliar a capacidade motora dos animais. O aparelho de rota-rod (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) é composto por uma barra cilíndrica com um diâmetro de 3 cm, subdividida em cinco compartimentos, e que gira à velocidade constante de 6 rpm. Para manter-se no cilindro o animal necessita se locomover, sendo a capacidade alterada de permanência no aparelho indicativo de prejuízos motores ou neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade. Os animais foram acompanhados em dias alternados durante o período experimental, e foi anotado o tempo de permanência na barra em três tentativas de no máximo 120 segundos. Os resultados foram expressos em média do tempo em segundos de permanência dos animais no rota-rod.

2.2.13. AVALIAÇÃO DA DISTÂNCIA PERCORRIDA EM ESTEIRA ERGOMÉTRICA

A distância percorrida em esteira ergométrica foi utilizada como medida funcional da capacidade física dos camundongos, como descrito previamente (MINAMI et al., 2018), com modificações. O teste foi realizado em uma câmara com esteira ergométrica para um animal (LE 8700; Panlab, Barcelona, Espanha). A velocidade da esteira e a intensidade do choque (mA) foram controladas por um potenciômetro (LE 8700 controle da esteira, Panlab). A velocidade inicial foi de 12 cm/s, com incremento de mais 6 cm/s a cada 5 minutos. O teste foi finalizado quando ao animal atingir a exaustão e permanecer por um período de 10 segundos na grade de aço inoxidável eletrificada que serve como estímulo para que o animal realize a atividade. Os parâmetros avaliados foram a distância percorrida e tempo total de exercício.

2.2.14. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM TECIDO - ELISA

Os níveis de citocinas segmentos L4-L5 da medula espinal camundongos foram determinados como descrito por (GAMA et al., 2018). Após a coleta, foram adicionados 100

μL do tampão de extração de citocinas (0,4 M de NaCl, 0,05% tween 20, 0,5 % de BSA, 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 KI de aprotinina diluídos em PBS 1x). O material foi imediatamente triturado em homogeneizador de tecidos *TissueLyser II* (Gentech Bio) por 3 minutos, e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota foi destinada à quantificação de proteínas totais utilizando o teste colorimétrico de Pierce™ 660nm (Thermo Fisher Scientific), segundo as recomendações do fabricante. O restante do sobrenadante foi armazenado em freezer -80°C para posterior quantificação das citocinas. Os níveis de citocinas foram quantificados utilizando kits de imunoensaio ELISA para camundongos para cada citocina analisada (R&D SYSTEM, Minneapolis, MN, USA). Os resultados foram expressos em picogramas de citocina por mg de proteína.

2.2.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão (D.V.) de 5-6 animais em cada grupo. As comparações entre os tratamentos foram feitas usando o ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey, ou para medidas repetidas, ANOVA bidirecional seguido pelo teste de Bonferroni, conforme o caso. Todos os dados foram analisados usando o Software Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

2.2.16. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste estudo, os grupos experimentais, compostos por seis animais cada, foram definidos da seguinte forma:

6. Naive: animais que não sofreram nenhum tipo de manipulação, foram avaliados com o objetivo de avaliar a resposta do animal não-estimulado, em situação de homeostase.
7. Sham: animais que foram submetidos à anestesia, incisão da pele, manipulação da musculatura e do nervo isquiático, mas não tiveram o nervo isquiático ligado. Este grupo experimental teve o objetivo de avaliar até que ponto as respostas comportamentais obtidas foram em decorrência do procedimento cirúrgico *per si*.
8. Animais neuropáticos tratados com veículo: animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e que receberam como tratamento apenas o veículo – solução fisiológica e heparina sódica à 10% – em um volume de 100 μl via endovenosa (veia lateral da cauda). O veículo foi administrado no sétimo dia após a cirurgia.
9. Animais neuropáticos tratados com MSC: animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e que receberam como tratamento 1×10^6 MSC entre as passagens 10 e

- 12, em um volume de 100 μ l de salina e 10% de heparina sódica, por via endovenosa (veia lateral da cauda), no sétimo dia após a cirurgia de ligadura.
10. Animais neuropáticos tratados com VE-MS: animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e que receberam como tratamento $7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$ partículas/mL de vesículas extracelulares derivadas de MSC entre as passagens 10 e 12, em um volume de 100 μ l de salina e 10% de heparina sódica, por via endovenosa (veia lateral da cauda), no sétimo dia após a cirurgia de ligadura.
 11. Animais neuropáticos tratados com MSC-LIF: animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e que receberam como tratamento 1×10^6 MSC-LIF entre as passagens 10 e 12, em um volume de 100 μ l de salina e 10% de heparina sódica, por via endovenosa (veia lateral da cauda), no sétimo dia após a cirurgia de ligadura.
 12. Animais neuropáticos tratados com VE-LIF: animais submetidos à cirurgia de ligadura parcial do nervo isquiático e que receberam como tratamento $2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^7$ partículas/mL de vesículas extracelulares derivadas de MSC-LIF entre as passagens 10 e 12, em um volume de 100 μ l de salina e 10% de heparina sódica, por via endovenosa (veia lateral da cauda), no sétimo dia após a cirurgia de ligadura.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. CARACTERIZAÇÃO DE MSC-LIF

As MSC-LIF foram caracterizadas e comparadas às células mesenquimais selvagens controle (MSC-WT) para garantir que não houve alteração no fenótipo e função dessas células. Os histogramas da análise dos marcadores fenotípicos de superfície das células, obtidos por citometria de fluxo, estão representados na Figura 1, enquanto a tabela 1 apresenta os valores percentuais de expressão de marcadores positivos e negativos. Tanto MSC-WT quanto MSC-LIF apresentaram uma alta expressão dos marcadores de superfície característicos de células-tronco mesenquimais humanas CD90, CD 105, CD 73 e CD44; e baixa expressão de marcadores do coquetel negativo, que inclui marcadores que devem estar ausentes em células mesenquimais humanas (CD45, CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR/CD29).

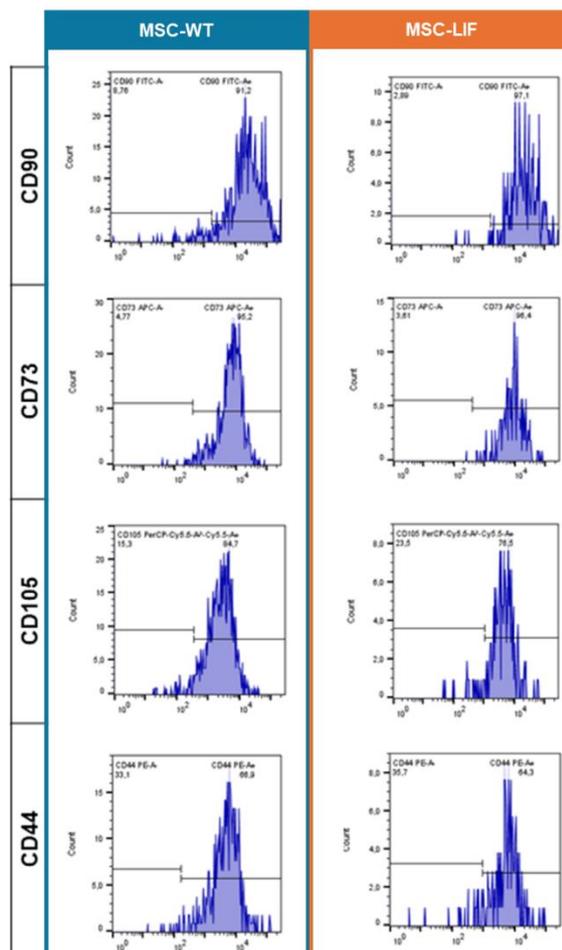


Figura 1 - Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical (MSC-WT) e células-tronco mesenquimais humanas superexpressando LIF (MSC-LIF). Histogramas representativos do perfil de expressão dos principais marcadores de superfície positivos nas células (CD44, CD105, CD73 e CD90). Os histogramas representam as populações marcada positivamente (em azul) para linhagens MSC-WT e MSC-LIF.

Tabela 01 - Expressão de marcadores de superfície nas linhagens MSC-WT e MSC-LIF

Marcador	MSC-WT	MSC-LIF
CD 90	93,2% ± 1,5	97,1% ± 1,91
CD105	84,7% ± 2,96	76,4% ± 0,08
CD 73	95,2% ± 0,77	89,5% ± 2,73
CD 44	66,6% ± 3,1	64,3% ± 2,12
Coquetel Negativo	2,12% ± 0,14	2,30% ± 1,0

Resultados representados como média percentual ± SD de dois experimentos.

A capacidade de diferenciação *in vitro* de ambas as linhagens MSC-WT e MSC-LIF também foi avaliada (figura 2). As MSC-WT e MSC-LIF em cultura foram capazes de se diferenciar nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica *in vitro*, como mostra a figura 2. Após o cultivo com meio de diferenciação, adipócitos diferenciados foram evidenciados pelo acúmulo de lipídios no meio intracelular das células coradas com *oil red* (figura 2A e 2B). A diferenciação osteogênica foi demonstrada nas MSC-WT (figura 2C) e MSC-LIF (figura 2D) pela presença de cálcio intracelular após coloração dos ostócitos com vermelho de alizarina. Ambas as linhagens também sofreram diferenciação condrogênica, e ao final de 21 dias foram coradas com *Alcian blue* para a detecção da presença de proteoglicanos, característicos de condrócitos. Foram evidenciados condrócitos diferenciados nas culturas de ambas as linhagens (figuras 2E e 2F).

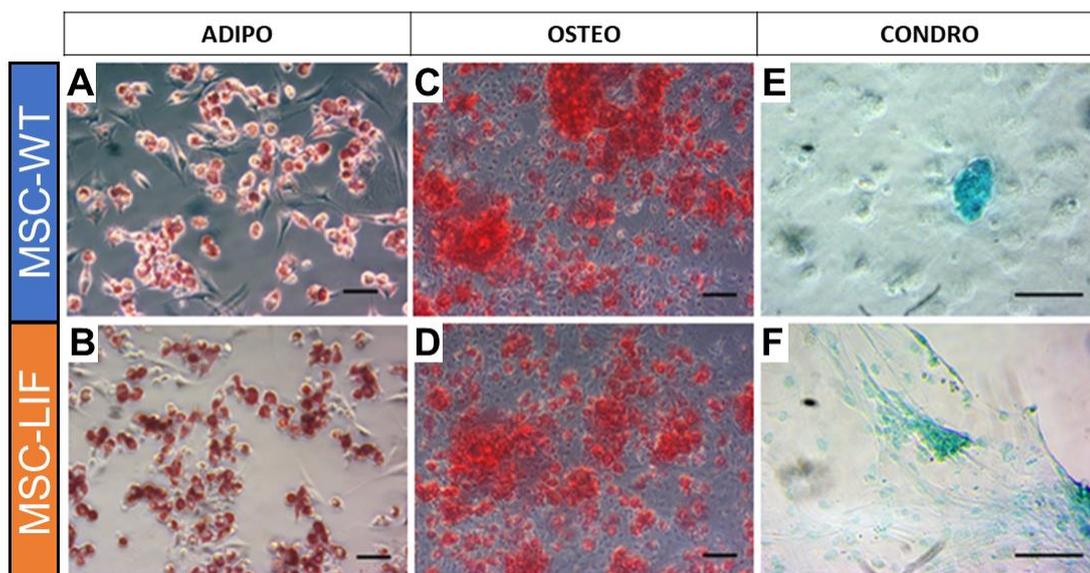


Figura 2 - Cultura de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical (MSC-WT) e células-tronco mesenquimais humanas superexpressando LIF (MSC-LIF) em diferenciação em células das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. Painéis A e B. Diferenciação adipogênica: células evidenciando o acúmulo de lipídios intracelulares corados com *oil red*. Magnificação= 200X. Painéis C e D. Diferenciação osteogênica: células apresentam acúmulo de cálcio coradas com alizarina vermelha 2%. Magnificação= 200X. Painéis E e F. Diferenciação em condrócitos evidenciada pelo acúmulo de proteoglicanos

corado por *Alcian blue*. Magnificação= 400X. Imagens representativas obtidas com microscopia óptica de contraste de fase.

Os dados acima apresentados, em conjunto, demonstram que as células MSC-LIF transformadas não apresentam alteração no fenótipo e preservam características de células-tronco mesenquimais.

2.3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE MSC-LIF

Antes do início dos experimentos, as VE-LIF foram caracterizadas com relação à quantidade, tamanho, formato e marcadores expressos. As vesículas extracelulares foram submetidas à quantificação direta por NTA, que permite a obtenção de parâmetros como o número e tamanho das partículas em suspensão nas amostras avaliadas (figura 3B). Para esta análise foram realizadas três leituras e os dados obtidos relacionados ao tamanho e quantidade das vesículas isoladas podem ser observados na figura 3. A concentração de vesículas isoladas por cada 1×10^6 MSC-LIF foi de $2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^8$ partículas/mL. O gráfico disposto na figura 3A representa o número de vesículas quantificadas por mililitro de suspensão (eixo y) em relação à distribuição de tamanho de partícula em nanômetros (eixo x). O pico visualizado neste gráfico representa a moda, ou seja, o valor mais frequente de diâmetro das VE-LIF isoladas, que foi $133,2 \pm 2,7$ nm. Nesta população de VE-LIF, 10% das partículas apresentaram um tamanho igual ou menor que $121,5 \pm 1,2$ nm (D10, figura 3C), enquanto 90% das partículas possuíam um diâmetro até $233 \pm 4,2$ nm (D90, figura 3C).

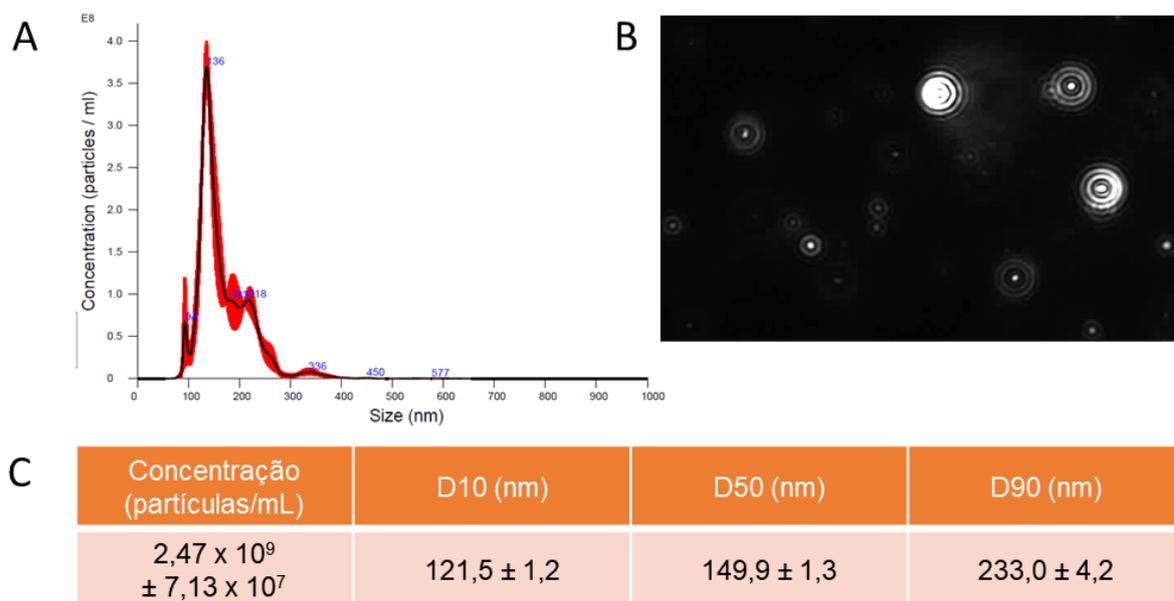


Figura 3 - Caracterização e quantificação das vesículas extracelulares derivadas de MSC-LIF por análise de rastreamento de nanopartículas. Painel A. Gráfico representativo do número de vesículas por mL (eixo y) em relação à distribuição de tamanho de partícula em nanômetros (eixo x). **Painel B.** Imagem ilustrativa capturada pelo NTA das vesículas extracelulares em suspensão. **Painel C.** Quadro apresentando o número total de partículas (VE-LIF) por mL, e os percentis D10, D50 e D90.

Estes resultados indicam que foram recuperadas vesículas extracelulares de tamanhos variados, que pode conter exossomos (usualmente menores que 200 nm) e ectossomos/microvesículas (que possuem grande variedade de tamanhos). o que demonstra a presença de uma população mista de VE. Microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para avaliar a morfologia das vesículas extracelulares, que apresentaram morfologia arredondada, membrana íntegra e diferentes tamanhos (figuras 4A, 4B e 4C). A caracterização da composição proteica realizada por Dotblot demonstrou a presença de proteínas enriquecidas em vesículas extracelulares. Duas categorias de proteínas são recomendada para a caracterização das vesículas: 1) Proteínas transmembrana ou ancoradas a glicosilfosfatidilinositol associadas à membrana plasmática e/ou endossomos e 2) Proteínas citosólicas recuperadas em vesículas extracelulares. A amostra apresentou marcação positiva para as proteínas transmembrana CD9 e CD81, da categoria 1, e para a proteína citosólica TSG101, categoria 2 (figura 2D). Em conjunto, os dados indicam sucesso no protocolo de obtenção de VE-LIF

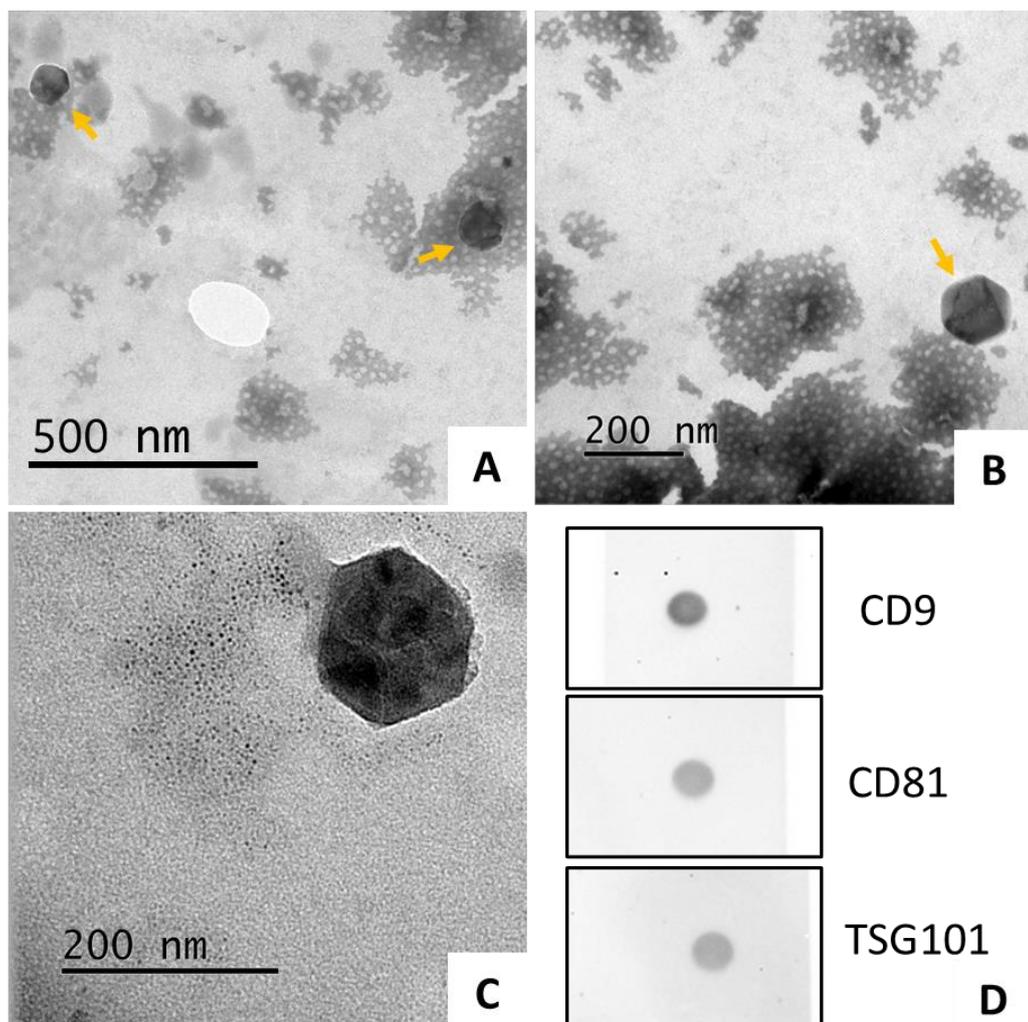


Figura 4 - Caracterização e quantificação das vesículas extracelulares derivadas MSC-LIF por microscopia eletrônica de transmissão e Dotblot. Os painéis A, B e C apresentam eletromicrografias representativas das

VE-LIF. Setas em A e B destacam a localização das VE-LIF. O painel D apresenta os pontos com marcações com anticorpos CD9, CD81 e TSG101.

2.3.3. POTENCIAL TERAPÊUTICO DE MSC-LIF E VE-LIF: ENSAIOS *IN VITRO*

As propriedades biológicas de MSC-LIF e VE-LIF foram inicialmente investigadas em uma série de estudos *in vitro*. Considerando que os efeitos modulatórios de MSC sobre macrófagos e sobre a produção de citocinas têm sido amplamente demonstrados, essas células foram escolhidas como modelo de estudo do potencial terapêutico de MSC-LIF e VE-LIF.

2.3.3.1. Efeitos da co-cultura de macrófagos com MSC-WT ou MSC-LIF sobre o perfil de citocinas liberadas por macrófagos estimulados

Como tem sido proposto que a polarização de macrófagos para um perfil M2 contribui para os efeitos terapêuticos das células-tronco mesenquimais na dor neuropática, o efeito da co-cultura de macrófagos com MSC-WT ou MSC-LIF foi investigado, utilizando macrófagos J774 murinos estimulados com LPS e IFN- γ (figuras 5 e 6). Ambas as linhagens foram capazes de diminuir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (figuras 5A e 5B) e TNF- α (figuras 5C e 5D) e aumentar da citocina anti-inflamatória IL-10 (figuras 6A e 6B). A produção basal de IL-1 β por macrófagos foi elevada pelo estímulo com LPS e IFN- γ , como evidenciado pela comparação entre o grupo basal versus grupo veículo ($p < 0,001$; figuras 5A e 5B). A co-cultura de J774 com MSC-WT, em todas as densidades celulares de MSC-WT ($2 \times 10^5 - 2 \times 10^4$ células/poço) testadas foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,01$; figura 5A) os níveis de IL-1 β no sobrenadante da co-cultura. Em contraste, a co-cultura de J774 com MSC-LIF (figura 5B) reduziu a produção de IL-1 β por macrófagos apenas nas densidades celulares de 2×10^5 ($p < 0,001$) e 1×10^5 ($p < 0,01$). Não houve diferença de efeito entre as densidades celulares de MSC-WT ($2 \times 10^5 - 2 \times 10^4$) ou MSC-LIF (2×10^5 e 1×10^5). A dexametasona (20 μ M), utilizada como fármaco padrão ouro no teste, também inibiu a produção de IL-1 β ($p < 0,001$), como esperado.

Similarmente aos resultados obtidos com IL-1 β , a produção de TNF- α aumentou em macrófagos estimulados em relação aos não estimulados ($p < 0,001$), e foi reduzida pela cocultura com MSC-WT e MSC-LIF (figuras 5C e 5D). Entretanto, de modo inverso ao observado para IL-1 β , MSC-LIF inibiu mais a produção de TNF- α do que MSC-WT. Enquanto MSC-WT (figura 5C) reduziu TNF- α em relação ao controle apenas nas densidades celulares de 2×10^5 ($p < 0,001$), 1×10^5 e 5×10^4 ($p < 0,01$), MSC-LIF (figura 5D) reduziu TNF- α em todas as densidades celulares de testadas (2×10^5 , $p < 0,001$; 1×10^5 a $2,5 \times 10^4$, $p < 0,01$). MSC-WT apresentou um efeito dependente da densidade celular, no qual o efeito de 2×10^5 células divergiu dos efeitos de 1×10^5 e 5×10^4 células ($p < 0,05$). MSC-LIF não apresentou diferença entre os efeitos das densidades celulares testadas. Novamente, a dexametasona (20 μ M) inibiu a produção de TNF- α ($p < 0,001$), como esperado.

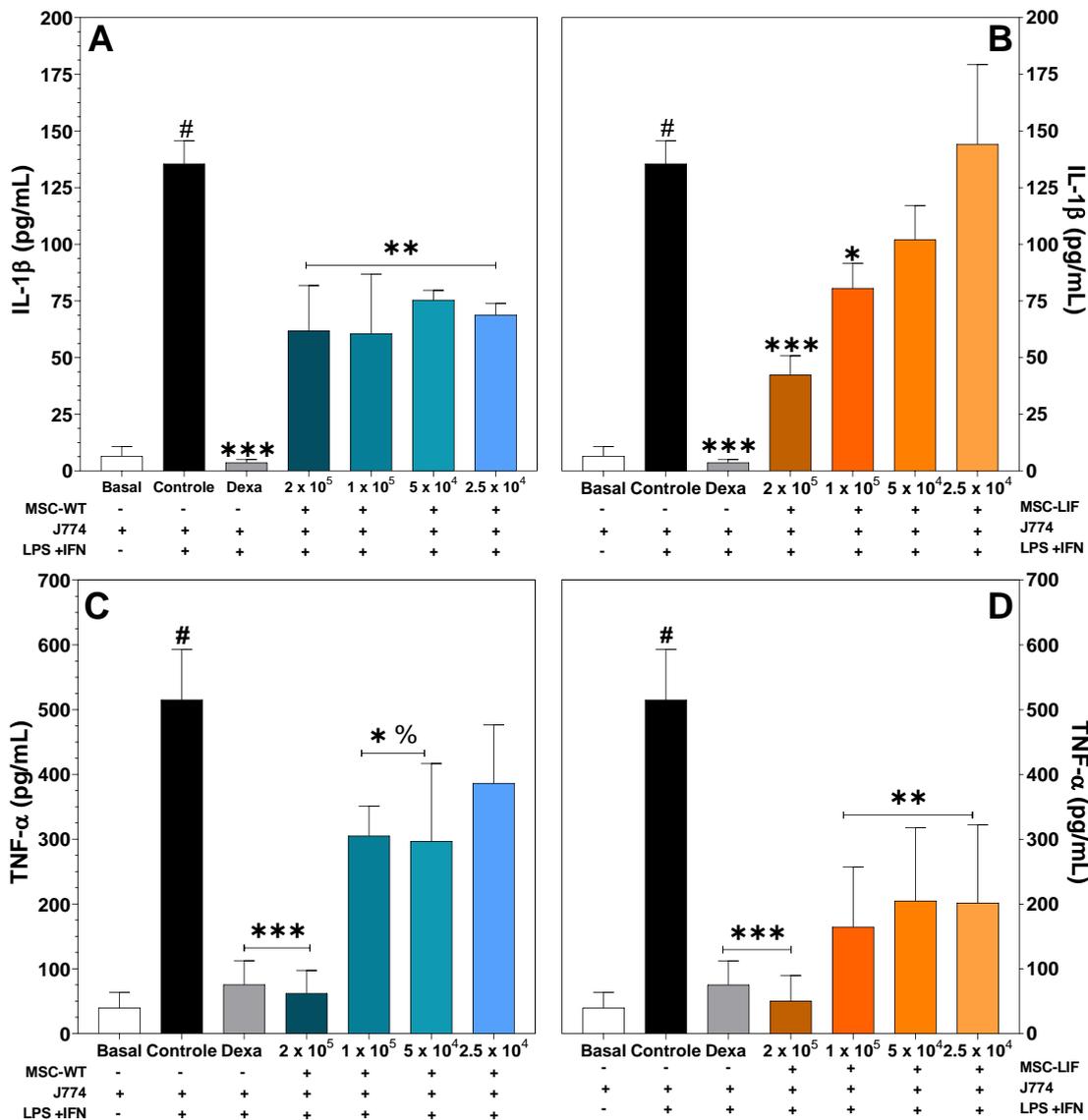


Figura 5 – Produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ em co-cultura com MSC-WT e MSC-LIF. A produção das citocinas IL-1 β (painéis A e B) e TNF- α (painéis C e D) foi avaliada no sobrenadante de células J774 estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN- γ (5 ng/mL). Os macrófagos estimulados foram incubados com diferentes densidades celulares (2×10^5 – 2×10^4 células/poço) de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical (MSC-WT), células-tronco mesenquimais humanas superexpressando LIF (MSC-LIF) ou com dexametasona (Dexa; 20 μ M) utilizada como fármaco padrão-ouro. O grupo Basal representa células não estimuladas e não tratadas. O grupo Controle representa macrófagos estimulados em cultura isolada. O sobrenadante foi coletado 4 horas (TNF- α) ou 24 horas (IL-1 β) após o estímulo. Valores representados como a média \pm desvio padrão de três determinações. *** Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,001$) ** Diferença significativa em relação ao grupo Controle ($p < 0,01$). * Diferença significativa em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Diferença significativa em relação ao grupo basal ($p < 0,05$). % Diferença significativa em relação ao grupo 2×10^5 ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA de unidirecional seguida do teste de Tukey.

A capacidade das linhagens MSC-WT e MSC-LIF de modular a produção de IL-10 em macrófagos estimulados também foi investigada (figura 6). O estímulo com LPS e IFN- γ elevou os níveis de IL-10

de macrófagos, quando comparados aos níveis basais ($p < 0,001$). Os níveis de IL-10 produzidos por macrófagos em co-cultura com MSC-WT (figura 6A) aumentaram significativamente em todas as concentrações de MSC-WT estudadas (2×10^5 a 5×10^4 : $p < 0,001$; $2,5 \times 10^4$ a $6,25 \times 10^3$: $p < 0,05$). De forma semelhante, MSC-LIF (figura 6B) induziu um aumento de IL-10 na faixa de concentração celular entre 2×10^5 e $6,25 \times 10^3$ (2×10^5 a 5×10^4 : $p < 0,001$; $2,5 \times 10^4$ e $6,25 \times 10^3$: $p < 0,01$). O ED_{50} calculado para o aumento de IL-10 por MSC-WT e MSC-LIF foi de $3,03 \times 10^4$ células e $1,56 \times 10^4$ células, respectivamente, indicando uma maior potência de MSC-LIF para aumentar os níveis de IL-10. A dexametasona ($20 \mu\text{M}$) não foi capaz de elevar as concentrações de IL-10 em comparação às células em monocultura.

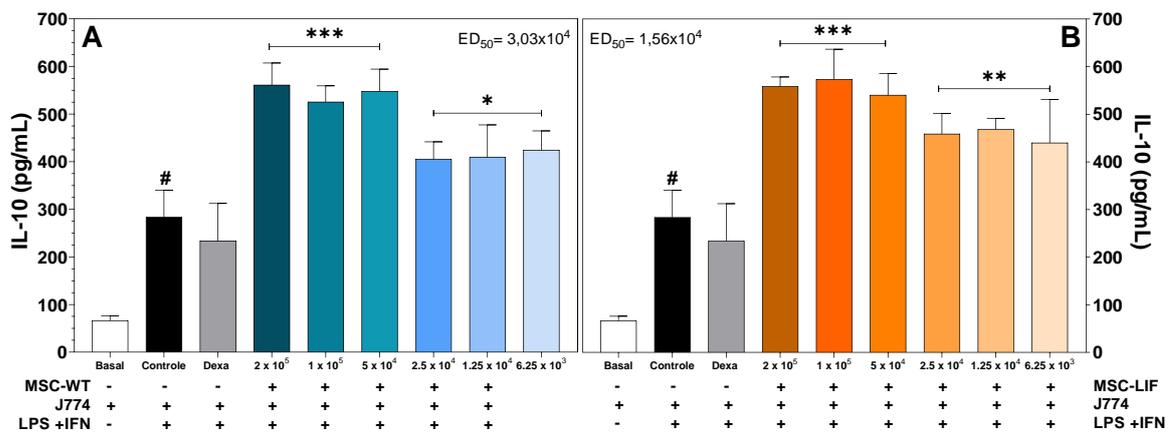


Figura 6 – Produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ em co-cultura com MSC-WT e MSC-LIF. A produção de IL-10 foi avaliada no sobrenadante de células J774 estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN- γ (5 ng/mL). As células estimuladas foram incubadas com diferentes concentrações de células (2×10^5 – $6,25 \times 10^3$ células/poço) da linhagem controle (MSC-WT), da linhagem superexpressando LIF (MSC-LIF) ou com dexametasona (Dexa; $20 \mu\text{M}$) utilizada como padrão-ouro. O grupo Basal representa células não estimuladas e não tratadas. O grupo Estímulo representa células estimuladas e não tratadas. Valores representados como a média \pm desvio padrão de três determinações. *** Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,001$) ** Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,01$). * Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,05$). # Diferença significativa em relação ao grupo basal ($p < 0,05$). % Diferença significativa em relação ao grupo 2×10^5 ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey.

2.3.3.2. Efeitos das vesículas extracelulares sobre a viabilidade celular e perfil de citocinas liberadas por macrófagos estimulados

A seguir, os efeitos do tratamento das culturas de macrófagos estimulados com as vesículas extracelulares foram investigados. Para tal, o impacto do tratamento com VE-MSC e VE-LIF sobre a viabilidade celular dos macrófagos foi inicialmente estabelecido, com o objetivo de descartar possíveis efeitos citotóxicos das vesículas sobre as células.

A viabilidade celular dos macrófagos J774 estimulados e tratados com VE-MSC ou VE-LIF foi avaliada com o objetivo de descartar possíveis efeitos citotóxicos das vesículas sobre as células. Como observado na figura 7, nenhuma das concentrações testadas de VE-MSC (painel A) ou de VE-LIF (painel B) alterou significativamente a viabilidade celular dos macrófagos em cultura, em comparação

às células tratadas com veículo. O detergente não iônico Tween 20 (20% em meio de cultura), que causa a lise celular, foi utilizado como controle positivo e reduziu a viabilidade celular como esperado ($p < 0,0001$).

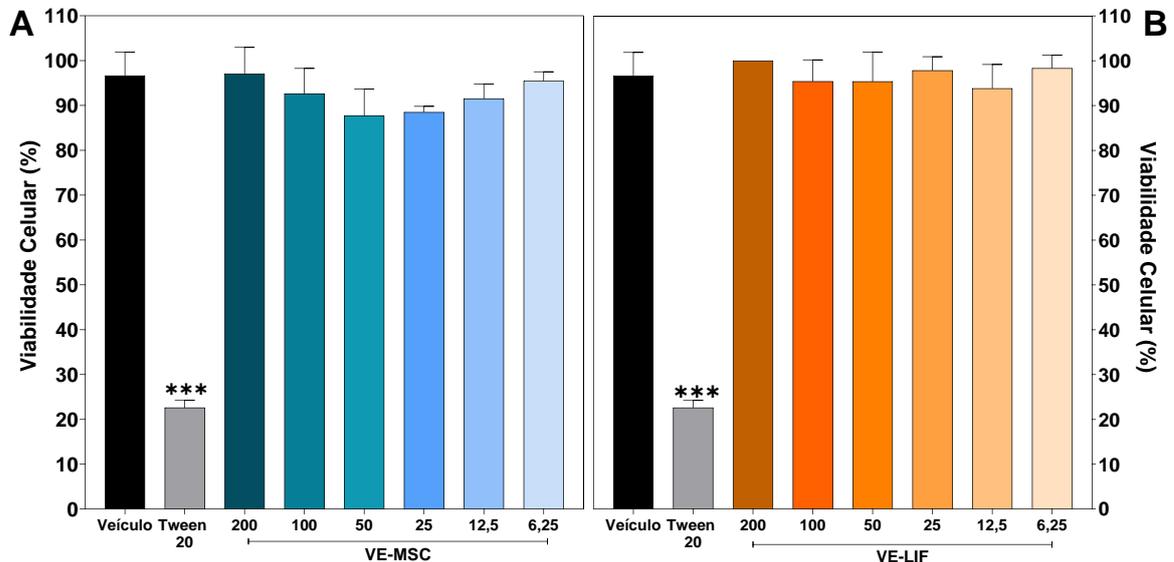


Figura 7 - Efeito de vesículas extracelulares sobre a viabilidade celular de macrófagos J774 estimulados em cultura. O eixo X representa o tratamento com diferentes concentrações de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais humanas (VE-MSC; painel A) ou de células-tronco mesenquimais humanas superexpressando LIF (VE-LIF; painel B). O eixo Y representa o percentual de células viáveis. A viabilidade celular dos macrófagos foi determinada pelo ensaio de Alamar Blue após a incubação das células tratadas com veículo (salina), VE-LIF (200 µg/mL - 6,25µg/mL); VE-MSC (200 µg/mL - 6,25µg/mL) ou Tween 20 (Tween 20; 20% em meio de cultura), usado como controle do teste. Os valores foram representados como média \pm desvio padrão de três determinações. *** Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional, seguido do teste de Tukey.

Os efeitos das VE-LIF sobre a produção de IL-10 e TNF- α em macrófagos J774 estimulados foram a seguir avaliados e comparados aos efeitos de VE-MSC (figura 8). O estímulo dos macrófagos com LPS e IFN- γ resultou no aumento da produção de TNF- α quando comparado aos macrófagos não estimulados (grupo basal; $p < 0,05$; figura 8B). O tratamento das culturas com VE-LIF em diferentes concentrações (25–200 µg/mL; $p < 0,0001$; figura 8A), assim como com dexametasona (Dexa, 20 µM; $p < 0,001$; figura 8B), diminuiu a produção de TNF- α por macrófagos estimulados, em relação ao controle (grupo veículo, figura 8B). De forma similar, o tratamento com VE-MSC em diferentes concentrações (25 - 200 µg/mL; $p < 0,001$; figura 8A), assim como com dexametasona (Dexa, 20 µM; $p < 0,001$; figuras 8A e 8B), diminuiu a produção de TNF- α por macrófagos estimulados. Todas as concentrações testadas de VE-LIF (25 - 200 µg/mL) aumentaram os níveis de IL-10 em relação aos macrófagos do grupo controle ($p < 0,0001$; figura 8D). O mesmo perfil foi observado nos macrófagos tratados com VE-MSC, em que todas as concentrações (25 - 200 µg/mL) aumentaram os níveis de IL-10 na cultura em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$; figura 8C). Não houve diferença estatística entre os níveis de IL-10

produzidos por células não estimuladas, estimuladas tratadas com veículo ou com dexametasona a 20 μ M.

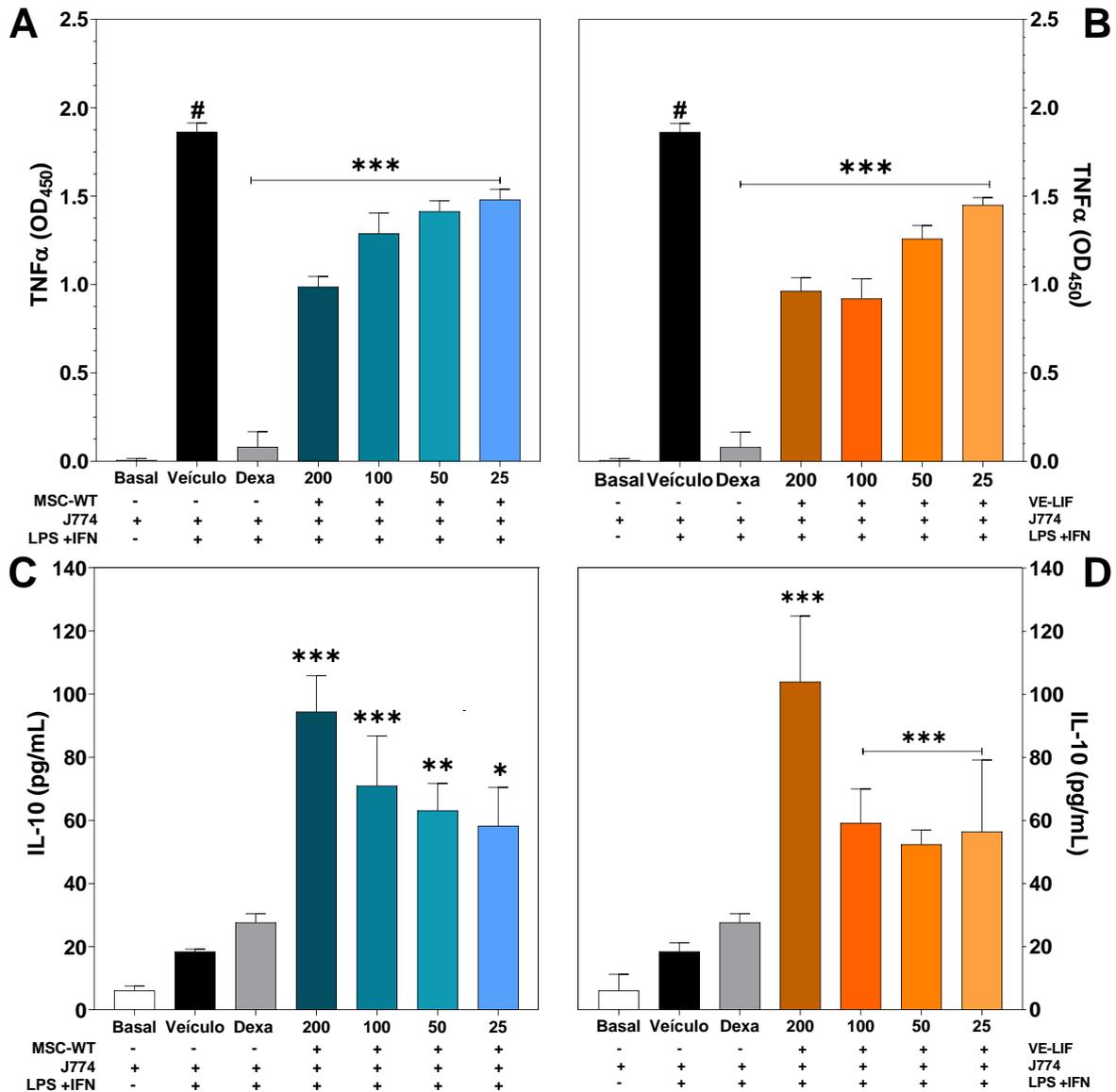


Figura 8 – Efeito das vesículas extracelulares sobre a produção de citocinas por macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ . A produção de IL-10 (painel A) e TNF- α (painel B) foi avaliada no sobrenadante de células J774 estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN- γ (5 ng/mL). As células estimuladas foram incubadas com veículo (salina), dexametasona (Dexa; 20 μ M; fármaco padrão-ouro), diferentes concentrações de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais humanas superexpressando LIF (VE-LIF; 200–25 μ g/mL) ou derivadas de células-tronco mesenquimais humanas (VE-MSC; 200–25 μ g/mL). O grupo Basal representa células não estimuladas e não tratadas. Valores representados como a média \pm desvio padrão de três determinações. *** Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,001$) ** Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,01$). * Diferença significativa em relação ao grupo estímulo ($p < 0,05$). # Diferença significativa em relação ao grupo basal ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey.

2.3.4. POTENCIAL TERAPÊUTICO DE MSC-LIF E VE-LIF: ENSAIOS *IN VIVO*

Tendo sido confirmado o perfil modulatório de citocinas de MSC-LIF e VE-LIF nos ensaios *in vitro*, foram iniciados os estudos no modelo experimental de neuropatia. Os tratamentos foram avaliados

quanto aos seus efeitos nos parâmetros comportamentais sugestivos de dor neuropática, tais como diminuição do limiar nociceptivo mecânico e térmico. Também foram avaliadas alterações na função motora e na capacidade física, que podem ser afetadas na neuropatia sensorial.

2.3.4.1. Efeito dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF sobre o limiar nociceptivo mecânico no modelo de dor neuropática

Inicialmente, o limiar nociceptivo mecânico dos camundongos foi avaliado com o objetivo de confirmar o desenvolvimento da neuropatia sensorial no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático (figura 9A). Um dia após a cirurgia de indução do modelo houve uma redução significativa do limiar de resposta a estímulos mecânicos (figura 9A; $p < 0,001$). Animais sham também apresentaram redução do limiar nociceptivo mecânico em decorrência do procedimento cirúrgico, mas seus limiares nociceptivos retornaram espontaneamente a valores basais 10 dias após a indução. Por outro lado, os animais submetidos à ligadura do nervo apresentaram uma redução sustentada (dia 1 ao dia 50, figura 9A; $p < 0,001$) do limiar nociceptivo mecânico em relação ao grupo naive, caracterizando o desenvolvimento da neuropatia sensorial neste modelo.

Os tratamentos com MSC-LIF (1×10^6 células) e VE-LIF ($2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^8$ vesículas/mL) foram realizados uma única vez, no sétimo dia após a indução da neuropatia experimental, e induziram um efeito antinociceptivo transitório nos animais neuropáticos. O início do efeito de VE-LIF (figura 9A; $p < 0,05$) ocorreu no segundo dia após o tratamento e o seu efeito se manteve por 19 dias, com um pico de efeito 9 dias após o tratamento. MSC-LIF apresentou um início de efeito (figura 9A; $p < 0,05$) um pouco mais tardio, quatro dias após o tratamento, com duração total de 17 dias. Além da duração, o efeito antinociceptivo máximo de VE-LIF foi maior que o de MSC-LIF ($p < 0,05$), indicando uma maior eficácia do tratamento com VE-LIF em comparação com MSC-LIF. Adicionalmente, a magnitude do efeito de VE-LIF também foi maior que a de MSC-LIF (figura 9C; $p < 0,05$), como evidenciado na figura 9B, que expõe e compara a área sob a curva dos efeitos dos tratamentos.

Os perfis de efeito de MSC-LIF e VE-LIF divergiram dos perfis de MSC-WT em relação ao tempo de duração e efeito máximo. MSC-LIF e MSC-WT (figura 9B) apresentam início dos efeitos quatro dias após o tratamento e nove dias após o tratamento alcançam seus efeitos máximos. Entretanto, o efeito de MSC-WT persiste durante todo o período experimental, enquanto o efeito de MSC-LIF começa a declinar 12 dias após o tratamento. O efeito de VE-LIF tem início um dia antes do efeito de VE-MSC (figura 9B), e alcança seu efeito máximo 10 dias antes de VE-MSC. Entretanto seu efeito declina 9 dias após o tratamento, enquanto o efeito de VE-MSC perdura até o fim período de teste. A magnitude dos efeitos de MSC-LIF e VE-LIF também foi menor que a magnitude dos efeitos de MSC-WT e VE-MSC ($p < 0,05$; figura 9C). Os resultados demonstram que a superexpressão de LIF em MSC reduziu o efeito antinociceptivo mecânico de MSC e de suas vesículas extracelulares.

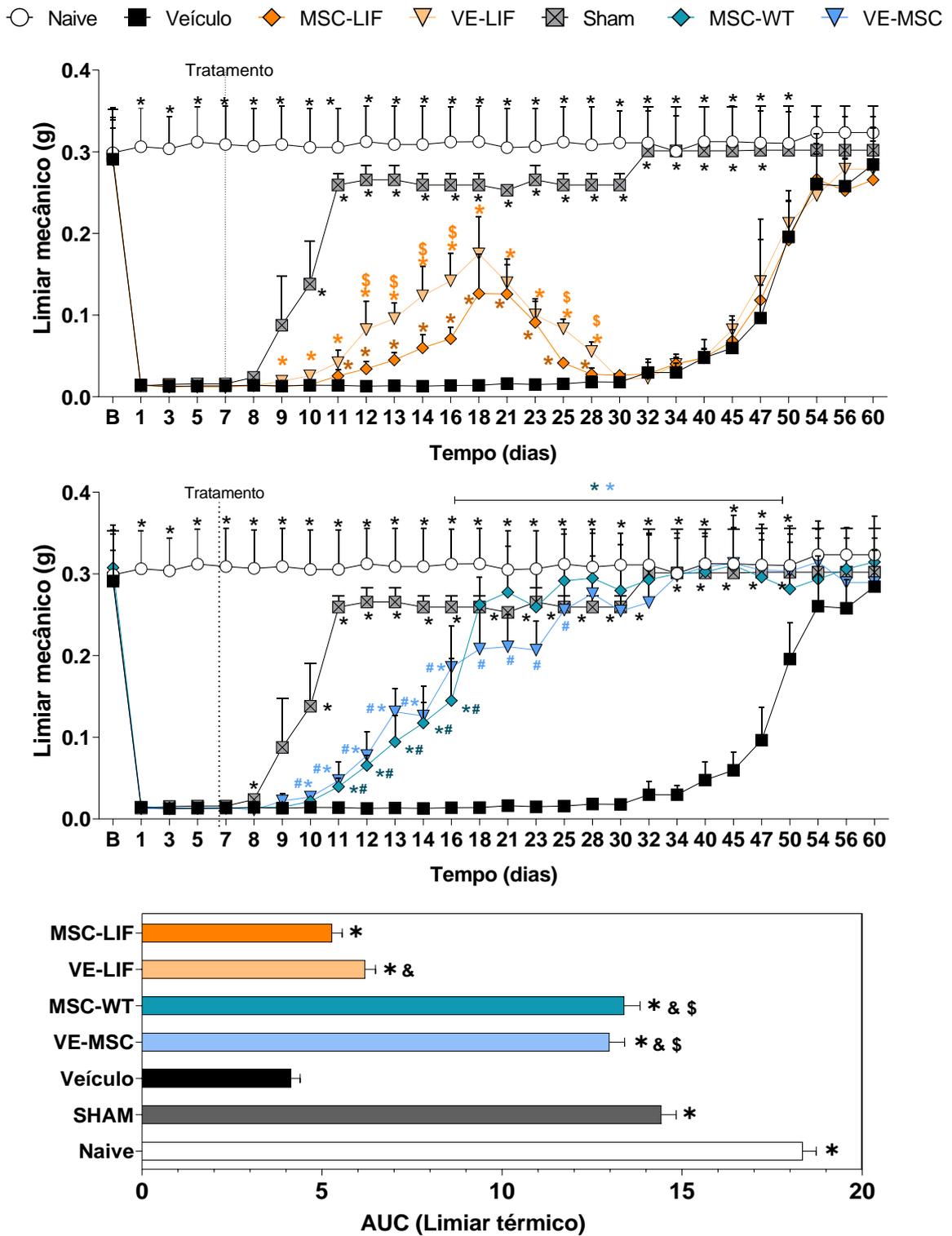


Figura 9 - Efeito da administração endovenosa de MSC-LIF e VE-LIF sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de dor neuropática. Painel A apresenta o curso temporal das mudanças no limiar nociceptivo mecânico. O eixo y representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. O basal (B) representa o período antes da indução do modelo de neuropatia sensorial. A linha pontilhada no dia 7 indica o momento de administração endovenosa de MSC-LIF (1×10^6 células/100 μ L), VE-LIF ($2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^8$ vesículas/mL) ou do veículo (100 μ L de salina). **Painel B** apresenta o curso temporal das mudanças no limiar nociceptivo mecânico. O eixo y representa 50% do limiar nociceptivo em gramas (g), ou seja, a gramatura

do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. O basal (B) mostra valores do limiar nociceptivo antes da indução do modelo de neuropatia. A linha pontilhada no dia 7 indica o momento da administração endovenosa de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou do veículo (100 μ L de salina). Dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 6 camundongos por grupo. *Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). #Diferença significativa em relação ao grupo naive ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni. **Painel C** apresenta a área sob a curva (AUC) calculada para os dados de limiar mecânico apresentados no gráfico A e B. Dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 6 camundongos por grupo. *Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). #Diferença significativa em relação ao grupo naive ($p < 0,05$). & Diferença significativa em relação ao grupo MSC-LIF ($p < 0,05$). \$ Diferença significativa em relação ao grupo VE-LIF ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey.

2.3.4.2. Efeito dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF sobre o limiar nociceptivo térmico no modelo de dor neuropática

O limiar nociceptivo térmico de camundongos neuropáticos e não neuropáticos também foi avaliado (figura 10A). O limiar nociceptivo do camundongos ao estímulo térmico reduziu (figura 10A; $p < 0,001$) gradativamente até o dia 7 após a cirurgia, quando animais sham apresentaram um retorno espontâneo a valores basais e os animais com nervos ligados apresentaram uma redução sustentada (dia 1 ao dia 41, figura 10A; $p < 0,001$) do limiar nociceptivo térmico em relação ao grupo naive, caracterizando a neuropatia sensorial neste modelo. Os tratamentos com MSC-LIF (1×10^6 células) e VE-LIF ($2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^8$ vesículas/mL), realizados uma única vez no sétimo dia após a indução da neuropatia experimental, causaram um aumento progressivo e durador ($p < 0,05$) da hipernocicepção térmica dos animais neuropáticos. O transplante de MSC-LIF levou a uma melhora do limiar térmico dos animais neuropáticos desde o primeiro dia de avaliação após o tratamento ($< 0,05$), enquanto as VE-LIF apresentaram um efeito a partir do terceiro dia pós-tratamento. Após 18 dias do tratamento os limiares animais tratados com VE-LIF não apresentaram diferença em relação ao naive, e os tratados com MSC-LIF, após 24 dias. MSC-LIF e VE-LIF apresentam um perfil similar e não houve diferença significativa entre os tratamentos, como verificado na figura 10C, que representa a área sob a curva dos efeitos dos tratamentos.

Os perfis de MSC-LIF e MSC-WT também foram similares, porém com magnitude ligeiramente (6%) diferente ($p < 0,05$, figura 10C). O efeito de ambas iniciou um dia após a administração, no entanto MSC-LIF demorou mais para alcançar seu efeito máximo (dia 24) em comparação com MSC-WT (dia 14). Em relação às VE-LIF, o início do efeito ocorreu um dia após VE-MSC, e ambas alcançaram efeito máximo 18 dias após o tratamento, apresentando também uma pequena (4,5%) diferença de magnitude entre seus efeitos ($p < 0,05$).

○ Naive ■ Veículo ☒ Sham ◆ MSC-LIF ▼ VE-LIF ◆ MSC ▼ VE-MSC

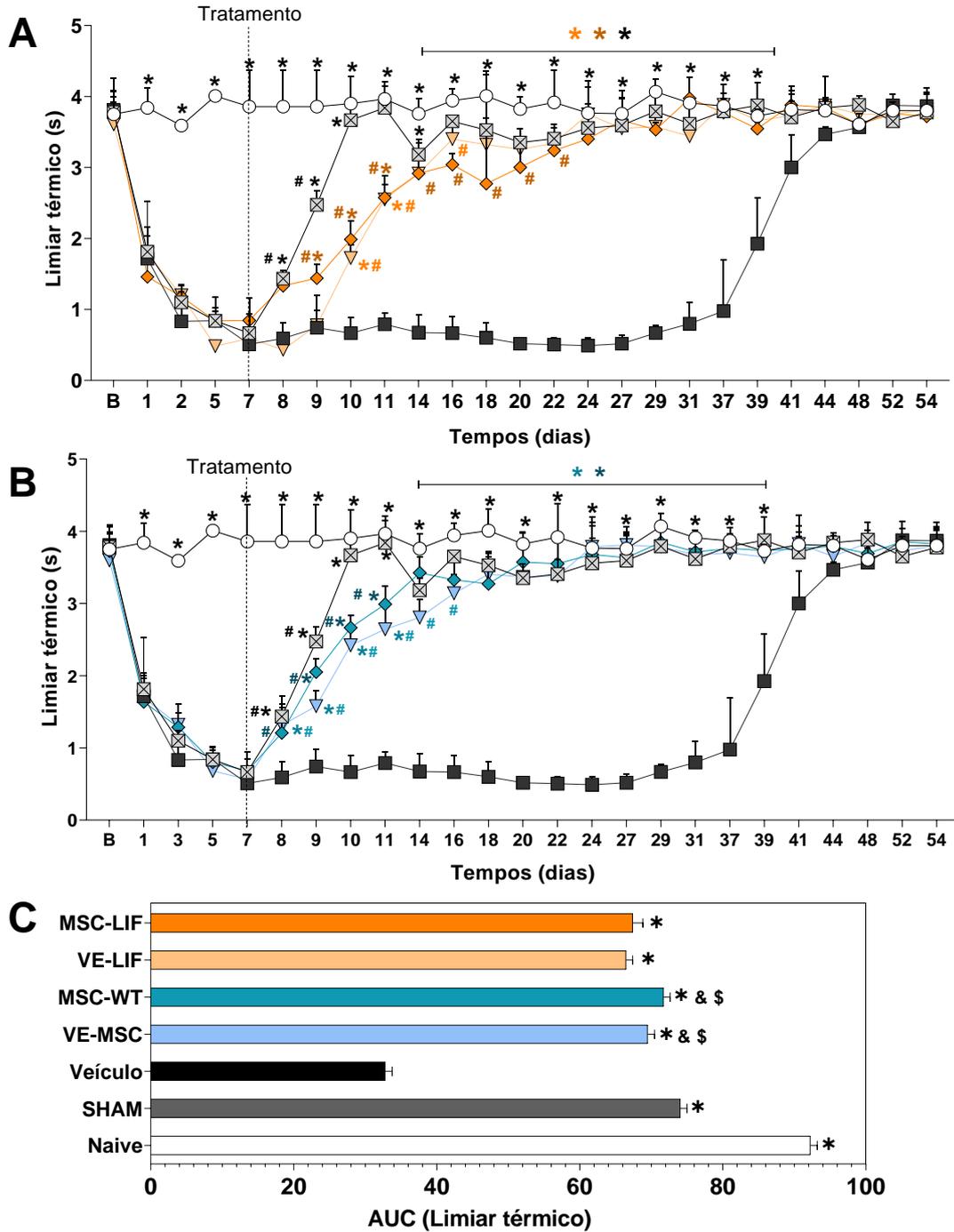


Figura 10 - Efeito do transplante de MSC-LIF e VE-LIF sobre o limiar nociceptivo térmico de camundongos em modelo de dor neuropática. Painel A apresenta o curso temporal das mudanças no limiar nociceptivo térmico. O eixo y representa a latência em segundos. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. O basal (B) representa o período antes da indução do modelo de neuropatia sensorial. A linha pontilhada no dia 7 indica o momento da administração endovenosa de MSC-LIF (1×10^6 células/100 μ L), VE-LIF ($2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^8$ vesículas/mL) ou do veículo (100 μ L de salina). **Painel B** apresenta o curso temporal das mudanças no limiar nociceptivo térmico. O eixo y representa a latência de retirada da pata em segundos. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. O basal (B) mostra valores do limiar nociceptivo antes da indução do modelo de neuropatia. A linha pontilhada no dia 7 indica o momento da administração endovenosa de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou do veículo (100 μ L de salina). Dados foram expressos como

média e desvio padrão; n = 6 camundongos por grupo. *Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). #Diferença significativa em relação ao grupo naive ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni. **Painel C** apresenta a área sob a curva (AUC) calculada para os dados de limiar térmico apresentados no gráfico A e B. Dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 6 camundongos por grupo. *Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). & Diferença significativa em relação ao grupo MSC-LIF ($p < 0,05$). \$ Diferença significativa em relação ao grupo VE-LIF ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey.

2.3.4.3. Efeito dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF sobre a função motora de camundongos no modelo de dor neuropática

Com o objetivo de verificar se o modelo de ligadura de nervo isquiático ou os tratamentos realizados poderiam causar comprometimento motor, e desta forma influenciar as respostas nociceptivas dos animais, foi realizado o teste de rota-rod. Para isso, a média de tempo que os animais permaneceram na barra giratória do equipamento foi avaliada em diferentes momentos durante todo o período experimental. A figura 11 representa os resultados obtidos no teste e demonstra que nem a cirurgia de ligadura do nervo isquiático, nem a administração endovenosa de MSC-LIF (1×10^6 células; painel A), VE-LIF ($2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^8$ partículas/mL; painel A), MSC-WT (1×10^6 células; painel B) ou VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$ partículas/mL; painel B) alteraram o tempo de permanência dos animais no aparelho durante o tempo experimental, levando em conta que nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos.

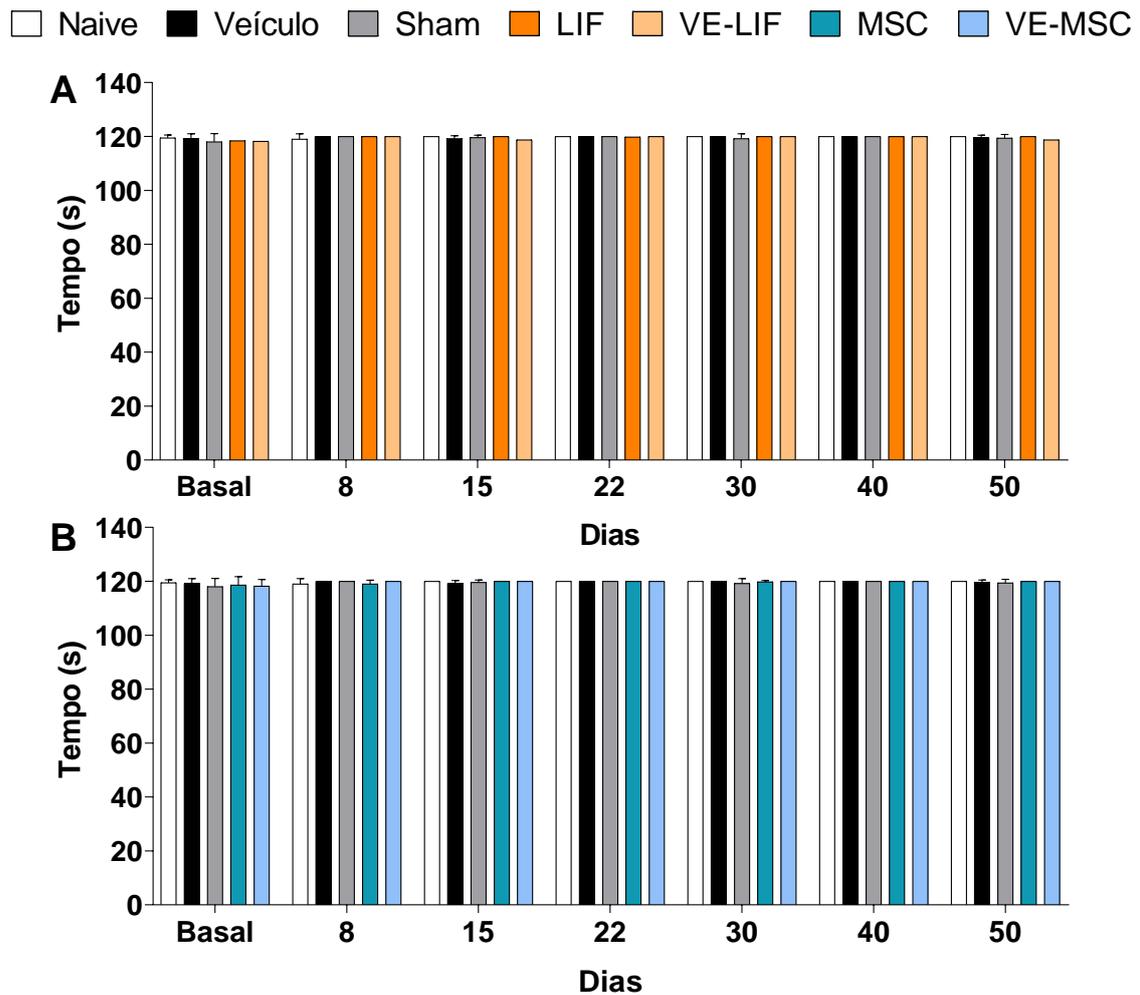


Figura 11 - Tempo de permanência no rota-rod durante o período experimental no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático. Os animais foram avaliados antes (basal) e após a indução do modelo de neuropatia em diferentes momentos durante todo o período experimental. O eixo y representa o tempo de permanência dos animais na barra em segundos. O eixo x representa o tempo em dias após a cirurgia. O Basal mostra valores de permanência antes da indução do modelo de neuropatia. **Painel A.** No dia 7 os animais receberam uma administração endovenosa única de MSC-LIF (1×10^6 células/100 μ L), VE-LIF ($2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^8$ partículas/mL) ou do veículo (100 μ L de salina). **Painel B.** No dia 7 os animais receberam uma administração endovenosa única de MSC-WT (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou veículo (100 μ L de salina). O grupo naive refere-se aos animais não submetidos a procedimentos experimentais, e o grupo sham, a animais falso operados. Os dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 6 camundongos por grupo. Foi realizado o teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni.

2.3.4.4. Efeitos dos tratamentos com MSC e VE-MSC sobre a capacidade física dos camundongos no modelo de neuropatia

O efeito do tratamento com MSC-LIF e VE-LIF sobre parâmetros funcionais indicativos da capacidade física dos camundongos, como o tempo de permanência e a distância percorrida na esteira, foram avaliados em uma esteira ergométrica durante a neuropatia (figura 12). Os resultados foram comparados aos obtidos com o tratamento com MSC-WT e VE-MSC. Antes da cirurgia de indução do

modelo de neuropatia, todos os camundongos apresentaram tempos de permanência na esteira (figuras 12A e 12C) e distâncias totais percorridas (figuras 12B e 12D) similares no teste, indicando homogeneidade da amostra. Após a cirurgia de indução do modelo, os animais neuropáticos apresentaram redução tanto do tempo de permanência ($p < 0,05$), como da distância percorrida na esteira ($p < 0,05$) em relação a animais naive e sham, demonstrando que a neuropatia sensorial reduziu a capacidade física dos camundongos. Notavelmente, o tratamento com MSC-LIF e VE-LIF aumentou o tempo de permanência e distâncias percorridas em comparação com animais tratados com veículo ($p < 0,05$; figuras 12A e 12B). Estes parâmetros retornaram a níveis similares aos de animais naive e sham. Não houve diferença estatística entre os animais tratados com MSC-LIF e VE-LIF em ambos os parâmetros avaliados, nem entre os naive e os sham em nenhum dos tempos de avaliação. O efeito de MSC-LIF e VE-LIF foi comparável ao de MSC e VE-MSC (figuras 12C e 12D) que também levaram aos parâmetros testados a níveis similares aos do grupo naive.

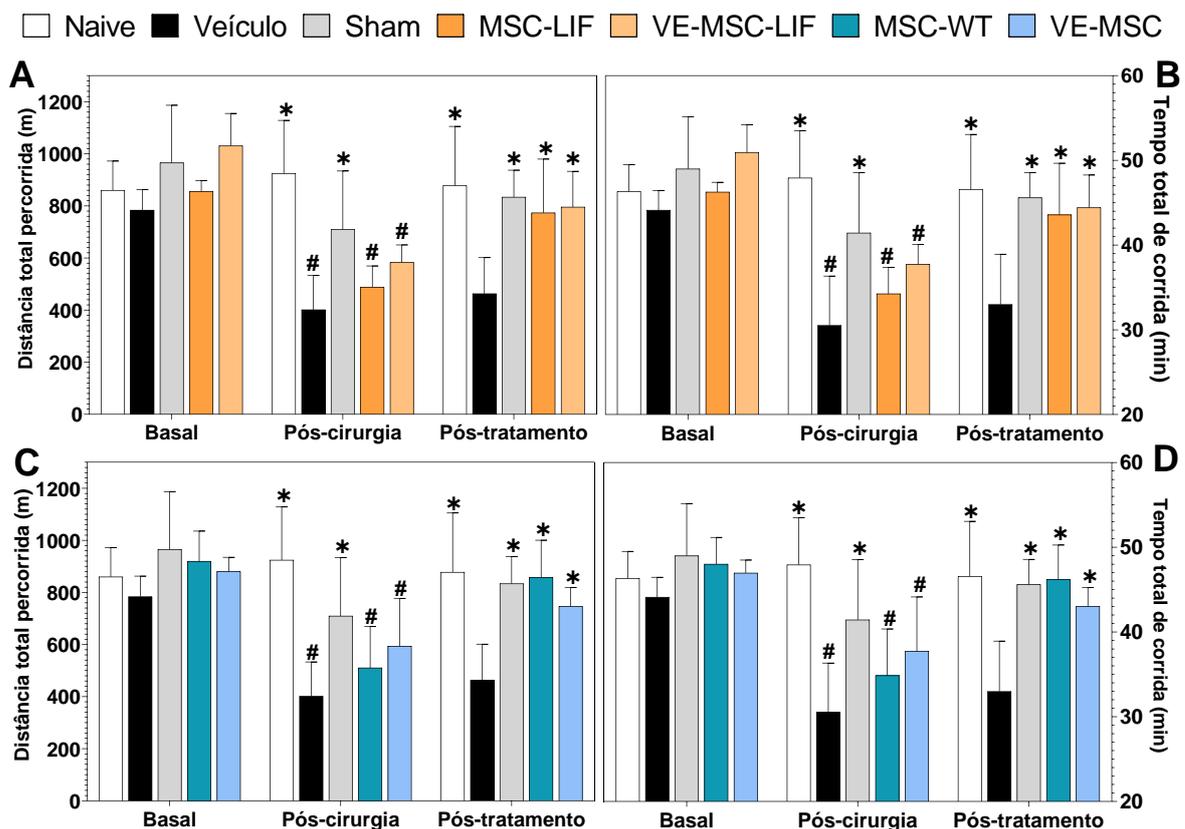


Figura 12 – Efeito do tratamento com MSC-LIF e VE-LIF sobre o desempenho dos camundongos em esteira ergométrica no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático. Camundongos foram submetidos à corrida em esteira ergométrica antes da cirurgia de indução do modelo de neuropatia (basal), 7 dias após a cirurgia e antes do tratamento (pós-cirurgia), e 14 dias após o tratamento (pós-tratamento). No dia 7 após a cirurgia os animais receberam uma administração endovenosa única de MSC-LIF (1×10^6 células/100 μ L), VE-LIF ($2,47 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^8$ vesículas/mL), MSC-WT (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou do veículo (100 μ L de salina). O grupo naive refere-se aos animais não submetidos a procedimentos experimentais, e o grupo sham, a animais falso operados. Os **painéis A e C** apresentam no eixo y as distâncias percorridas em metro e no eixo x os grupos experimentais. Os **painéis B e D** apresentam no eixo y o tempo total que os animais permaneceram na esteira em minutos e no eixo x os grupos experimentais. Os dados foram expressos como média e desvio padrão;

n = 6 camundongos por grupo. * Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,001$). # Diferença significativa em relação aos grupos naive e sham ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA bidirecional seguida do teste de Bonferroni.

2.3.4.5. Efeito dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF sobre a expressão de IL-10 na medula espinal de camundongos no modelo de neuropatia

Considerando o aumento da expressão de IL-10 por macrófagos observado *in vitro*, os efeitos dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF sobre os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 na medula espinal, foram avaliados e comparados aos efeitos de MSC e VE-MSC (figura 13). Os tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF (figura 13A), não modificaram os níveis de IL-10 na medula espinal dos camundongos em ambos os tempos avaliados durante a neuropatia. Por outro lado, os tratamentos com MSC e VE-MSC foram capazes de aumentar os níveis espinais de IL-10 em comparação com animais neuropáticos tratados com veículo ($p < 0,05$) no tempo de 21 dias após a indução da neuropatia (figura 13B).

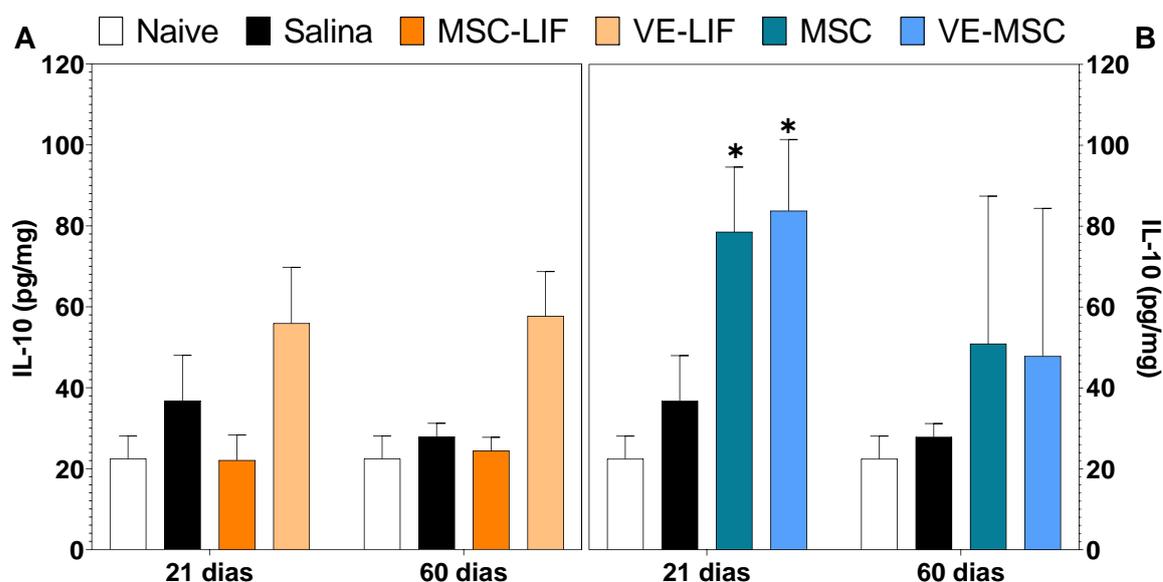


Figura 13. Efeito da administração endovenosa de MSC-LIF e VE-LIF sobre os níveis espinais de IL-10 em camundongos em modelo de dor neuropática. As análises foram realizadas 21 dias após a indução do modelo, no tempo de efeito antinociceptivo máximo dos tratamentos, e no fim do período experimental para todos os grupos (tempo 60 dias). O eixo y representa as concentrações de IL-10 em picogramas por mg de proteína do tecido. No eixo x estão representados os grupos dispostos nos tempos de 21 e 60 dias. **Painel A.** No dia 7 após a indução do modelo experimental os animais receberam uma administração endovenosa única de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou veículo (100 μ L de salina). **Painel B.** No dia 7 após a indução do modelo experimental os animais receberam uma administração endovenosa única de MSC (1×10^6 células/100 μ L), VE-MSC ($7,45 \times 10^9 \pm 2,25 \times 10^8$) ou veículo (100 μ L de salina). O grupo naive refere-se aos animais não submetidos a procedimentos experimentais. Os dados foram expressos como média e desvio padrão; n = 5 camundongos por grupo. * Diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$), como determinado pelo teste de ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey.

2.4. DISCUSSÃO

O uso da engenharia genética de células-tronco mesenquimais é uma área que tem sido recentemente explorada com o objetivo de aprimorar os efeitos terapêuticos dessas células. Com base

nos efeitos neurotróficos, regenerativos e imunomoduladores de LIF, o presente trabalho investigou a hipótese que a superexpressão de LIF por células-tronco mesenquimais pode potencializar as propriedades terapêuticas dessas células na neuropatia dolorosa experimental. Em adição, os efeitos das vesículas extracelulares derivadas dessas células na neuropatia experimental foram também investigados aqui. O potencial terapêutico dos tratamentos foi inicialmente avaliado em testes *in vitro*, que demonstraram que MSC-LIF e VE-LIF reduzem citocinas pró-inflamatórias e elevam IL-10 em macrófagos estimulados de forma similar e com efeito comparável à MSC selvagem e suas vesículas. Avaliações *in vivo* no modelo de neuropatia induzida por ligadura parcial do nervo isquiático em camundongos mostraram que MSC-LIF induz efeitos antinociceptivos térmico e mecânico com perfis distintos que não foram superiores aos de MSC-WT, e que VE-LIF conserva o perfil de efeito de MSC-LIF. Associado a isso, MSC-LIF e VE-LIF melhoram a função física de camundongos neuropáticos. Até o limite do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve o uso de vesículas extracelulares derivadas de células geneticamente modificadas na dor neuropática.

Inicialmente foram utilizados ensaios *in vitro* com macrófagos estimulados para avaliar o potencial terapêutico de MSC-LIF e VE-LIF pela sua capacidade de modular o perfil de citocinas produzidas. Macrófagos são células imunes que participam ativamente dos processos que levam ao estabelecimento, e paradoxalmente também da resolução, da dor neuropática (CHEN; DONNELLY; JI, 2020; KIGUCHI et al., 2017; SILVA; GUIMARÃES; CUNHA, 2021). Macrófagos também estão intimamente relacionados com os efeitos terapêuticos exercidos por células-tronco mesenquimais e suas vesículas extracelulares (GALIPEAU, 2021; GUO et al., 2017; JIANG et al., 2022; LUO et al., 2021; NÉMETH et al., 2009; ZHAO et al., 2019), sendo por isso o modelo escolhido no presente estudo. Dados da co-cultura demonstraram que MSC-LIF apresentaram efeitos moduladores sobre a produção de citocinas por macrófagos estimulados, o que indicou a manutenção da propriedade imunorreguladora das MSC selvagens (MSC-WT). Entretanto a magnitude de inibição das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α por MSC-LIF divergiu do perfil das células selvagens. Enquanto IL-1 β foi inibida por concentrações menores de MSC-WT em comparação a MSC-LIF, o contrário foi observado para a citocina TNF- α . Esses resultados estão em linha com achados da literatura que demonstram que os efeitos moduladores de MSC (MAGGINI et al., 2010) e VE-MSC (ARABPOUR; SAGHAZADEH; REZAEI, 2021) sobre citocinas inflamatórias já foram descritos.

De fato, diversos efeitos terapêuticos de MSC têm sido associados à diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (IMAZIO et al., 2022; KORHONEN et al., 2004; MOORE et al., 2020; SOKIC-MILUTINOVIC; MILOSAVLJEVIC, 2023), o que já foi proposto também durante a neuropatia dolorosa experimental (DAVOLI-FERREIRA et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2021; GAMA et al., 2018; SANTA-CECÍLIA et al., 2019). Em linha com esses dados, a produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos parece estar associada com o desenvolvimento da dor neuropática (SANTA-CECÍLIA et al., 2019; YU et al., 2020).

Similarmente, ambas as linhagens de MSC aumentaram os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 nas co-culturas. Entretanto, apesar de um perfil similar, MSC-LIF apresentou uma potência quase duas vezes superior à de MSC-WT, indicando que a superexpressão de LIF pode ter aumentado a capacidade das MSC de induzir a produção de IL-10. Já foi descrito que LIF induz à polarização de macrófagos, com consequente aumento de IL-10 (JEANNIN; DULUC; DELNESTE, 2011), e que camundongos deficientes em LIF produzem menos IL-10 (WEBER et al., 2005), o que indica um papel importante de LIF na indução de IL-10 por macrófagos/monócitos. Esse efeito pode, em conjunto com o efeito das MSC, aumentar a produção de IL-10 por macrófagos. Evidências têm apontado para uma relação estreita entre os efeitos terapêuticos de células mesenquimais e a citocina IL-10 (GALIPEAU, 2021; KIM; HEMATTI, 2009; NÉMETH et al., 2009). Dessa forma, é possível que o aumento da potência apresentado por MSC-LIF na indução de IL-10 *in vitro* pode se traduzir em um aumento da potência antinociceptiva desta linhagem celular *in vivo*.

Em seguida, foi investigado se as vesículas extracelulares derivadas de MSC-LIF reproduzem os efeitos das células de origem no modelo *in vitro*. De forma similar às MSC-LIF, as VE-LIF também foram capazes de reduzir os níveis de TNF- α e elevar os níveis de IL-10, indicando que as vesículas extracelulares preservam o efeito das células tronco modificadas. É importante ressaltar que as VE-LIF não apresentaram efeito sobre a viabilidade celular dos macrófagos, corroborando os dados dos testes *in vitro*.

Em linha com esse resultado, VE-MSC foi capaz de polarizar macrófagos *in vitro*, elevando a produção de IL-10 (LI et al., 2022). Vesículas extracelulares isoladas de células modificadas geneticamente também promoveram o aumento da expressão gênica e dos níveis de IL-10 em células BV2, uma linhagem de micróglia imortalizada, entretanto esse efeito não foi comparado com vesículas isoladas da célula selvagem (ZHAI et al., 2021).

Após confirmação do potencial terapêutico *in vitro*, ensaios *in vivo* foram realizados para confirmar o efeito antinociceptivo das MSC-LIF e VE-LIF na dor neuropática experimental. O modelo de neuropatia por ligadura parcial do nervo isquiático leva ao desenvolvimento de sintomas estreitamente relacionados com a apresentação clínica da doença (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). Pessoas que sofrem com a dor neuropática apresentam sintomas dolorosos, como dor espontânea e redução do limiar doloroso a estímulos térmicos e mecânicos, mas também uma série de outros sintomas, como cinesiofobia, dificuldade de marcha, e redução da capacidade física, que limitam a vida diária e comprometem a qualidade de vida (DE BRUIJN; GEERTZEN; DIJKSTRA, 2007; KARAYANNIS et al., 2017; STOMPÓR et al., 2019). Desta forma, é importante que sejam avaliados em modelos experimentais parâmetros que se correlacionem também com estes outros sintomas, a fim de aumentar a translacionabilidade das pesquisas pré-clínicas. Por esse motivo, o presente trabalho avaliou os impactos dos tratamentos com VE e MSC sobre parâmetros relacionados à dor e função física.

O aumento da nocicepção associada ao desenvolvimento da neuropatia sensorial foi avaliado por meio de testes comportamentais bem estabelecidos, que detectam a variação nos limiares

nociceptivos térmicos e mecânicos de camundongos. A redução dos limiares nociceptivos nos camundongos, demonstrada aqui experimentalmente no modelo de dor neuropática por constrição de nervo, mimetizam a alodínia mecânica e térmica, alguns dos sintomas experienciados por pessoas que sofrem com dor neuropática (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990; SMITH, 2023). Nesse estudo, os camundongos submetidos à cirurgia de ligadura apresentaram redução dos limiares térmico e mecânico de início rápido e duradouro, caracterizando o desenvolvimento da neuropatia experimental.

Tendo sido confirmado o desenvolvimento da neuropatia, os efeitos dos tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF foram investigados nesse modelo. Os tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF induziram efeitos antinociceptivos durante a neuropatia experimental, entretanto, com perfis distintos em relação à nocicepção térmica e mecânica. A antinocicepção térmica induzida por MSC-LIF e VE-LIF foi bastante similar. Apesar do início tardio de efeito de VE-LIF em relação ao de MSC-LIF, o efeito global de antinocicepção apresentou não apresentou diferenças relevantes. Um único tratamento endovenoso com MSC-LIF ou VE-LIF foi capaz de reverter completamente as alterações de limiar nociceptivo térmico apresentadas pelos camundongos neuropáticos. De forma similar, MSC-WT e VE-WT elevaram os limiares térmicos dos animais neuropáticos a valores similares aos de animais naive. Esse resultado está em linha com estudos prévios do nosso e outros grupos de pesquisa que avaliaram os efeitos de células mesenquimais não modificadas geneticamente (CHEN et al., 2015; EVANGELISTA et al., 2018; GAMA et al., 2018; JOSHI et al., 2021) e geneticamente modificadas (CHOI et al., 2008; FOROUZANFAR et al., 2018) em modelos de neuropatia dolorosa. Apesar de MSC-LIF e VE-LIF apresentarem um efeito similar ao da célula e VE selvagem, MSC-WT e VE-MSC alcançaram seus efeitos máximos mais rapidamente que MSC-LIF e VE-LIF, o que levou a uma discreta, porém significativa diferença de magnitude entre estes efeitos.

Dados do teste de rota-rod corroboraram os resultados dos ensaios de nocicepção deste estudo, evidenciando que os tratamentos com MSC-LIF e VE-LIF não induzem comprometimento motor. Resultados similares foram observados em outros trabalhos (GAMA et al., 2018; SINISCALCO, 2010) e validam as análises de comportamento nociceptivo, que se baseiam nas respostas motoras dos animais. Em conjunto, esses resultados reforçam que as MSC-LIF e VE-LIF induzem de fato um efeito antinociceptivo.

Surpreendentemente, o efeito antinociceptivo de MSC-LIF e VE-LIF sobre a nocicepção mecânica apresentou um perfil bastante distinto do observado para nocicepção térmica. O tratamento com MSC-LIF e VE-LIF induziu efeito antinociceptivo mecânico transitório e parcial, em contraste com a reversão completa da hipernocicepção térmica. Em comparação com MSC-WT e VE-MSC, que revertem completa e sustentadamente os limiares mecânicos de camundongos neuropáticos. Esse perfil discrepante resultou na diferença de magnitude do efeito global das células e vesículas modificadas em relação às selvagens. Dados da literatura corroboram esses resultados com MSC pois mostram que células mesenquimais não modificadas geneticamente, revertem completamente as alterações de limiar mecânico em camundongos com neuropatia experimental de diferentes origens

(DOS SANTOS et al., 2021; GAMA et al., 2018; GUO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2021; SINISCALCO et al., 2011). Diferenças no perfil antinociceptivo foram evidenciadas ainda pela análise comparativa entre MSC-LIF e VE-LIF, que apresentaram um perfil de antinocicepção mecânica de diferente magnitude. O efeito de VE-LIF começou mais rápido e atingiu um pico de antinocicepção maior que MSC-LIF, de forma que o efeito antinociceptivo global de VE-LIF foi superior ao de MSC-LIF. Estes dados indicam que a superexpressão de LIF reduziu a atividade antinociceptiva de MSC. Em consonância com essa observação, o efeito antinociceptivo superior de VE-LIF em relação às MSC-LIF, pode decorrer da menor concentração de LIF nesse contexto, já que as células transplantadas são capazes de continuar secretando LIF, enquanto as vesículas extracelulares carregam um conteúdo fixo de moléculas bioativas.

O perfil contrastante de MSC-LIF e VE-LIF sobre o limiar mecânico e térmico pode indicar uma ação diferencial de LIF em fibras sensoriais específicas. De fato, estudos prévios apontam ações complexas de LIF na nocicepção; tanto sua ação diferencial sobre comportamentos nociceptivos térmicos e mecânicos, quanto seu papel pró- ou antinociceptivo (THOMPSON; DRAY; URBAN, 1996). Um estudo realizado por Thompson e colaboradores relatou a indução de hiperalgesia mecânica, mas não térmica, após a administração sistêmica de LIF (THOMPSON; DRAY; URBAN, 1996). Spofford e colaboradores demonstraram que o receptor de LIF está presente tanto em fibras mielinizadas como não-mielinizadas de neurônios do gânglio da raiz dorsal. O tratamento com LIF em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal, não alterou a atividade espontânea ou as respostas a estímulos térmicos em nociceptores de fibra C (SPOFFORD et al., 2011). Desta forma, é possível que níveis elevados de LIF induzam efeitos pró-nociceptivos modulando especificamente fibras nervosas que medeiam a nocicepção mecânica, o que contrabalancearia os efeitos antinociceptivos inerente às células mesenquimais, reduzindo seu efeito global.

Outro fator que pode ter contribuído para a redução do efeito antinociceptivo de MSC-LIF e VE-LIF pode envolver a regulação de IL-10 na medula espinal dos camundongos neuropáticos. Apesar ser capaz de elevar os níveis de IL-10 *in vitro*, esse efeito não se confirmou no modelo experimental *in vivo*. O tratamento com MSC-LIF ou VE-LIF não induziu aumento dos níveis espinais de IL-10 durante a neuropatia, mesmo quando avaliado na vigência do efeito antinociceptivo desses tratamentos. Em contrapartida, níveis elevados de IL-10 foram verificados 14 dias após os tratamentos com MSC-WT e VE-MSC. Outros trabalhos corroboram o efeito de MSC sobre o aumento níveis espinais de IL-10 (GAMA et al., 2018). IL-10 é uma citocina com propriedades antinociceptivas bem descritas na dor neuropática (MILLIGAN et al., 2012). IL-10 reduz a ativação e induz a liberação de endorfinas pela microglia (MA et al., 2021). Ainda, a administração de intratecal de IL-10 recombinante reduz a hipernocicepção mecânica de ratos neuropáticos (SHEN et al., 2013),

Vale ressaltar, que esses dados não indicam necessariamente uma ausência da contribuição de IL-10 para o efeito de MSC-LIF e VE-LIF, já que essa regulação pode ter ocorrido em tempos iniciais,

após o tratamento. Entretanto, níveis sustentadamente elevados induzidos por MSC e VE-MSC podem ter garantido um efeito antinociceptivo mais durador

O presente trabalho avaliou também os impactos dos tratamentos com VE e MSC sobre parâmetros de função física. Do mesmo modo que na clínica, alterações da função física são descritas em modelos de dor neuropática em camundongos. Por exemplo, modificações da capacidade física e da marcha são descritas na neuropatia dolorosa experimental, e decorrem provavelmente da tentativa de reduzir o estímulo doloroso, minimizando o contato da pata afetada com o piso durante a locomoção (MINAMI et al., 2018; VRINTEN; HAMERS, 2003).

No presente estudo, a capacidade física dos camundongos foi avaliada em uma esteira ergométrica, na qual animais neuropáticos permaneceram menos tempo e percorreram uma distância menor em comparação com animais naive e sham. Similarmente, Minami e colaboradores (2018) demonstram que animais com dor neuropática experimental percorrem uma distância menor em esteira em comparação a animais sham-operados. Esses mesmos autores sugeriram que a redução da função física, evidenciada no estudo pela menor distância percorrida na esteira, é relacionada à nocicepção experienciada pelos animais, considerando que o tratamento agudo com o analgésico morfina normalizou o desempenho na esteira (MINAMI et al., 2018). Clinicamente, foi observado um padrão similar em pacientes apresentando sintomas neuropáticos, que percorreram uma distância menor durante o teste de caminhada quando comparados a indivíduos saudáveis, e cuja intensidade da dor dos pacientes se correlacionou com os resultados do teste de caminhada (NOVAK et al., 2004). Esses dados pré-clínicos e clínicos indicam que o desempenho em esteira ergométrica fornece um bom parâmetro de função física associada à nocicepção, com boa correlação clínica.

Notoriamente, o tratamento com uma única injeção de MSC-LIF ou VE-LIF foi capaz de melhorar tanto tempo de permanência na esteira como a distância percorrida por camundongos neuropáticos, que apresentaram, após os tratamentos, níveis similares aos de animais naive. Os efeitos de MSC-LIF e VE-LIF também não divergiram do efeito apresentado por MSC-WT ou VE-MSC. Esses resultados indicam que antinocicepção exercida por MSC e VE-MSC podem impactar na melhoria da capacidade física dos animais. Em linha com os resultados aqui apresentados, outros trabalhos relataram a melhoria de parâmetros de função física em animais neuropáticos após o tratamento com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CHEN et al., 2023; YEROFEYEVA et al., 2023) ou derivadas do líquido amniótico humano (CHIANG et al., 2016).

Em suma, os dados aqui apresentados indicam que as VE-LIF preservam as propriedades terapêuticas das células de origem, tanto nos testes *in vitro*, como nas avaliações *in vivo*. Essas observações corroboram e fundamentam o uso das vesículas extracelulares como uma abordagem terapêutica substituta ao uso de células-tronco. A potencialização do efeito antinociceptivo de MSC pela manipulação genética para superexpressão de LIF, contudo, não foi observada. Esses resultados indicam que, pelo menos no contexto da neuropatia dolorosa, essa modificação genética não favoreceu ao perfil terapêutico de MSC.

2.5. REFERÊNCIAS

- ABOUZID, M. R. et al. The Safety and Efficacy of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure and Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of Clinical Trials. **Cureus**, v. 15, n. 11, p. e49645, nov. 2023.
- ABY, F. et al. Switch of serotonergic descending inhibition into facilitation by a spinal chloride imbalance in neuropathic pain. **Science Advances**, v. 8, n. 30, p. eabo0689, 29 jul. 2022.
- ADAM, F.; CHATELLIER, G.; ALFONSI, P. Assessment of the concordance between DN4 scores performed by the patient (self-assessment) or by the physician (hetero-assessment) to detect subacute neuropathic postoperative pain. **European Journal of Pain (London, England)**, 19 jan. 2024.
- AGUIAR, D. P. et al. Prevalence of chronic pain in Brazil: systematic review. **BrJP**, v. 4, p. 257–267, 1 set. 2021.
- AGUIAR KOGA, B. A. et al. Role of MSC-derived small extracellular vesicles in tissue repair and regeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 1047094, 1 mar. 2023.
- AHARONSON, B. S.; SCHILLING, M. A. Mapping the technological landscape: Measuring technology distance, technological footprints, and technology evolution. **Research Policy**, v. 45, n. 1, p. 81–96, 1 fev. 2016.
- AL AAMERI, R. F. H. et al. Targeting CXCL1 chemokine signaling for treating cisplatin ototoxicity. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1125948, 31 mar. 2023.
- ALLES, S. R. A.; SMITH, P. A. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 315–347, 1 abr. 2018.
- ARABPOUR, M.; SAGHAZADEH, A.; REZAEI, N. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes. **International Immunopharmacology**, v. 97, p. 107823, ago. 2021.
- BAGNO, L. L. et al. Mechanism of action of mesenchymal stem cells (MSCs): Impact of Delivery Method. **Expert opinion on biological therapy**, v. 22, n. 4, p. 449–463, abr. 2022.
- BALOG, B. M.; SONTI, A.; ZIGMOND, R. E. Neutrophil biology in injuries and diseases of the central and peripheral nervous systems. **Progress in Neurobiology**, v. 228, p. 102488, 1 set. 2023.
- BANNER, L. R. et al. Leukemia inhibitory factor is an anti-inflammatory and analgesic cytokine. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 14, p. 5456–5462, 15 jul. 1998.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 16 out. 2009.
- BEEBE, J. A. et al. Gait Variability and Relationships With Fear, Avoidance, and Pain in Adolescents With Chronic Pain. **Physical Therapy**, v. 101, n. 4, p. pzab012, 4 abr. 2021.
- BERNARDI, C. et al. GM-CSF in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: from Graft-versus-Host Disease to Graft-versus-Tumor effect. **Transplantation and Cellular Therapy**, p. S2666- 6367(24)00141–6, 13 jan. 2024.
- BODART-SANTOS, V. et al. Extracellular vesicles derived from human Wharton’s jelly mesenchymal stem cells protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 332, 20 nov. 2019.
- BOGATCHEVA, N. V.; COLEMAN, M. E. Conditioned Medium of Mesenchymal Stromal Cells: A New Class of Therapeutics. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 84, n. 11, p. 1375–1389, nov. 2019.

- BRACK, A. et al. Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. **Anesthesiology**, v. 101, n. 1, p. 204–211, jul. 2004a.
- BRACK, A. et al. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 229–238, dez. 2004b.
- BREIVIK, H.; EISENBERG, E.; O'BRIEN, T. The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1229, 24 dez. 2013.
- BRINI, A. T. et al. Therapeutic effect of human adipose-derived stem cells and their secretome in experimental diabetic pain. **Scientific Reports**, v. 7, p. 9904, 29 ago. 2017.
- BRYK, M. et al. Mesenchymal stem cells and extracellular vesicles for the treatment of pain: Current status and perspectives. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 17, p. 4281–4299, 2022.
- CABAÑA-MUÑOZ, M. E. et al. Adult Mesenchymal Stem Cells from Oral Cavity and Surrounding Areas: Types and Biomedical Applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2109, 9 ago. 2023.
- CAFFERTY, W. B. et al. Leukemia inhibitory factor determines the growth status of injured adult sensory neurons. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 18, p. 7161–7170, 15 set. 2001.
- CAO, L.; MALON, J. T. Anti-nociceptive role of CXCL1 in a murine model of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 372, p. 225–236, 21 fev. 2018.
- CAPLAN, A. I. Are All Adult Stem Cells The Same? **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 4–10, 1 dez. 2015.
- CARLSON, J. D. et al. Sensitization of pain-modulating neurons in the rostral ventromedial medulla after peripheral nerve injury. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 48, p. 13222–13231, 28 nov. 2007.
- CARREIRA, E. U. et al. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 5, p. 654–663, 2013.
- CARVALHO, T. T. et al. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)-induced mechanical hyperalgesia in mice: Role for peripheral TNF α , IL-1 β and IL-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 749, p. 62–72, 15 fev. 2015.
- CELIK, M. Ö. et al. IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids. **JCI insight**, v. 5, n. 4, p. e133093, 133093, 27 fev. 2020.
- CELIK, M. Ö. et al. IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids. **JCI Insight**, v. 5, n. 4, p. e133093, [s.d.].
- CHAKRAVARTHY, K. et al. Stem Cell Therapy for Chronic Pain Management: Review of Uses, Advances, and Adverse Effects. **Pain Physician**, v. 20, n. 4, p. 293–305, maio 2017.
- CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1 jul. 1994.
- CHEN, C. et al. Intrathecal Injection of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorates Neuropathic Pain in Rats. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 12, p. 3250–3260, 1 dez. 2016.
- CHEN, G. et al. Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 137, n. Pt 8, p. 2193–2209, ago. 2014.
- CHEN, G. et al. Intrathecal bone marrow stromal cells inhibit neuropathic pain via TGF- β secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 8, p. 3226–3240, 3 ago. 2015.
- CHEN, H. et al. Exploring the Correlation Between the Regulation of Macrophages by Regulatory T Cells and Peripheral Neuropathic Pain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 813751, 2022.

- CHEN, O.; DONNELLY, C. R.; JI, R.-R. Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. **Current Opinion in Neurobiology**, Brain, gut, and immune system interactions. v. 62, p. 17–25, 1 jun. 2020.
- CHEN, S.-H. et al. Adipose-derived stem cells modulate neuroinflammation and improve functional recovery in chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. **Frontiers in Neuroscience**, v. 17, p. 1172740, 29 jun. 2023.
- CHENAF, C. et al. Prevalence of chronic pain with or without neuropathic characteristics in France using the capture-recapture method: a population-based study. **Pain**, v. 159, n. 11, p. 2394–2402, nov. 2018.
- CHENG, T.; XU, Z.; MA, X. The role of astrocytes in neuropathic pain. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 1007889, 20 set. 2022.
- CHIANG, C.-Y. et al. Feasibility of Human Amniotic Fluid Derived Stem Cells in Alleviation of Neuropathic Pain in Chronic Constrictive Injury Nerve Model. **PloS One**, v. 11, n. 7, p. e0159482, 2016.
- CHOI, J.-J. et al. Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 153, n. 2, p. 269–276, ago. 2008.
- CHOI, S. S. et al. Human Astrocytes: Secretome Profiles of Cytokines and Chemokines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e92325, 1 abr. 2014.
- CHU, M. et al. Nebulization Therapy with Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for COVID-19 Pneumonia. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, n. 6, p. 2152–2163, ago. 2022.
- CHUNG, K. et al. Sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia of the injured peripheral nerve in a rat neuropathic pain model. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 376, n. 2, p. 241–252, 9 dez. 1996.
- COBOS, E. J.; PORTILLO-SALIDO, E. “Bedside-to-Bench” Behavioral Outcomes in Animal Models of Pain: Beyond the Evaluation of Reflexes. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 6, p. 560–591, dez. 2013.
- COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 16 fev. 2017.
- CORDER, G. et al. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. **Annual review of neuroscience**, v. 41, p. 453–473, 8 jul. 2018.
- CORNESS, J. et al. Influence of leukemia inhibitory factor on galanin/GMAP and neuropeptide Y expression in mouse primary sensory neurons after axotomy. **Experimental Brain Research**, v. 112, n. 1, p. 79–88, nov. 1996.
- CURTIS, R. et al. Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. **Neuron**, v. 12, n. 1, p. 191–204, jan. 1994.
- DABROWSKA, S. et al. Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 591065, 5 fev. 2021.
- DAHLHAMER, J. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults — United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, 2018.
- DALTRO, P. S. et al. Therapy with mesenchymal stromal cells or conditioned medium reverse cardiac alterations in a high-fat diet-induced obesity model. **Cytotherapy**, v. 19, n. 10, p. 1176–1188, 1 out. 2017.
- DAMASCENO, P. K. F. et al. Genetic Engineering as a Strategy to Improve the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.

- DAOU, I. et al. Optogenetic Silencing of Nav1.8-Positive Afferents Alleviates Inflammatory and Neuropathic Pain. **eNeuro**, v. 3, n. 1, 1 jan. 2016.
- DAVIS, S. M.; PENNYPACKER, K. R. The role of the leukemia inhibitory factor receptor in neuroprotective signaling. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 183, p. 50–57, mar. 2018.
- DAVOLI-FERREIRA, M. et al. Regulatory T cells counteract neuropathic pain through inhibition of the Th1 response at the site of peripheral nerve injury. **Pain**, v. 161, n. 8, p. 1730–1743, ago. 2020.
- DE BRUIJN, I. L.; GEERTZEN, J. H. B.; DIJKSTRA, P. U. Functional outcome after peroneal nerve injury. **International Journal of Rehabilitation Research**, v. 30, n. 4, p. 333, dez. 2007.
- DE FREITAS-SUAREZ, A. et al. An Integrative Approach to the Current Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorders and the Implementation of Leukemia Inhibitor Factor as a Mediator of Neurocognitive Preservation. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 11, p. 2194, 11 nov. 2023.
- DE LOGU, F. et al. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1887, 1 dez. 2017.
- DE RIDDER, D.; ADHIA, D.; VANNESTE, S. The anatomy of pain and suffering in the brain and its clinical implications. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 130, p. 125–146, 1 nov. 2021.
- DI STEFANO, G. et al. Pharmacotherapeutic Options for Managing Neuropathic Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pain Research and Management**, v. 2021, p. e6656863, 26 abr. 2021.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.
- DOS SANTOS, G. G. L. et al. Mesenchymal stem cells reduce the oxaliplatin-induced sensory neuropathy through the reestablishment of redox homeostasis in the spinal cord. **Life Sciences**, v. 265, p. 118755, 15 jan. 2021.
- DULUC, D. et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4319–4330, 15 dez. 2007.
- DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **PAIN**, v. 132, n. 3, p. 237, dez. 2007.
- DWORKIN, R. H. et al. Diagnosis and assessment of pain associated with herpes zoster and postherpetic neuralgia. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 1 Suppl 1, p. S37-44, jan. 2008.
- EDELMANN, M. J.; KIMA, P. E. Current understanding of extracellular vesicle homing/tropism. **Zoonoses (Burlington, Mass.)**, v. 2, p. 14, 2022.
- ESCH, T.; KREAM, R. M.; STEFANO, G. B. Emerging regulatory roles of opioid peptides, endogenous morphine, and opioid receptor subtypes in immunomodulatory processes: Metabolic, behavioral, and evolutionary perspectives. **Immunology Letters**, v. 227, p. 28–33, nov. 2020.
- EVANGELISTA, A. F. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, p. 189, 22 jun. 2018.
- EVANGELISTA, A. F. **Mecanismos envolvidos no efeito terapêutico de células mesenquimais de medula óssea em modelo experimental de neuropatia diabética sensorial**. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)—Salvador: Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

- EVANGELISTA, A. F.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Cell-free therapy: a neuroregenerative approach to sensory neuropathy? **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 8, p. 1383, ago. 2019.
- FAN, M. et al. Detrimental alteration of mesenchymal stem cells by an articular inflammatory microenvironment results in deterioration of osteoarthritis. **BMC Medicine**, v. 21, n. 1, p. 215, 19 jun. 2023.
- FAN, X.-L. et al. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 14, p. 2771–2794, 2020.
- FERREIRA, G. E. et al. Efficacy, safety, and tolerability of antidepressants for pain in adults: overview of systematic reviews. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 380, p. e072415, 1 fev. 2023.
- FILIPOVIC, R.; JAKOVCEVSKI, I.; ZECEVIC, N. GRO- α and CXCR2 in the Human Fetal Brain and Multiple Sclerosis Lesions. **Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 2–4, p. 279–290, 15 set. 2003.
- FINNERUP, N. B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 2, p. 162–173, 1 fev. 2015.
- FIGLIORE, N. T. et al. Pain-resolving immune mechanisms in neuropathic pain. **Nature Reviews. Neurology**, v. 19, n. 4, p. 199–220, abr. 2023.
- FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain**, v. 122, n. 3, p. 245–257, jun. 2006.
- FONSECA-RODRIGUES, D.; ALMEIDA, A.; PINTO-RIBEIRO, F. A New Gal in Town: A Systematic Review of the Role of Galanin and Its Receptors in Experimental Pain. **Cells**, v. 11, n. 5, p. 839, 1 mar. 2022.
- FOROUZANFAR, F. et al. New approach for the treatment of neuropathic pain: Fibroblast growth factor 1 gene-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 22, n. 2, p. 295–310, fev. 2018.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, n. 3, p. 381–390, dez. 1966.
- GABAY, E. et al. Chronic blockade of interleukin-1 (IL-1) prevents and attenuates neuropathic pain behavior and spontaneous ectopic neuronal activity following nerve injury. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 15, n. 3, p. 242–248, mar. 2011.
- GALIPEAU, J. Macrophages at the nexus of mesenchymal stromal cell potency: The emerging role of chemokine cooperativity. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 39, n. 9, p. 1145–1154, set. 2021.
- GALVIN, D. A.; C, M. The role of T-lymphocytes in neuropathic pain initiation, development of chronicity and treatment. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 18, p. 100371, dez. 2021.
- GAMA, K. B. et al. Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 8179013, 2018.
- GANE, J. M.; STOCKLEY, R. A.; SAPEY, E. TNF- α Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF- α Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1079851, 2016.
- GAO, W. et al. Treg versus Th17 lymphocyte lineages are cross-regulated by LIF versus IL-6. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 8, n. 9, p. 1444–1450, 1 maio 2009.

- GAO, X. et al. Huc-MSCs-derived exosomes attenuate neuropathic pain by inhibiting activation of the TLR2/MyD88/NF- κ B signaling pathway in the spinal microglia by targeting Rsad2. **International Immunopharmacology**, v. 114, p. 109505, jan. 2023a.
- GAO, X. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles carrying miR-99b-3p restrain microglial activation and neuropathic pain by stimulating autophagy. **International Immunopharmacology**, v. 115, p. 109695, fev. 2023b.
- GAO, Y. et al. Transfer of inflammatory mitochondria via extracellular vesicles from M1 macrophages induces ferroptosis of pancreatic beta cells in acute pancreatitis. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12410, fev. 2024.
- GARDINER, N. J. et al. Expression of gp130 and leukaemia inhibitory factor receptor subunits in adult rat sensory neurones: regulation by nerve injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, n. 1, p. 100–109, out. 2002.
- GE, M. et al. Effects of mesenchymal stem cells transplantation on cognitive deficits in animal models of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **Brain and Behavior**, v. 8, n. 7, p. e00982, jul. 2018.
- GEARING, D. P. et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). **The EMBO Journal**, v. 6, n. 13, p. 3995–4002, 20 dez. 1987.
- GEORGE, A. et al. Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor-alpha, increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. **Pain**, v. 88, n. 3, p. 267–275, 1 dez. 2000.
- GHEORGHE, R.-O. et al. The Yin/Yang Balance of Communication between Sensory Neurons and Macrophages in Traumatic Peripheral Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12389, jan. 2022.
- GNECCHI, M. et al. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. Em: GNECCHI, M. (Ed.). **Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2016. p. 123–146.
- GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–231, abr. 2014.
- GUO, W. et al. Bone Marrow Stromal Cells Produce Long-Term Pain Relief in Rat Models of Persistent Pain. **Stem Cells**, v. 29, n. 8, p. 1294–1303, 1 ago. 2011.
- GUO, W. et al. Further observations on the behavioral and neural effects of bone marrow stromal cells in rodent pain models. **Molecular Pain**, v. 12, p. 1744806916658043, 1 jan. 2016.
- GUO, W. et al. In vivo immune interactions of multipotent stromal cells underlie their long-lasting pain-relieving effect. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10107, 31 ago. 2017.
- GUO, Y. et al. Small extracellular vesicles-based cell-free strategies for therapy. **MedComm**, v. 2, n. 1, p. 17–26, 2021.
- HAN, Y. et al. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 886, 13 ago. 2019.
- HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, n. 1, p. 77–88, 1 jan. 1988.
- HARRELL, C. R. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1605, 11 dez. 2019.
- HENDRY, I. A. et al. Binding and retrograde transport of leukemia inhibitory factor by the sensory nervous system. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3427–3434, set. 1992.
- HIGGINS, C. et al. Cross-sectional study examining the epidemiology of chronic pain in Nepal. **Pain Reports**, v. 8, n. 2, p. e1067, 2023.

- HIRAI, H.; KARIAN, P.; KIKYO, N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. **The Biochemical Journal**, v. 438, n. 1, p. 11–23, 15 ago. 2011.
- HMADCHA, A. et al. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 43, 2020.
- HOERDER, S. et al. Acupuncture in diabetic peripheral neuropathy-neurological outcomes of the randomized acupuncture in diabetic peripheral neuropathy trial. **World Journal of Diabetes**, v. 14, n. 12, p. 1813–1823, 15 dez. 2023.
- HSU, J.-M. et al. Locally Applied Stem Cell Exosome-Scaffold Attenuates Nerve Injury-Induced Pain in Rats. **Journal of Pain Research**, v. 13, p. 3257–3268, 2020.
- HU, Y. et al. Progress in Pathological and Therapeutic Research of HIV-Related Neuropathic Pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 43, n. 7, p. 3343–3373, out. 2023.
- HUA, T. et al. Huc-MSCs-derived exosomes attenuate inflammatory pain by regulating microglia pyroptosis and autophagy via the miR-146a-5p/TRAF6 axis. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 324, 14 jul. 2022.
- HUNG, A. L.; LIM, M.; DOSHI, T. L. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 17, p. 287–293, out. 2017.
- HUNT, C. et al. Prevalence of chronic pain after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. **Regional Anesthesia & Pain Medicine**, v. 46, n. 4, p. 328–336, 1 abr. 2021.
- IASP, I. A. FOR THE S. OF P. **Terminology | International Association for the Study of Pain**. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>>. Acesso em: 6 fev. 2024.
- IASP, I. A. FOR THE S. OF P. **IASP Guidelines for the Use of Animals in Research. International Association for the Study of Pain (IASP)**, 2023. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/resources/guidelines/iasp-guidelines-for-the-use-of-animals-in-research/>>. Acesso em: 30 jan. 2024
- IMAZIO, M. et al. Anti-interleukin-1 agents for pericarditis: a primer for cardiologists. **European Heart Journal**, v. 43, n. 31, p. 2946–2957, 14 ago. 2022.
- ISLAM, M. A. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 19, p. 6311, 30 set. 2023.
- JANSSENS, K.; SLAETS, H.; HELTINGS, N. Immunomodulatory properties of the IL-6 cytokine family in multiple sclerosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1351, p. 52–60, set. 2015.
- JEANNIN, P.; DULUC, D.; DELNESTE, Y. IL-6 and leukemia-inhibitory factor are involved in the generation of tumor-associated macrophage: regulation by IFN- γ . **Immunotherapy**, v. 3, n. 4 Suppl, p. 23–26, abr. 2011.
- JHENG, Y.-W. et al. Neuropathic Pain Affects Quality of Life in Breast Cancer Survivors with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Pain Management Nursing: Official Journal of the American Society of Pain Management Nurses**, p. S1524- 9042(23)00250–3, 25 jan. 2024.
- JL, Y. et al. Effect of sympathetic sprouting on the excitability of dorsal root ganglion neurons and afferents in a rat model of neuropathic pain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 587, p. 49–57, 8 jan. 2022.
- JIANG, X. et al. Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells alleviate skeletal muscle injury induced by acute compartment syndrome. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, n. 1, p. 313, 15 jul. 2022.
- JIANG, Y. et al. Structural Designs and Mechanogating Mechanisms of the Mechanosensitive Piezo Channels. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 6, p. 472–488, jun. 2021.
- JORGENSEN, M. M.; DE LA PUENTE, P. Leukemia Inhibitory Factor: An Important Cytokine in Pathologies and Cancer. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 217, 27 jan. 2022.

- JOSHI, H. P. et al. Stem Cell Therapy for Modulating Neuroinflammation in Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4853, 3 maio 2021.
- KALVALA, A. K. et al. Cannabidiol-Loaded Extracellular Vesicles from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 554, 7 fev. 2023.
- KARAYANNIS, N. V. et al. Pain interference and physical function demonstrate poor longitudinal association in people living with pain: a PROMIS investigation. **PAIN**, v. 158, n. 6, p. 1063, jun. 2017.
- KARIMI, S. A.; ZAHRA, F. T.; MARTIN, L. J. IUPHAR review: Navigating the role of preclinical models in pain research. **Pharmacological Research**, v. 200, p. 107073, fev. 2024.
- KERCKHOVE, N. et al. Cross-Sectional Study of Prevalence, Characterization and Impact of Chronic Pain Disorders in Workers. **The Journal of Pain**, v. 22, n. 5, p. 520–532, 1 maio 2021.
- KEREKES, N.; LANDRY, M.; HÖKFELT, T. Leukemia inhibitory factor regulates galanin/galanin message-associated peptide expression in cultured mouse dorsal root ganglia; with a note on in situ hybridization methodology. **Neuroscience**, v. 89, n. 4, p. 1123–1134, 1999.
- KESHTKAR, S.; AZARPIRA, N.; GHAREMANI, M. H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 63, 9 mar. 2018.
- KIGUCHI, N. et al. Pharmacological Regulation of Neuropathic Pain Driven by Inflammatory Macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2296, 1 nov. 2017.
- KILPATRICK, T. J. et al. Leukaemia inhibitory factor abrogates Paclitaxel-induced axonal atrophy in the Wistar rat. **Brain Research**, v. 911, n. 2, p. 163–167, 24 ago. 2001.
- KIM, J.; HEMATTI, P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. **Experimental hematology**, v. 37, n. 12, p. 1445–1453, dez. 2009.
- KISSOON, N. R. et al. Quantitative assessment of painful diabetic peripheral neuropathy after high-frequency spinal cord stimulation: a pilot study. **Pain Medicine (Malden, Mass.)**, v. 24, n. Supplement_2, p. S41–S47, 13 out. 2023.
- KITADE, K. et al. Reduced Neuroinflammation Via Astrocytes and Neutrophils Promotes Regeneration After Spinal Cord Injury in Neonatal Mice. **Journal of Neurotrauma**, v. 40, n. 23–24, p. 2566–2579, dez. 2023.
- KOPSKY, D. J.; KEPPEL HESSELINK, J. M.; CASALE, R. Walking with Neuropathic Pain: Paradoxical Shift from Burden to Support? **Case Reports in Medicine**, v. 2015, p. 764950, 2015.
- KORBECKI, J. et al. CXCR2 Receptor: Regulation of Expression, Signal Transduction, and Involvement in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2168, 16 fev. 2022.
- KORHONEN, T. et al. Efficacy of infliximab for disc herniation-induced sciatica: one-year follow-up. **Spine**, v. 29, n. 19, p. 2115–2119, 1 out. 2004.
- KRISHNA MOHAN, G. V. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy for a Better Prognosis of Heart Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Cureus**, v. 15, n. 8, p. e43037, ago. 2023.
- LABUZ, D. et al. Immune cell-derived opioids protect against neuropathic pain in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 2, p. 278–286, 2 fev. 2009.

- LABUZ, D. et al. T lymphocytes containing β -endorphin ameliorate mechanical hypersensitivity following nerve injury. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 7, p. 1045–1053, out. 2010.
- LAMBARTH, A. et al. Prevalence of chronic pain or analgesic use in children and young people and its long-term impact on substance misuse, mental illness, and prescription opioid use: a retrospective longitudinal cohort study. **The Lancet Regional Health - Europe**, v. 35, p. 100763, 15 nov. 2023.
- LAURIA, P. S. S. et al. Ayahuasca and its major component harmine promote antinociceptive effects in mouse models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 323, p. 117710, 6 abr. 2024.
- LI, K. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of the extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells on osteoarthritis via M2 macrophages. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, p. 38, 20 jan. 2022.
- LIGHTNER, A. L. et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle Infusion for the Treatment of Respiratory Failure From COVID-19: A Randomized, Placebo-Controlled Dosing Clinical Trial. **Chest**, v. 164, n. 6, p. 1444–1453, dez. 2023.
- LINS, F. S. V. et al. New Pregnane Glycosides from *Mandevilla dardanoi* and Their Anti-Inflammatory Activity. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 5992, jan. 2022.
- LIU, K. et al. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia–reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. **Microvascular Research**, v. 92, p. 10–18, 1 mar. 2014.
- LIU, L. et al. Comparative Efficacy of Multiple Variables of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of Neuropathic Pain in Rats. **Military Medicine**, v. 182, n. suppl_1, p. 175–184, 1 mar. 2017.
- LIU, P. et al. Collaborative Action of Microglia and Astrocytes Mediates Neutrophil Recruitment to the CNS to Defend against *Escherichia coli* K1 Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6540, 11 jun. 2022.
- LIU, T.; VAN ROOIJEN, N.; TRACEY, D. J. Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. **Pain**, v. 86, n. 1, p. 25–32, 1 maio 2000.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LONDON, A.; COHEN, M.; SCHWARTZ, M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 34, 8 abr. 2013.
- LOPES, D. M. et al. Sex differences in peripheral not central immune responses to pain-inducing injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16460, 28 nov. 2017.
- LOPES, F. S. R. et al. Crotalphine Modulates Microglia M1/M2 Phenotypes and Induces Spinal Analgesia Mediated by Opioid-Cannabinoid Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11571, 30 set. 2022.
- LOTFY, A.; ABOQUELLA, N. M.; WANG, H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, p. 66, 7 abr. 2023.
- LU, W. et al. Efficacy and safety of mesenchymal stem cell therapy in liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, n. 1, p. 301, 20 out. 2023.
- LU, Y. et al. Human PMSCs-derived small extracellular vesicles alleviate neuropathic pain through miR-26a-5p/Wnt5a in SNI mice model. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 221, 7 set. 2022a.

- LU, Y. et al. Human PMSCs-derived small extracellular vesicles alleviate neuropathic pain through miR-26a-5p/Wnt5a in SNI mice model. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 221, 7 set. 2022b.
- LUO, D. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a promising cell-free therapy for knee osteoarthritis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1309946, 2024.
- LUO, Z. et al. Bone Marrow Stromal Cell-Derived Exosomes Promote Muscle Healing Following Contusion Through Macrophage Polarization. **Stem Cells and Development**, v. 30, n. 3, p. 135–148, fev. 2021.
- MA, L. et al. Spinal microglial β -endorphin signaling mediates IL-10 and exenatide-induced inhibition of synaptic plasticity in neuropathic pain. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 27, n. 10, p. 1157–1172, 10 jun. 2021.
- MAGGINI, J. et al. Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9252, 16 fev. 2010.
- MANJAVACHI, M. N. et al. The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 14, n. 1, p. 23–31, jan. 2010.
- MANJAVACHI, M. N. et al. The role of keratinocyte-derived chemokine (KC) on hyperalgesia caused by peripheral nerve injury in mice. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 17–27, abr. 2014.
- MARCATO, J. DE M.; NORONHA, D. P. Indicadores bibliométricos e cientométricos em CT&I: apontamentos históricos, metodológicos e tendências de aplicação. 2013.
- MARTIN, L. F. et al. Green Light Antinociceptive and Reversal of Thermal and Mechanical Hypersensitivity Effects Rely on Endogenous Opioid System Stimulation. **The Journal of Pain**, v. 22, n. 12, p. 1646–1656, dez. 2021.
- MCLACHLAN, E. M. et al. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. **Nature**, v. 363, n. 6429, p. 543–546, jun. 1993.
- MEAADI, J. et al. The safety and efficacy of gabapentinoids in the management of neuropathic pain: a systematic review with meta-analysis of randomised controlled trials. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 45, n. 3, p. 556–565, jun. 2023.
- MENDONÇA, M. V. P. et al. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 6, p. 126, 17 nov. 2014.
- MERKLE, S. L.; SLUKA, K. A.; FREY-LAW, L. A. The interaction between pain and movement. **Journal of hand therapy : official journal of the American Society of Hand Therapists**, v. 33, n. 1, p. 60–66, 2020.
- MESSAOUDI, O. et al. Stem Cells and Extrusion 3D Printing for Hyaline Cartilage Engineering. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 2, jan. 2021.
- MICLESCU, A. et al. Chronic neuropathic pain after traumatic peripheral nerve injuries in the upper extremity: prevalence, demographic and surgical determinants, impact on health and on pain medication. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 20, n. 1, p. 95–108, 18 dez. 2019.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, abr. 2002.
- MILLIGAN, E. D. et al. Spinal Interleukin-10 Therapy to Treat Peripheral Neuropathic Pain. **Neuromodulation : journal of the International Neuromodulation Society**, v. 15, n. 6, p. 520–526, nov. 2012.
- MINAMI, K. et al. Effects of duloxetine on pain and walking distance in neuropathic pain models via modulation of the spinal monoamine system. **European Journal of Pain**, v. 22, n. 2, p. 355–369, fev. 2018.

- MIRANPURI, G. S. et al. Role of Microglia and Astrocytes in Spinal Cord Injury Induced Neuropathic Pain. **Annals of Neurosciences**, v. 28, n. 3–4, p. 219–228, jul. 2021.
- MOCCHI, M. et al. Freeze-Dried Mesenchymal Stem Cell-Secretome Pharmaceuticalization: Optimization of Formulation and Manufacturing Process Robustness. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1129, 23 jul. 2021.
- MONTOTO-MEIJIDE, R. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Traumatic Spinal Cord Injury: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11719, 20 jul. 2023.
- MOORE, D. et al. Characterisation of the effects of pulsed radio frequency treatment of the dorsal root ganglion on cerebrospinal fluid cellular and peptide constituents in patients with chronic radicular pain: A randomised, triple-blinded, controlled trial. **Journal of Neuroimmunology**, v. 343, p. 577219, 15 jun. 2020.
- MØRCH, C. D. et al. Oxaliplatin causes increased offset analgesia during chemotherapy - a feasibility study. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 23, n. 4, p. 729–734, 26 out. 2023.
- MUSOLINO, P. L. et al. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. **Neuroscience Letters**, v. 418, n. 1, p. 97–101, 11 maio 2007.
- NÉMETH, K. 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, jan. 2009.
- NICOLA, N. A.; BABON, J. J. Leukemia inhibitory factor (LIF). **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 533–544, out. 2015.
- NIEMEYER, C. S. et al. Trigeminal Postherpetic Neuralgia: From Pathophysiology to Treatment. **Current Pain and Headache Reports**, 23 jan. 2024.
- NOVAK, P. et al. Influence of foot pain on walking ability of diabetic patients. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 36, n. 6, p. 249–252, nov. 2004.
- OBARA, I. et al. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. **Pain**, v. 141, n. 3, p. 283–291, fev. 2009.
- OLIVEIRA, A. L. L. et al. Reestablishment of Redox Homeostasis in the Nociceptive Primary Afferent as a Mechanism of Antinociception Promoted by Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Oxaliplatin-Induced Chronic Peripheral Neuropathy. **Stem Cells International**, v. 2021, p. 8815206, 2021.
- OLIVEIRA COSTA, J. F. et al. Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 469–474, 1 dez. 2014.
- OMARI, K. M. et al. Neuroprotection and Remyelination after Autoimmune Demyelination in Mice that Inducibly Overexpress CXCL1. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 164–176, 1 jan. 2009.
- ONORATO, C. et al. Navigating the mycelium patent maze: A holistic approach to patent mapping in production technologies. **World Patent Information**, v. 76, p. 102265, 1 mar. 2024.
- OZTÜRK, G. et al. Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice. **Cytokine**, v. 29, n. 1, p. 31–41, 7 jan. 2005.
- PADDA, J. et al. Stem Cell Therapy and Its Significance in Pain Management. **Cureus**, v. 13, n. 8, 2021.
- PAICIUS, R. et al. Safety and Efficacy of Intravenous ExoFlo in the Treatment of Complex Regional Pain Syndrome. **Pain Physician**, v. 26, n. 7, p. E851–E857, nov. 2023.
- PANDELANI, F. F. et al. Chronic pain: its impact on the quality of life and gender. **Frontiers in Pain Research (Lausanne, Switzerland)**, v. 4, p. 1253460, 2023.

- PANNELL, M. et al. Adoptive transfer of M2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 262, 7 out. 2016.
- PEREIRA, S. et al. Cancer-Related Neuropathic Pain, Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy and Cognitive Decline in a 5-Year Prospective Study of Patients with Breast Cancer-NEON-BC. **Healthcare (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 24, p. 3132, 9 dez. 2023.
- PHINNEY, D. G.; PITTENGER, M. F. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 35, n. 4, p. 851–858, abr. 2017.
- PITCHER, G. M.; HENRY, J. L. Governing role of primary afferent drive in increased excitation of spinal nociceptive neurons in a model of sciatic neuropathy. **Experimental Neurology**, v. 214, n. 2, p. 219–228, 1 dez. 2008.
- POKROVSKAYA, L. A. et al. Biological activity of mesenchymal stem cells secretome as a basis for cell-free therapeutic approach. **Research Results in Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 57–68, 30 mar. 2020.
- POTTORF, T. S. et al. The Role of Microglia in Neuroinflammation of the Spinal Cord after Peripheral Nerve Injury. **Cells**, v. 11, n. 13, p. 2083, 30 jun. 2022.
- RAJA, S. N. et al. The Revised IASP definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 1 set. 2020.
- RAMEZANKHANI, R. et al. Two Decades of Global Progress in Authorized Advanced Therapy Medicinal Products: An Emerging Revolution in Therapeutic Strategies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 547653, 17 dez. 2020.
- RAPOSO, G.; STAHL, P. D. Extracellular vesicles, genetic programmers. **Nature Cell Biology**, v. 26, n. 1, p. 22–23, jan. 2024.
- RATTÉ, S.; PRESCOTT, S. A. Afferent hyperexcitability in neuropathic pain and the inconvenient truth about its degeneracy. **Current Opinion in Neurobiology**, Neurobiology of disease. v. 36, p. 31–37, 1 fev. 2016.
- REINERT, J. P.; VERONIN, M. A.; MEDINA, C. Tricyclic Antidepressants in Nociceptive and Neuropathic Pain: A Review of Their Analgesic Properties in Combination With Opioids. **The Journal of Pharmacy Technology: jPT: Official Publication of the Association of Pharmacy Technicians**, v. 39, n. 1, p. 35–40, fev. 2023.
- RITTNER, H. L. et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. **Anesthesiology**, v. 95, n. 2, p. 500–508, ago. 2001.
- RITTNER, H. L. et al. Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 14, p. 2627–2629, dez. 2006.
- RIZZO, M. G. et al. Therapeutic Perspectives for Inflammation and Senescence in Osteoarthritis Using Mesenchymal Stem Cells, Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Senolytic Agents. **Cells**, v. 12, n. 10, p. 1421, 18 maio 2023.
- ROBB, K. P. et al. Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency. **Cytotherapy**, v. 21, n. 3, p. 289–306, mar. 2019.
- ROSEN, S. F. et al. Increased pain sensitivity and decreased opioid analgesia in T-cell-deficient mice and implications for sex differences. **Pain**, v. 160, n. 2, p. 358–366, fev. 2019.
- SAGARADZE, G.; MONAKOVA, A.; EFIMENKO, A. Potency Assays for Mesenchymal Stromal Cell Secretome-Based Products for Tissue Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9379, 27 maio 2023.
- SANSONE, P. et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 43, p. E9066–E9075, 24 out. 2017.

- SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. The NOD2 signaling in peripheral macrophages contributes to neuropathic pain development. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 102–116, jan. 2019.
- SANTOS, G. C. et al. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Overexpression Increases the Angiogenic Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 778, 2020.
- SANTOS, J. R.; ROCHA, A. M. Perfil das Bases de Dados Científicas e Tecnológicas Utilizadas por Pesquisadores Brasileiros em Estudos nas áreas de Ciências da Vida. **Cadernos de Prospecção**, v. 14, n. 3, p. 784–784, 1 jul. 2021.
- SCHÄFER, S. et al. Influence of intrathecal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on spinal inflammation and pain hypersensitivity in a rat model of peripheral nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 157, 12 set. 2014.
- SCHEFF, N. N. et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor-Induced Neutrophil Recruitment Provides Opioid-Mediated Endogenous Anti-nociception in Female Mice With Oral Squamous Cell Carcinoma. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 217, 2019.
- SCOTT, R. L. et al. Expression of leukemia inhibitory factor receptor mRNA in sensory dorsal root ganglion and spinal motor neurons of the neonatal rat. **Neuroscience Letters**, v. 295, n. 1–2, p. 49–53, 1 dez. 2000.
- 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, 1 nov. 1990.
- SEZER, G. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells alleviate paclitaxel-induced mechanical allodynia in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 36, n. 12, p. e23207, dez. 2022.
- SHAHOROR, R. A. et al. Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: The Next Generation of Stem Cell-Based Therapy for TBI. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4051, 5 jun. 2020.
- SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The Cytokine Network of Wallerian Degeneration: Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 α , and Interleukin-1 β . **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3052–3060, 15 abr. 2002.
- SHAMMAA, R. et al. Mesenchymal Stem Cells Beyond Regenerative Medicine. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.
- SHELASH AL-HAWARY, S. I. et al. The microRNAs (miRs) overexpressing mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in neurological disorders; hope or hype. **Biotechnology Progress**, v. 39, n. 6, p. e3383, 2023.
- SHEN, K.-F. et al. Interleukin-10 down-regulates voltage gated sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. **Experimental Neurology**, v. 247, p. 466–475, set. 2013.
- SHI, J.-T. et al. Local analgesia of electroacupuncture is mediated by the recruitment of neutrophils and released β -endorphins. **Pain**, v. 164, n. 9, p. 1965–1975, 1 set. 2023.
- SHIMOJI, K.; KUROKAWA, S. Anatomical Physiology of Pain. Em: SHIMOJI, K.; NADER, A.; HAMANN, W. (Eds.). **Chronic Pain Management in General and Hospital Practice**. Singapore: Springer, 2021. p. 21–42.
- SHIUE, S.-J. et al. Mesenchymal stem cell exosomes as a cell-free therapy for nerve injury-induced pain in rats. **PAIN**, v. 160, n. 1, p. 210, jan. 2019.
- SILVA, C. E. A.; GUIMARÃES, R. M.; CUNHA, T. M. Sensory neuron-associated macrophages as novel modulators of neuropathic pain. **Pain Reports**, v. 6, n. 1, p. e873, 9 mar. 2021.
- SILVA, D. N. et al. Intramyocardial transplantation of cardiac mesenchymal stem cells reduces myocarditis in a model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 4, p. 81, 1 jul. 2014.

- SILVA, D. N. et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Exhibit Enhanced Immunomodulatory Actions Through the Recruitment of Suppressor Cells in Experimental Chagas Disease Cardiomyopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.
- SILVA, G. S. D. A. **POTENCIAL TERAPÊUTICO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS NA NEUROPATIA SENSORIAL DIABÉTICA EM CAMUNDONGOS**. Dissertação (Mestrado em Farmácia)—Salvador: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - Programa de Pós-graduação em Farmácia, 2021.
- SILVA, R. et al. CD206+/MHCII⁻ macrophage accumulation at nerve injury site correlates with attenuation of allodynia in TASTPM mouse model of Alzheimer's disease. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 26, p. 100548, 1 dez. 2022.
- SILVA, R. L. et al. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: Role in peripheral and central sensitization. **Neurobiology of Disease**, v. 105, p. 109–116, set. 2017.
- SINICA, V.; VLACHOVÁ, V. Transient receptor potential ankyrin 1 channel: An evolutionarily tuned thermosensor. **Physiological Research**, v. 70, n. 3, p. 363–381, 12 jul. 2021.
- SINISCALCO, D. Transplantation of human mesenchymal stem cells in the study of neuropathic pain. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 617, p. 337–345, 2010.
- 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**, v. 5, p. 79, 2011.
- SMITH, P. A. Neuropathic pain; what we know and what we should do about it. **Frontiers in Pain Research**, v. 4, p. 1220034, 22 set. 2023.
- SMOLINSKA, V. et al. Stem Cells and Their Derivatives: An Implication for the Regeneration of Nonunion Fractures. **Cell Transplantation**, v. 32, p. 09636897231183530, 18 jul. 2023.
- SMOLINSKÁ, V.; BOHÁČ, M.; DANÍŠOVIČ, Ľ. Current Status of the Applications of Conditioned Media Derived from Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. **Physiological Research**, v. 72, n. Suppl 3, p. S233–S245, 31 out. 2023.
- SOKIC-MILUTINOVIC, A.; MILOSAVLJEVIC, T. IBD: From conventional immunosuppression to biological therapy. **Digestive Diseases (Basel, Switzerland)**, 14 dez. 2023.
- SOMMER, C.; SCHÄFERS, M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. **Brain Research**, v. 784, n. 1–2, p. 154–162, 16 fev. 1998.
- SONG, K. et al. Microneedle-mediated delivery of Ziconotide-loaded liposomes fused with exosomes for analgesia. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 356, p. 448–462, abr. 2023.
- SORGE, R. E. et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1081–1083, ago. 2015.
- SORKIN, L. S. et al. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. **Neuroscience**, v. 81, n. 1, p. 255–262, nov. 1997.
- SPOFFORD, C. M. et al. Evaluation of leukemia inhibitory factor (LIF) in a rat model of postoperative pain. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 7, p. 819–832, jul. 2011.
- STAEHELIN JENSEN, T. The pathogenesis of painful diabetic neuropathy and clinical presentation. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 206 Suppl 1, p. 110753, dez. 2023.

- STOMPÓR, M. et al. Prevalence of Chronic Pain, Particularly with Neuropathic Component, and Its Effect on Overall Functioning of Elderly Patients. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 25, p. 2695–2701, 12 abr. 2019.
- STUBHAUG, A. et al. The costs of chronic pain-Long-term estimates. **European Journal of Pain (London, England)**, 12 jan. 2024.
- SU, P.-Y. P. et al. The Role of Neuro-Immune Interactions in Chronic Pain: Implications for Clinical Practice. **Journal of Pain Research**, v. 15, p. 2223–2248, 2022.
- SUMAN, S. et al. Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1201, p. 1–22, 2019a.
- SUMAN, S. et al. Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine. Em: RATAJCZAK, M. Z. (Ed.). **Stem Cells: Therapeutic Applications**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2019b. p. 1–22.
- SUN, Y. et al. Intrathecal administration of human bone marrow mesenchymal stem cells genetically modified with human proenkephalin gene decrease nociceptive pain in neuropathic rats. **Molecular Pain**, v. 13, p. 1744806917701445, jan. 2017.
- TAKEDA, Y. et al. Nanobiotechnology as an emerging research domain from nanotechnology: A bibliometric approach. **Scientometrics**, v. 80, n. 1, p. 23–38, 20 mar. 2009.
- TAVAKKOLI, S. et al. EL4-derived Exosomes Carry Functional TNF-related Apoptosis-inducing Ligand that are Able to Induce Apoptosis and Necrosis in the Target Cells. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 207–215, 2020.
- TAVARES, I.; COSTA-PEREIRA, J. T.; MARTINS, I. Monoaminergic and Opioidergic Modulation of Brainstem Circuits: New Insights Into the Clinical Challenges of Pain Treatment? **Frontiers in Pain Research**, v. 2, p. 696515, 5 jul. 2021.
- TENG, Y. et al. Intrathecal injection of bone marrow stromal cells attenuates neuropathic pain via inhibition of P2X4R in spinal cord microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 271, 17 dez. 2019.
- THAM, S. et al. Leukemia inhibitory factor enhances the regeneration of transected rat sciatic nerve and the function of reinnervated muscle. **Journal of Neuroscience Research**, v. 47, n. 2, p. 208–215, 15 jan. 1997.
- THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.
- THOMPSON, S. W.; DRAY, A.; URBAN, L. Leukemia inhibitory factor induces mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in the juvenile rat. **Neuroscience**, v. 71, n. 4, p. 1091–1094, abr. 1996.
- TIAN, J. et al. Intrathecal Injection of SIRT1-modified Human Mesenchymal Stem Cells Alleviates Neuropathic Pain in Rat. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n. 5, p. 972–980, 1 maio 2021.
- TIAN, Z. et al. Chapter One - Introduction to stem cells. Em: HIGUCHI, A.; ZHOU, Y.; CHIOU, S.-H. (Eds.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. Stem Cell in Medicine. [s.l.] Academic Press, 2023. v. 199p. 3–32.
- TOGIOKA, B. M. et al. Frequency and Characteristics of Postoperative Neuropathy in Individuals on Gender-Affirming Hormone Therapy Undergoing Gender Affirmation Surgery: A Retrospective Cohort Study. **Cureus**, v. 15, n. 10, p. e47988, out. 2023.

- TOTH, C.; LANDER, J.; WIEBE, S. The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population. **Pain Medicine (Malden, Mass.)**, v. 10, n. 5, p. 918–929, 2009.
- TRAN, H. et al. Descending mechanism by which medial prefrontal cortex endocannabinoid signaling controls the development of neuropathic pain and neuronal activity of dorsal root ganglion. **Pain**, v. 165, n. 1, p. 102–114, 1 jan. 2024.
- TU, H. J. et al. Leukemia inhibitory factor (LIF) potentiates antinociception activity and inhibits tolerance induction of opioids. **British Journal of Anaesthesia**, v. 117, n. 4, p. 512–520, 1 out. 2016.
- VELIKIC, G. et al. Harnessing the Stem Cell Niche in Regenerative Medicine: Innovative Avenue to Combat Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, 2024.
- VERA-PORTOCARRERO, L. P. et al. Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization. **Neuroscience**, v. 140, n. 4, p. 1311–1320, 21 jul. 2006.
- VIDERMAN, D. et al. The Prevalence of Pain in Chronic Diseases: An Umbrella Review of Systematic Reviews. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 23, p. 7302, 25 nov. 2023.
- VILLARREAL-MARTÍNEZ, L. et al. Stem Cell Therapy in the Treatment of Patients With Autism Spectrum Disorder: a Systematic Review and Meta-analysis. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, n. 1, p. 155–164, jan. 2022.
- VIZOSO, F. J. et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1852, 25 ago. 2017.
- VRINTEN, D. H.; HAMERS, F. F. T. “CatWalk” automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. **Pain**, v. 102, n. 1–2, p. 203–209, mar. 2003.
- WALTERS, E. T. Exaptation and Evolutionary Adaptation in Nociceptor Mechanisms Driving Persistent Pain. **Brain, Behavior and Evolution**, 30 nov. 2023.
- WANG, J. et al. Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. **Tissue & Cell**, v. 64, p. 101330, jun. 2020a.
- WANG, J. et al. Leukemia inhibitory factor, a double-edged sword with therapeutic implications in human diseases. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 31, n. 2, p. 331–343, 1 fev. 2023.
- WANG, Q. et al. Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Neuropathic Pain Induced By Peripheral Nerve Injury in Animal Models: A Systematic Review. **Stem Cells and Development**, v. 29, n. 22, p. 1420–1428, 15 nov. 2020b.
- WANG, R. et al. Stem cell therapy for Crohn’s disease: systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 463, 18 ago. 2021.
- WANG, X. et al. Small Extracellular Vesicles Released from miR-211-5p-Overexpressed Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Spinal Cord Injuries in Rats. **eNeuro**, v. 11, n. 2, p. ENEURO.0361-23.2023, fev. 2024.
- WEBER, M. A. et al. Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 85, n. 2, p. 276–284, fev. 2005.
- WEI, H. et al. Reduced mechanical hypersensitivity by inhibition of the amygdala in experimental neuropathy: Sexually dimorphic contribution of spinal neurotransmitter receptors. **Brain Research**, v. 1797, p. 148128, 15 dez. 2022.

- WELSH, J. A. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12404, fev. 2024.
- WEST, S. J. et al. Circuitry and plasticity of the dorsal horn – Toward a better understanding of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 300, p. 254–275, ago. 2015.
- WORTON, R. G.; MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 74, n. 2, p. 171–182, 1969.
- WU, J. et al. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 8, p. 4325–4332, 15 out. 1993.
- WYSE, R. D.; DUNBAR, G. L.; ROSSIGNOL, J. Use of Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells to Treat Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 1719–1745, 23 jan. 2014.
- XIUMEI, G. et al. Clinical effect of acupuncture along fascia, meridians, and nerves combined with ultrasound-guided paravertebral nerve block in the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized parallel-controlled study. **Journal of Traditional Chinese Medicine = Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan**, v. 43, n. 2, p. 359–364, abr. 2023.
- XU, Y. et al. Gait Assessment of Pain and Analgesics: Comparison of the DigiGait™ and CatWalk™ Gait Imaging Systems. **Neuroscience Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 401–418, jun. 2019.
- XU, Z. et al. Pain Relief Dependent on IL-17-CD4+ T Cell-β-Endorphin Axis in Rat Model of Brachial Plexus Root Avulsion After Electroacupuncture Therapy. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 596780, 2020.
- YAMANAKA, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. **Cell Stem Cell**, v. 27, n. 4, p. 523–531, 1 out. 2020.
- YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p. 27066, 1 jan. 2015.
- YANG, G. et al. Immunomodulatory Mechanisms and Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 19, n. 5, p. 1214–1231, 2023.
- YAO, Y. et al. Alendronate Attenuates Spinal Microglial Activation and Neuropathic Pain. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 8, p. 889–903, 1 ago. 2016.
- YATZIV, S.-L.; DEVOR, M. Suppression of neuropathic pain by selective silencing of dorsal root ganglion ectopia using nonblocking concentrations of lidocaine. **Pain**, v. 160, n. 9, p. 2105–2114, set. 2019.
- YEH, J. J.; FERNANDEZ, D. Patent prosecution strategies for biotechnological inventions. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 2, n. 6, p. 697–702, dez. 2004.
- YEROFEYEVA, A. V. et al. The role of cannabinoid CB1 receptors in the antinociceptive and reparative actions of mesenchymal stem cells in rats with peripheral neuropathic pain. **Ibrain**, v. 9, n. 3, p. 245–257, 24 ago. 2023.
- YOU, J.; SHIN, Y. K.; SEOL, G. H. Alleviating effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) and its major components on postherpetic pain: a randomized blinded controlled trial. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 24, n. 1, p. 54, 24 jan. 2024.
- YU, H. et al. Analgesia for neuropathic pain by dorsal root ganglion transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells: initial results. **Molecular Pain**, v. 11, p. 5, 12 fev. 2015.
- YU, S. et al. Tumor-derived LIF promotes chemoresistance via activating tumor-associated macrophages in gastric cancers. **Experimental Cell Research**, v. 406, n. 1, p. 112734, 1 set. 2021.
- YU, X. et al. Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 264, 14 jan. 2020.

- YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, p. 173090, 15 jun. 2020.
- ZAKRZEWSKI, W. et al. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, p. 68, 26 fev. 2019.
- ZARRABI, M. et al. Allogenic mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles in COVID-19 induced ARDS: a randomized controlled trial. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, n. 1, p. 169, 26 jun. 2023.
- ZELENKA, M.; SCHÄFERS, M.; SOMMER, C. Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 257–263, ago. 2005.
- ZHAI, F.-J. et al. Involvement of Opioid Peptides in the Analgesic Effect of Spinal Cord Stimulation in a Rat Model of Neuropathic Pain. **Neuroscience Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 403–416, abr. 2022.
- ZHAI, X. et al. Extracellular vesicles derived from CD73 modified human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate inflammation after spinal cord injury. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, p. 274, 8 set. 2021.
- ZHANG, Q. et al. Brain Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Transfected Bone Mesenchymal Stem Cells for the Repair of Periphery Nerve Injury. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.
- ZHANG, X.-L. et al. Stem Cell-Based Therapy for Experimental Ischemic Stroke: A Preclinical Systematic Review. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 628908, 2021.
- ZHAO, J. et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. **Cardiovascular Research**, v. 115, n. 7, p. 1205–1216, 1 jun. 2019.
- ZHOU, H. et al. MSC based gene delivery methods and strategies improve the therapeutic efficacy of neurological diseases. **Bioactive Materials**, v. 23, p. 409–437, maio 2023.
- ZHOU, Y.-Q. et al. Minocycline as a promising therapeutic strategy for chronic pain. **Pharmacological Research**, v. 134, p. 305–310, ago. 2018.
- ZHU, X. et al. Somatosensory cortex and central amygdala regulate neuropathic pain-mediated peripheral immune response via vagal projections to the spleen. **Nature Neuroscience**, 30 jan. 2024.
- ZIS, P. et al. Prevalence and Determinants of Chronic Pain Post-COVID; Cross-Sectional Study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 19, p. 5569, 22 set. 2022.

3. CAPÍTULO 3

Mapeamento patentário de produtos terapêuticos livres de células derivadas de células-tronco mesenquimais

3.1. INTRODUÇÃO

Células-tronco mesenquimais têm sido um componente central em terapias regenerativas. Várias aplicações já foram descritas para uma ampla gama de condições (GUADIX; ZUGAZA; GÁLVEZ-MARTÍN, 2017). As células-tronco mesenquimais são células progenitoras não especializadas identificadas em todos os tecidos do organismo animal, que desempenham um papel importante na renovação fisiológica. Possuem significativo potencial de auto-replicação e diferenciação em linhagens celulares especializadas, adaptando sua morfologia e funcionalidade às células teciduais a serem tratadas (ANCANS, 2012; SANTOS; WINCK; BRAGA, 2019). O primeiro relato do uso do transplante de células ocorreu em 1950, quando o transplante de medula óssea ou de células-tronco hematopoéticas foi estabelecido. Desde então, um caminho promissor para a aplicação das células mesenquimais em terapias regenerativas foi se desdobrando para diversas doenças, como problemas neurológicos e cardíacos, lesão medular, entre outras (DAS et al., 2019; LIAU et al., 2020; POOMANI et al., 2022). De fato, a terapia com células mesenquimais para reparação de tecidos lesados têm demonstrado resultados promissores em tanto roedores como em humanos (LEE et al., 2017). Quando submetidas a uma manipulação extensiva e/ou utilizadas para outros fins que não a sua função fisiológica, as células-tronco mesenquimais são classificadas como produtos de terapia celular avançada pelas agências reguladoras e podem ser aplicadas como uma terapia de células somáticas ou em produtos de engenharia de tecidos (ANCANS, 2012; GOLCHIN; SHAMS; KARAMI, 2020).

Diversas evidências têm demonstrado que as células mesenquimais podem exercer seus efeitos tanto diferenciando-se em vários tipos de tecidos como liberando fatores que melhoram a regeneração tecidual (SPEES; LEE; GREGORY, 2016). Essa ação parácrina levou a estudos sobre os elementos derivados das células mesenquimais, que poderiam ser responsáveis/reter as propriedades terapêuticas destas células. De fato, vários estudos em diferentes modelos têm demonstrado a atividade de elementos derivados das células mesenquimais, como o meio condicionado (BOGATCHEVA; COLEMAN, 2019), secretoma (VIZOSO et al., 2017),

vesículas extracelulares (KESHTKAR; AZARPIRA; GHAHREMANI, 2018) e lisado celular (HSU et al., 2018; MALIK; MALIK, [s.d.]; NISHIKAWA et al., 2021).

O secretoma de uma célula refere-se a todos os fatores solúveis secretados pela célula, além de exossomos e microvesículas, ou seja, vesículas extracelulares (DEFTU et al., 2020). Um número significativo de estudos adota o meio condicionado para representar o secretoma (HE et al., 2022). Assim, quando as células estão em cultura, o secretoma pode ser recuperado do meio condicionado, que representa uma mistura de um dado meio de cultura celular com uma miríade de fatores secretados pelas células, como fatores de crescimento e citocinas, enzimas, ácidos nucléicos, lipídios bioativos e vesículas extracelulares (CARLOMAGNO et al., 2021). As vesículas extracelulares são vesículas ligadas à membrana secretadas pelas células, que podem ser diferenciadas com base em sua biogênese, vias de liberação, tamanho, conteúdo e função (DOYLE; WANG, 2019). Exossomos são um subtipo de vesículas extracelulares, com tamanho entre 30 e 150 nm de diâmetro e formadas por uma via endossômica. As microvesículas são formado pelo brotamento direto da membrana plasmática e variam de 100 nm até 1 µm (DOYLE; WANG, 2019). Tanto as microvesículas quanto os exossomos são carregados com uma carga biológica heterogênea, incluindo proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e glicoconjugados, e podem desempenhar um papel na comunicação intercelular tanto nos processos patológicos quanto na manutenção da homeostase e regulação das funções fisiológicas (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

Embora a terapia com células mesenquimais seja um ramo da medicina em rápido desenvolvimento, a terapia com seus derivados, chamada de terapia livre de células ou terapia cell-free, pode evoluir para um tipo ainda mais inovador de terapia regenerativa que provavelmente superará a terapia com células-tronco. As terapias com células-tronco mesenquimais e a terapia livre de células visam preencher uma lacuna terapêutica para doenças que não têm um tratamento eficaz ou para pacientes que não respondem às terapias convencionais. Vale ressaltar que o processo de fabricação e entrega de células-tronco mesenquimais ao paciente é complexo devido à própria natureza e responsabilidade do produto. Por outro lado, a terapia livre de células pode alcançar um efeito semelhante ao das células mesenquimais e supera problemas logísticos frequentes, pois podem ser fabricadas como produtos prontos para uso. Assim, essas novas terapias poderiam ser prontamente absorvidas pelo sistema de saúde.

As patentes podem ser consideradas uma medida das atividades de pesquisa e desenvolvimento e inovação e podem ser utilizadas para verificar o estado da arte e da técnica das tecnologias, estimar indiretamente o mercado atual e vislumbrar tendências futuras e linhas

de pesquisa emergentes. (MARCATO; NORONHA, 2013; TAKEDA et al., 2009). O processo de mapeamento de patentes é um processo multiestágio que estuda e analisa patentes existentes e documentos não patenteados para obter dados analíticos que ajudarão institutos de ensino/pesquisa e partes interessadas a impulsionar seus esforços em inovação tecnológica. Durante esse processo, é realizado o levantamento e a avaliação de patentes de uma determinada área do conhecimento, por meio de buscas em bases de dados. Além disso, técnicas e ferramentas de tratamento e análise de dados são utilizadas para recuperar informações estratégicas identificadas no estudo (AHARONSON; SCHILLING, 2016; SANTOS; ROCHA, 2021). Desta forma, a realização de um mapeamento de patentes de produtos terapêuticos livres de células derivados de células mesenquimais (PTLC-CTM) é uma etapa importante para verificar e entender o panorama tecnológico relacionado a estas tecnologias. Assim, será possível identificar a evolução temporal dos depósitos de patentes, organizações responsáveis pelo desenvolvimento de tecnologia, locais de proteção e aplicações tecnológicas de patentes encontradas para preencher a lacuna na literatura relacionada a esse assunto.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho é uma pesquisa quali-quantitativa, descritiva e exploratória, com o objetivo de identificar informações qualificadas contidas em documentos de patentes relacionadas a produtos terapêuticos derivados de células-tronco mesenquimais. A base de dados Derwent World Patents Index™ (DWPI) foi utilizada para recuperar informações sobre as famílias de patentes. O DWPI foi usado devido ao grande banco de dados que compreende pelo menos 150 autoridades de patentes, contendo 106 milhões de documentos de texto completo e 131 milhões de arquivos contendo informações bibliográficas (Clarivate Analytics, 2021).

Foram realizadas três estratégias de busca: a primeira visando à recuperação de patentes relacionadas às células-tronco mesenquimais. A segunda consulta foi direcionada à recuperação de patentes relacionadas a produtos terapêuticos, produtos livres de células, produtos avançados de terapia celular, uso medicinal ou tratamento. Além disso, outros termos relacionados aos subprodutos das células-tronco mesenquimais foram utilizados para construir a estratégia três.

As palavras-chave utilizadas nas estratégias de busca foram extraídas da literatura científica relacionada ao tema, além da consulta à base de dados Medical Subject Headings (Mesh), o dicionário científico desenvolvido pela National Library of Medicine para identificação e seleção de descritores relacionados às células-tronco (estratégia 1). As palavras-chave foram complementadas com a adição de códigos internacionais de patentes (Cooperative

Patent Classification e International Patent Classification) relacionados às células-tronco mesenquimais, além do Código Manual DWPI relacionado aos fatores de crescimento. Posteriormente, foi realizada a combinação de estratégias de busca individuais (1, 2 e 3), conforme descrito a seguir, a fim de obter patentes relacionadas ao objeto, utilizando a função DWPI "Combine".

(i) (("Células-tronco mesenquimais*" OU "células-tronco estromais*" OU "célula estromal multipotente*") OU CPC E IPC (C12N5/0668 OU C12N5/0663 OU C12N5/0628 OU C12N 5/077 OU C12N5/0775))

AND

(ii) ("Produto Terapêutico*" OU "Livre de células" OU "Produto de Terapia Celular Avançada" OU "uso medicinal*" OU "tratamento*")

AND

(iii) ("Vesícula extracelular*" OU "Exossomo*" OU "Microvesícula*" OU "Secretoma*" OU "Secretoma celular" OU "Fração Solúvel*" OU "Meio Condicionado" OU "Meio condicionado" OU "Fator de Crescimento*" OU "Sobrenadante de Cultura" OU B04-H06)

As buscas foram realizadas em 26 de janeiro de 2023, tendo sido recuperadas um total de 1156 famílias de patentes e 6529 patentes individuais. Optou-se por utilizar dados relacionados ao número de famílias de patentes, uma vez que as tecnologias são organizadas em grupos que visam proteger a mesma invenção. Em seguida, as famílias de patentes recuperadas foram analisadas por meio da leitura dos títulos, resumos e campos de reivindicações das patentes para estabelecer a relevância e categorização das invenções, com foco no potencial uso terapêutico de produtos terapêuticos derivados de células-tronco mesenquimais. Foram excluídas as patentes que utilizaram células mesenquimais de outras fontes que não humanos, que utilizaram uma combinação de terapia celular e livre de células, e duplicatas. Após análise criteriosa dos documentos e tratamento do banco de dados, foram selecionadas 150 famílias de patentes relacionadas ao escopo do estudo. Para classificação das patentes por tipo de produto terapêutico, a terminologia escolhida pelos inventores e indicada nas patentes foi utilizada como critério de classificação. As Figuras 1, 3 e 4 foram criadas utilizando a plataforma Visme (<https://www.visme.co/pt-br/>). As Figuras 2, 5 e 6 foram geradas utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Evolução temporal das patentes de PTLC-CTM

As patentes podem ser usadas como uma medida da atividade de inovação. Essa funcionalidade tem sido cada vez mais empregada à medida que bancos de dados globais de patentes se tornaram amplamente disponíveis e podem medir indiretamente o resultado do processo de P&D (DECHEZLEPRÊTRE; MÉNIÈRE; MOHNEN, 2017). A avaliação de informações de patentes auxilia na compreensão do progresso do avanço tecnológico, contribuindo para a gestão estratégica, minimizando riscos e incertezas, além de contribuir para a identificação de tendências e novas perspectivas de pesquisa e investimento, antecipação de cenários, visualização de áreas tecnológicas promissoras e análise de inovações não disponíveis no mercado (SANTOS; ROCHA, 2021). Além disso, as informações sobre patentes podem ser usadas para monitoramento de concorrentes, avaliação de tecnologia, gerenciamento de portfólio de P&D, identificação e avaliação de fontes potenciais de geração externa de conhecimento tecnológico (ERNST, 2003; SANTOS; PINTO; ROCHA, 2021).

A busca por produtos terapêuticos livres de células derivadas de células-tronco mesenquimais na plataforma DWPI recuperou 150 famílias de patentes, que se referem ao conjunto de patentes/pedidos de patente que cobrem a mesma invenção em diferentes países. A evolução temporal desses documentos tecnológicos abrangeu o ano de publicação das 150 famílias de patentes relacionadas a produtos terapêuticos derivados das células mesenquimais (Figura 1). Um ligeiro aumento na publicação de patentes foi observado entre 2006 e 2018, período em que apenas 20 documentos foram publicados. Por outro lado, houve um aumento exponencial no número de tecnologias depositadas a partir de 2019. Entre 2019 e 2023, foram publicadas 130 patentes, representando aproximadamente 87% dos ativos publicados ao longo do percurso histórico (2006-2023). Além disso, 18 das 150 patentes estão mortas, de acordo com o status Dead/Alive do DWPI, o que significa que elas não são mais válidas.

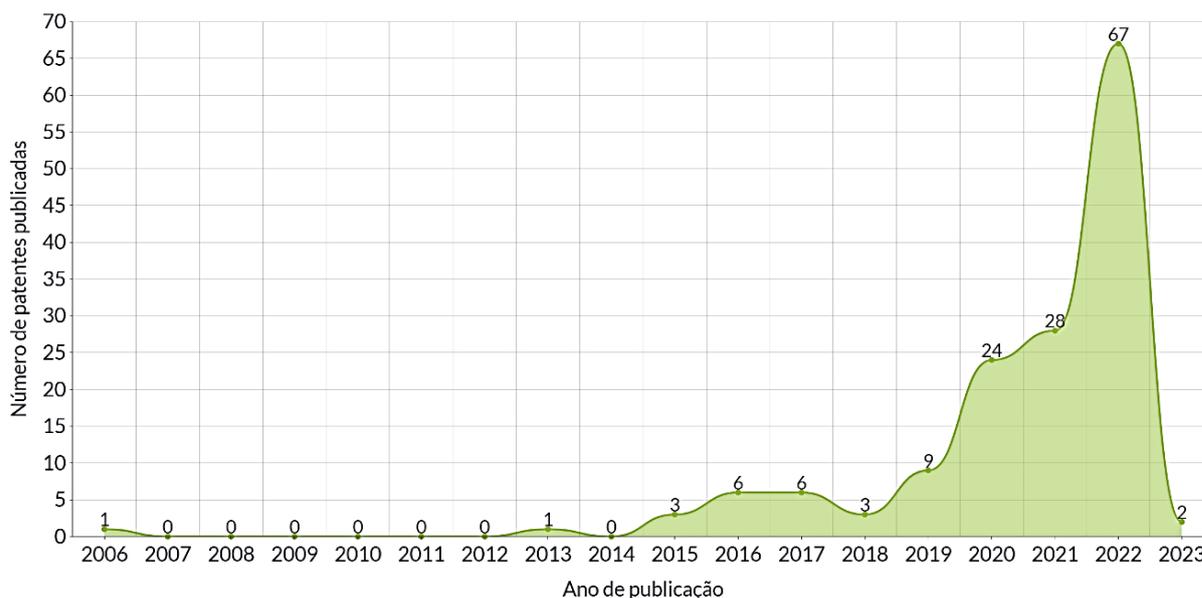


Figura 1 – Evolução temporal (2006–2023) das patentes publicadas relacionadas a produtos terapêuticos derivados de MSC identificados no DPWI. A linha verde e os pontos representam o número de patentes. O eixo y mostra o número de patentes depositadas, e o eixo x mostra os anos em que as patentes foram publicadas.

Diferentes tipos de PTLC-CTM foram patenteados ao longo dos anos. A Figura 2A mostra a série histórica de famílias de patentes categorizadas por grupos de produtos terapêuticos derivados das células mesenquimais, os quais foram classificados pela terminologia utilizada nas patentes. Os PTLC-CTM mais frequentes encontrados na série histórica de patentes foram os exossomos e o meio condicionado, totalizando 83 e 29 depósitos, respectivamente (Figura 2B). Aproximadamente 87% das solicitações relacionadas a exossomos foram publicadas entre os anos de 2019 e 2022, seguindo a tendência de evolução geral observada na Figura 1. Por outro lado, a evolução dos pedidos relacionados ao meio condicionado é mais constante e apresentou uma média de aproximadamente três patentes por ano. Além disso, o meio condicionado figura entre as primeiras patentes que protegem os PTLC-CTM.

À medida que surgiu a hipótese de ação parácrina das células mesenquimais, os primeiros trabalhos utilizaram meio condicionado para avaliar se os fatores secretados por estas células participavam do seu efeito terapêutico (BAFFOUR et al., 2006; GNECCHI et al., 2006; KINNAIRD et al., 2004; OHNISHI et al., 2007). Ao longo do tempo, essa hipótese foi apoiada por evidências que mostram que o secretoma das células mesenquimais, que engloba fatores solúveis e vesículas extracelulares, induzem efeito semelhante ao do transplante das células-tronco (EVANGELISTA; SOARES; VILLARREAL, 2019). Isso poderia explicar porque as

patentes relacionadas ao meio condicionado são o único tipo de PTLC-CTM encontrado em todo o período, como mostram as barras laranjas na Figura 2A. Em relação aos demais produtos derivados de células mesenquimais, observou-se um número muito menor de pedidos de patente quando comparados aos exossomos e ao meio condicionado. No entanto, o número de patentes relacionadas a vesículas extracelulares também aumentou significativamente a partir de 2020.

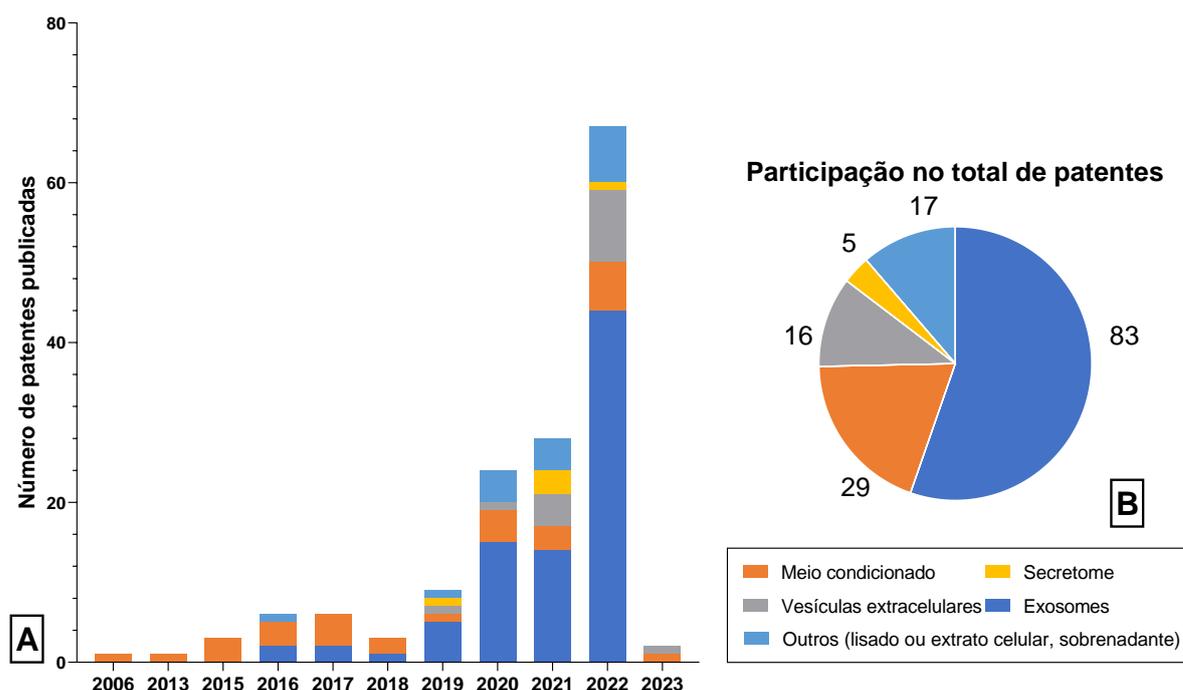


Figura 2 – Tendências de publicação de patentes (A) e participação total (B) dos diferentes tipos de PTLC-CTM. (A) As barras mostram o número de patentes depositadas (eixo y) no decurso temporal entre 2006-2023 (eixo x). (B) O gráfico de pizza mostra o número e a contribuição dos diferentes tipos de produtos terapêuticos derivados de CTM para a quantidade total de patentes publicadas.

A participação no total de patentes também pode ser encontrada na Figura 2B, que mostra os principais PTLC-CTM usados no desenvolvimento de invenções. As tecnologias mais frequentes foram os exossomos, presentes em pelo menos 83 famílias, seguidos por meio condicionado (29), vesículas extracelulares (16) e secretoma (5). Outras categorias, como fatores de crescimento, lisado celular, extrato celular, fatores celulares e sobrenadante foram agrupadas em "outros" e incluem 17 documentos. Os resultados mostram uma alta diversidade no número de áreas tecnológicas e apontam para uma predominância de patentes relacionadas a exossomos. No entanto, como a denominação "vesículas extracelulares" refere-se a vesículas secretadas fechadas por membrana – que incluem subgrupos como exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos –, os exossomos também são considerados um tipo de vesícula

extracelular. Assim, quando contabilizados em conjunto, exossomos e vesículas extracelulares correspondem a 66% do total de patentes depositadas ao longo dos anos.

Como mencionado anteriormente, o conceito de usar derivados liberados ou "partes de" células mesenquimais não é novo. No entanto, não foi até meados da década de 2010 que os pedidos de patentes protegendo produtos MSCs livres de células começaram a aumentar. Tecnologias livres de células que inicialmente se concentravam em meio condicionado rapidamente mudaram seu foco para vesículas extracelulares e exossomos. De fato, a partir da década de 2010, a comunidade científica direcionou atenção especial para vesículas extracelulares e exossomos (GATTI et al., 2011; LAI et al., 2010; LI et al., 2013), quando houve um rápido crescimento de estudos focados no entendimento das vesículas extracelulares e suas possíveis aplicações.

Em comparação com outros PTLC-CTM, vesículas extracelulares e exossomos são um produto muito mais versátil, pois podem transportar naturalmente compostos biologicamente ativos e ser modificados para servir a um propósito específico. Além disso, tem sido proposto que o efeito biológico das vesículas extracelulares é superior ao do meio condicionado (HE et al., 2022). Essas características, e o crescente interesse científico em vesículas extracelulares, poderiam explicar o aumento exponencial de patentes protegendo vesículas extracelulares, especialmente exossomos, a partir de meados da década de 2010. O primeiro artigo a oferecer diretrizes e padrões para estudar e relatar estudos científicos foi lançado em 2014 pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (LÖTVALL et al., 2014) e depois atualizado em 2018 (THÉRY et al., 2018). A partir de 2014, a pesquisa de vesículas extracelulares tornou-se uma área de crescimento muito rápido na biologia, medicina e também de patenteamento. Embora uma parcela significativa dos patenteamentos ainda esteja direcionada ao meio condicionado, tornou-se claro que a pesquisa, desenvolvimento e inovação de PTLC-CTM está tendendo para o desenvolvimento de novos produtos usando vesículas extracelulares ou exossomos, que podem ser aplicados a uma variedade de condições.

3.3.2. A aplicabilidade das tecnologias baseadas em PTLC-CTM é ampla

A faixa de aplicabilidade das novas tecnologias livres de células pode ser estimada pela análise das reivindicações de patente. Mais de 20 aplicações em diversas condições foram reivindicadas. É importante notar que uma única patente pode reivindicar, e geralmente reivindica, mais de uma aplicabilidade mesmo que não seja totalmente apoiada por evidências. Entre as 150 famílias, alguns dos efeitos terapêuticos dos PTLC-CTM incluem atividade anti-inflamatória, com 43 alegações; aplicações dermatológicas (40) e cosméticas (21); atividades

neurológica (20) e imunossupressora/imunomoduladora (31); tratamento de doenças que afetam ossos e articulações (18), trato respiratório (10) e gastrointestinal (10) e efeito analgésico (4). Em consonância com esses efeitos terapêuticos reivindicados, a gama de aplicação dessas tecnologias é extensa e inclui o tratamento de pré-eclâmpsia (CA2859768C), cicatrizes ou danos à córnea ou úlceras neurotróficas da córnea (US20210000858A1), promoção de angiogênese e tratamento de doenças de pele (CN110917215B), tratamentos de doenças imunoinflamatórias (KR2020000415A) e alopecia (CN111840330B). É importante destacar que outras tecnologias não incluídas nesta tabela também poderão ser absorvidas pelos consumidores nos próximos anos devido ao potencial de mercado e às estratégias de inovação a serem adotadas pelas instituições detentoras das patentes, permitindo a utilização desses ativos no desenvolvimento de novos produtos terapêuticos.

As patentes recuperadas também mostram a combinação de tecnologias, onde o produto livre de células não é o único ingrediente ativo, mas sim combinado com diferentes tecnologias para produzir uma formulação. A patente CN115040635A, por exemplo, busca proteger uma bioformulação composta por exossomos de células mesenquimais combinados com ficocianina, extrato de madressilva, alginato de sódio e soro fisiológico para o tratamento da artrite reumatoide. Exossomos também têm sido utilizados como um dos ingredientes de uma tinta biológica para construção de um arcabouço biológico biônico 3D (CN113398332B). Outros exemplos são a patente WO2022249180A1, que descreve uma composição composta por uma vesícula extracelular associada a um agente ativo e um polímero, e a patente CN115192627A, descrevendo um biogel cicatrizante preparado com *Radix astragali*, exossomos e gel glucano.

As patentes também incluem PTLC-CTM oriundos de células mesenquimais pré-condicionadas/pré-tratadas, que poderiam otimizar o processo de produção ou melhorar a função biológica desses derivados. Exemplos de pré-tratamento incluem incubar as células com moléculas, agentes químicos (FU et al., 2021) e em condições de hipóxia (CHENG et al., 2020; QIU et al., 2020). A patente CN107217034A, por exemplo, descreve a adição de interferon, eritropoetina e fator de crescimento derivado de plaquetas ao meio de cultura durante o processo de cultivo, enquanto WO2022169049A1 descreve o pré-tratamento de células-tronco com TNF- α e IFN- γ .

Os PTLC-CTM têm sido classicamente entendidos como um ingrediente ativo, pois podem transportar uma carga de miRNA, mRNA e proteínas originárias das células mesenquimais para as células-alvo (KESHTKAR; AZARPIRA; GHAREMANI, 2018). Essa mesma característica tem levado a novos estudos com vesículas extracelulares e exossomos e tem mudado esse paradigma. Nesse sentido, vesículas extracelulares e exossomos têm sido

considerados como a próxima geração de sistemas de entrega de medicamentos (HERRMANN; WOOD; FUHRMANN, 2021). Eles podem ser usados para transportar cargas de células geneticamente modificadas ou podem ser pós-modificados (carregados com medicamentos, ou ter sua superfície modificada) para transportar cargas específicas. A inserção de fármacos em vesículas extracelulares tem sido proposta como uma forma de otimizar a estabilidade in vivo, a circulação sanguínea dos fármacos e eficiência de direcionamento celular de produtos farmacêuticos e biofarmacêuticos (LIANG et al., 2021). Esse conceito foi aplicado, por exemplo, na patente WO2022250268A1, que utiliza vesículas extracelulares transformadas com um vetor de expressão recombinante para tratar o câncer gástrico, enquanto CN115350282A usa exossomos como carreadores para a adriamicina no tratamento do câncer de fígado. A patente CN115252647A também faz uso de exossomos como um sistema de liberação para minoxidil no tratamento da alopecia, e CN114712396A usa vesículas extracelulares carregadas com rapamicina para o tratamento de uveíte autoimune. As formas farmacêuticas que incluem PTLC-CTM também são variadas e englobam um hidrogel com exossomos para o tratamento de adesão intrauterina (CN114712302A), um aerossol para reparação da pele pós-queimadura solar (CN113616587B), um arcabouço biológico biônico 3D contendo exossomos (CN113398332B), uma máscara facial (CN113648273B) ou mesmo injeções (CN114832015A).

A Tabela 1 resume as patentes citadas acima e inclui seus títulos e descrições. Esse portfólio apresenta uma diversidade de tecnologias que tendem a ser absorvidas pela indústria farmacêutica ou de biotecnologia nos próximos anos.

Tabela 1 – Exemplos de patentes com diferentes aplicações e nas quais os PTLC-CTM são utilizados como sistemas de entrega.

Número de publicação / Ano	Título	Descrição
CN115040635A 2022	<i>Biological preparation for treating rheumatoid arthritis and preparation method thereof</i>	A bioformulação é preparada usando exossomos de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano, ficocianina, extrato de madressilva, alginato de sódio e soro fisiológico.
CN113398332B 2022	<i>A 3 D bionic biological scaffold containing stem cell external secretion body and application thereof</i>	O arcabouço utilizado para promover a cicatrização da cartilagem articular e do osso inferior da articulação, compreende: a primeira tinta biológica composta pelo material principal do corpo, matriz livre de células cartilaginosas e exossomo, e a segunda tinta biológica composta pela matriz celular óssea

WO2022249180A1 2022	<i>Compositions comprising extracellular vesicles and an active agent and uses thereof</i>	Composição útil para introduzir agente ativo na célula e tratar condição tratável por agente ativo compreendendo vesícula extracelular associada a agente ativo e polímero, onde o polímero carrega carga positiva
CA2859768C 2021	<i>A conditioned medium obtained from placental mesenchymal stem cells and use thereof for the therapeutic treatment of pre-eclampsia</i>	O meio condicionado obtido a partir de células-tronco mesenquimais placentárias, para o tratamento da pré-eclâmpsia, compreende fatores secretados por células, como interleucina (IL)-6, IL-10 e proteína quimiotática de monócitos 1
US20210000858A1 2021	<i>Stem cell-derived exosomes for the treatment of corneal scarring</i>	Fazer composição farmacêutica para tratar cicatrizes corneanas ou danos na córnea, ou úlceras neurotróficas da córnea, combinando em formulação aquosa, polinucleotídeos específicos e excipiente farmacêutico, por exemplo, conservante.
CN115192627A 2022	<i>A preparation method for accelerating deep skin seated repairing and anti-scar biological gel</i>	Acelerando a reparação profunda da pele e preparação de biogel anti-cicatriz envolve a preparação radix astragali sobrenadante, preparação de exossomos, preparação de gel glucano.
CN110917215B 2021	<i>Complex, tissue repairing material and preparation method and application thereof</i>	Complexo usado como composição para promover angiogênese e tratar doenças de pele, é formado pela combinação de um grupo-alvo e uma vesícula medicinal, o grupo-alvo é selecionado a partir de um aptâmero, e a vesícula medicinal é um exossomo
CN115350282A 2022	<i>Drug-carrying external secretion body for targeting liver cancer, fast preparation method and application thereof</i>	O exossomo carregado de Dug visando o câncer de fígado é obtido após o tratamento dos exossomos carregados com neuraminidase.
WO2022250268A1 2021	<i>Gastric cancer-specific targeting exosome composition, as drug carrier, and use thereof</i>	Composição utilizada para prevenção ou tratamento do câncer gástrico, compreende vesículas extracelulares transformadas com vetor de expressão recombinante.
KR2020000415A 2020	<i>Mesenchymal stem cell culture media for preventing or treating immune disease or inflammatory disease and a method for preparing the same</i>	Produzir líquido de cultura de células-tronco mesenquimais para tratamento de doenças imunes ou inflamatórias, por meio da coleta de células-tronco mesenquimais e cultivo em meio livre de soro com arcabouço biocompatível, e coleta de líquido de cultura
CN111840330B 2020	<i>A composition for preventing alopecia and application thereof.</i>	A composição anti-reparo da perda de cabelo, útil no preparo de medicamentos para o tratamento da alopecia, compreende células progenitoras do folículo piloso, fator de células-tronco mesenquimais, lisado de células-tronco mesenquimais e fibrina rica em plaquetas
CN115252647A 2022	<i>Composite external preparation for promoting hair growth and preparation and application thereof</i>	Preparação externa de composto carregado de minoxidil usado para preparar medicamentos para o tratamento da alopecia, de preferência alopecia androgenética, eflúvio telógeno, alopecia areata.

CN114712396A 2022	<i>Application of mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles loaded with rapamycin in autoimmune uveitis</i>	Uso de pequenas vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais carregadas com rapamicina como e/ou preparação de droga para tratamento de uveíte autoimune
CN114712302A 2022	<i>Exosome hydrogel and application</i>	Preparação de hidrogel de exossomo para preparação de preparação de compósitos para o tratamento de adesão intrauterina.
CN113616587B 2022	<i>Aerosol for repairing after sunning and skin method thereof</i>	Aerossol útil para, por exemplo, reparação da pele pós-queimadura solar, tratamento da reação inflamatória e danos celulares causados pelos raios UV, eliminação de radicais livres e promoção do metabolismo do tecido cutâneo.
CN113648273B 2022	<i>A soothing facial mask good for face skin repairing postoperative recovery and preparation method thereof</i>	Máscara facial calmante útil para a recuperação após o reparo da pele facial, inclui fragrância de máscara facial, incluindo exossomos de células-tronco adiposas, nanolipossomas carregados com drogas, seiva de bétula, alantoína, hidroxietil celulose, glicerina e água deionizada, e material base de máscara facial
CN114832015A 2022	<i>Face repair injection based on PRP and stem cell external secretion body and preparation method thereof</i>	A injeção reparadora facial útil para o anti-envelhecimento, reparação e tratamento de doenças da pele, compreende plasma rico em plaquetas, exossomos de células-tronco e soro fisiológico
CN107217034A 2017	<i>A human umbilical mesenchymal stem cell source external secretion body, obtaining method and application thereof</i>	Novo exossomo derivado de células-tronco mesenquimais (CTM) do cordão umbilical humano, útil para o preparo de cosméticos, possui estrutura bicamada fosfolipídica e é composto por RNAm, DNA e ácido nucleico
WO2022169049A1 2022	<i>Method for obtaining mesenchymal stem cell-derived exosome</i>	A produção de exossomos, útil na composição de medicamentos para prevenção e tratamento de doenças inflamatórias, compreende o pré-tratamento de células-tronco com fator de necrose tumoral alfa e interferon-gama

Embora as patentes recuperadas protejam uma infinidade de condições, elas não esgotam as possibilidades de aplicações de PTLC-CTM, já que produtos livres de células mesenquimais podem em teoria exercer os mesmos efeitos terapêuticos atribuídos às células mesenquimais, o que ainda não foi totalmente explorado nas patentes recuperadas. Além disso, há uma enorme possibilidade de combinações de pré-tratamentos das células mesenquimais, terapias gênicas, composições de ingredientes e formas farmacêuticas que possam gerar produtos potenciais completamente novos, e portanto, novas patentes. Conseqüentemente, acredita-se que o número de depósitos de patentes protegendo PTLC-CTM tende a aumentar.

3.3.3. Mercado de produtos terapêuticos livres de células derivadas de células-tronco mesenquimais

A decisão de requerer a proteção de patentes num determinado país pode mostrar o objetivo de entrar em um mercado local para vender um novo produto ou usar uma nova tecnologia (DECHEZLEPRÊTRE; MÉNIÈRE; MOHNEN, 2017). Assim, a distribuição geográfica poderia indicar os locais onde os depositantes (empresas ou universidades) acreditam que existem possíveis concorrentes ou um potencial mercado consumidor para a aquisição de ativos de propriedade intelectual (SANTOS; PINTO; ROCHA, 2021). A Figura 3 apresenta os países e escritórios internacionais que receberam os primeiros pedidos das famílias de patentes para a proteção dos PTLC-CTM. A China (CN) foi o país que mais recebeu pedidos de proteção, com um total de 97 famílias de patentes, seguida pelos Estados Unidos (EUA; 16), o Instituto Europeu de Patentes (EPO, 11), a Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO; 8), República da Coreia (KR; 5), Japão (JP; 4), Brasil (BR; 3), Canadá (CA; 1), Índia (IN; 1), Israel (IL; 1), Hong Kong (HK; 1), Rússia (RU; 1) e Espanha (ES; 1).

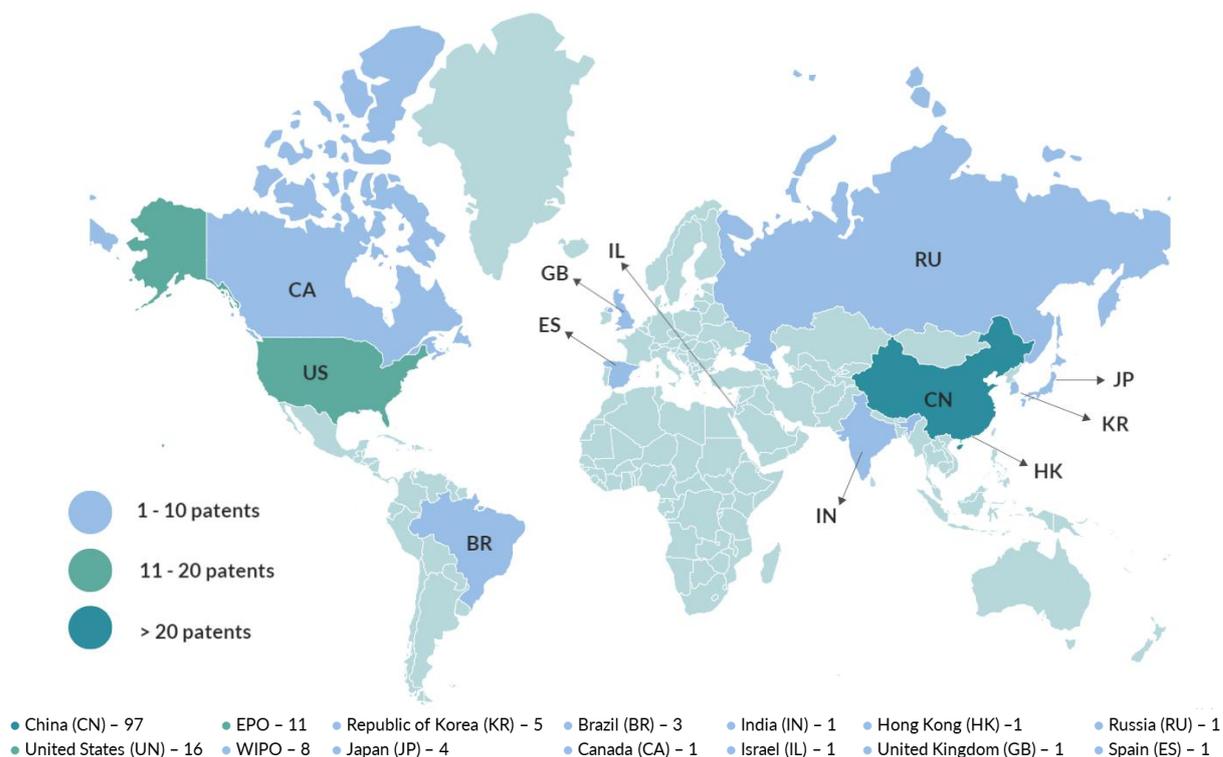


Figura 3 – Distribuição geográfica dos principais países e organizações de propriedade intelectual onde foram publicadas patentes que protegem produtos terapêuticos livres de células derivadas de células-tronco mesenquimais.

De fato, 64,7% de todas as patentes depositadas foram inicialmente protegidas na China. A proteção de PTLC-CTM supera em muito até mesmo os Estados Unidos, o segundo país em

número de tecnologias protegidas (Figura 4). A Figura 4 também mostra que, desde 2018, a taxa de crescimento da proteção de patentes seguiu a tendência da China. Esses dados podem indicar que a China tem sido vista como um grande mercado de medicamentos de terapias avançadas e, portanto, as organizações optaram por garantir a propriedade intelectual neste país; ou que ela está liderando a pesquisa nesse campo, já que os inventores também tendem a proteger as invenções em seu país de origem antes de aplicar em outro lugar.

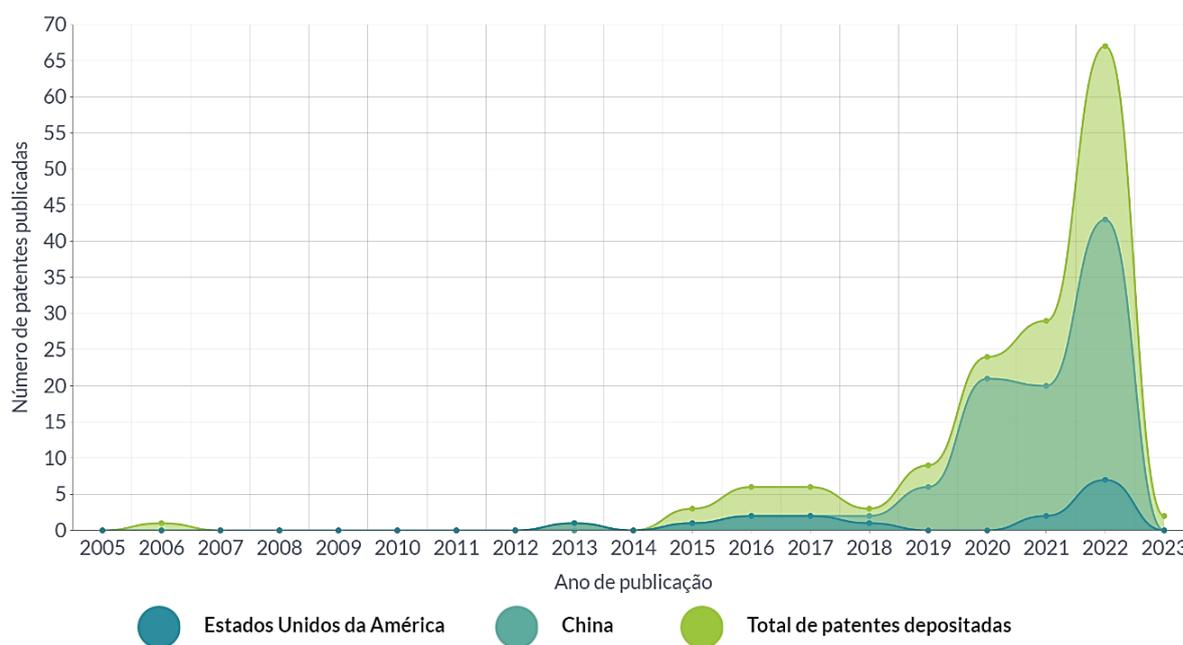


Figura 4 – Comparação das tendências de proteção de produtos livres de células derivadas do MSC entre os dois principais países em número de patentes. O eixo y apresenta o número de patentes depositadas, e o eixo x apresenta os anos em que as patentes foram publicadas.

O tamanho das famílias de patentes – ou seja, o número de países onde uma mesma família foi depositada – tem sido utilizado como uma medida da difusão internacional de tecnologias, portanto, também pode ser usado como uma medida do tamanho do mercado da invenção (DECHEZLEPRÊTRE; MÉNIÈRE; MOHNEN, 2017; EATON; KORTUM, 1999). Foi relatado que o número de patentes depositadas na China que são levadas para escritórios de patentes estrangeiros é extremamente baixo em comparação com outros países. Mais de 70% das patentes chinesas são singletons, ou seja, "patentes que não são seguidas nem por continuções nem por aplicações estrangeiras" (DECHEZLEPRÊTRE; MÉNIÈRE; MOHNEN, 2017). Por outro lado, mais de 20% das patentes registradas na China têm prioridade estrangeira, o que poderia implicar interesse em entrar no mercado chinês. Os dados recuperados no presente estudo evidenciaram o mesmo padrão para os PTLC-CTM: todas as

famílias de patentes depositadas na China são singletons, assim como as demais patentes depositadas em outros países.

A análise dos principais detentores de patentes e onde eles buscaram proteger seus ativos intelectuais pode ser observada na Figura 5. Os principais detentores de patentes são o inventor chinês Yang, Zi-Jiang e Shenzhen Beike Biological Technology, ambos com três patentes protegidas na China; Samsung Life Public Welfare Foundation, com três patentes depositadas no Japão, nos Estados Unidos e EPO, e a Agency for Science Technology and Research, com sede em Singapura, com duas patentes depositadas nos Estados Unidos da América (EUA) e uma na China. Mais quinze inventores/empresas detêm duas patentes cada, e as outras 131 patentes são detidas por empresas totalmente diferentes, o que significa que há uma grande diversidade de organizações com foco em terapias livres de células. A Figura 5 também mostra que todos os principais detentores de patentes baseados na China optaram por proteger seus ativos na China. Por outro lado, com exceção da Xon Cells Inc (uma empresa com sede nos EUA que solicitou proteção em seu país de origem), os principais detentores geralmente solicitaram proteção em outros países ou organizações internacionais. A Corion Biotech, por exemplo, é uma empresa com sede na Itália que solicitou patenteamento no Canadá e na China. Em contraste, a T-Helper Cell Technologies, uma empresa russa, protegeu seus ativos nos EUA e em Israel.

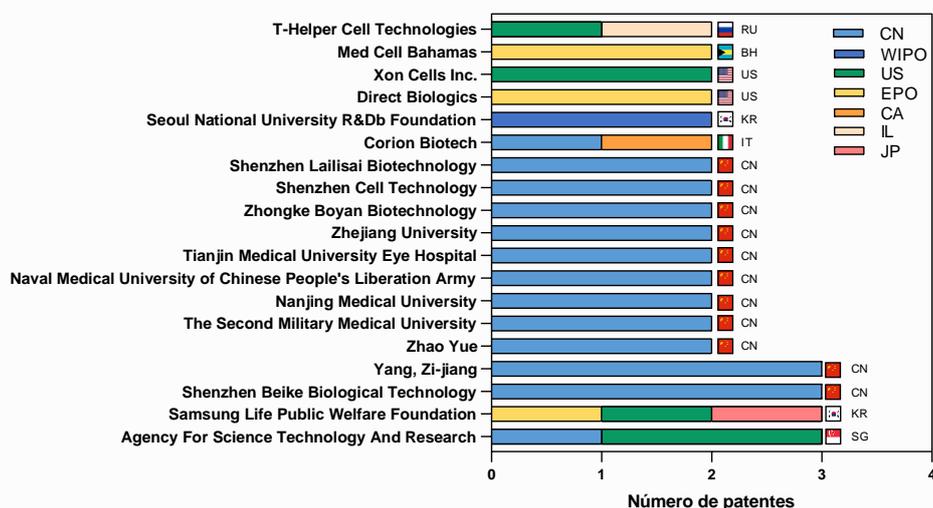


Figura 5 - Principais detentores de patentes e locais onde solicitaram o patenteamento. Os principais detentores de patentes são exibidos no eixo y, e o número de patentes detidas pelas empresas pode ser visto no eixo x. As bandeiras e abreviaturas ao lado das barras indicam o país onde a empresa está sediada. As cores da barra indicam onde a patente foi depositada. CN: China; WIPO: Organização Mundial da Propriedade Intelectual; EUA: Estados Unidos; EPO: Instituto Europeu de Patentes; CA: Canadá; IL: Israel; JP: Japão; RU: Rússia; BH: Bahamas; IT: Itália; KR: República da Coreia; SG: Singapura.

Em seguida, foram recuperadas do banco de dados DWPI as principais organizações responsáveis pelo patenteamento de PTLC-CTM, as quais foram divididas por tipo de produto protegido (Figura 6). Os resultados demonstraram diferentes os segmentos das organizações, dentre as quais a maioria das empresas pertence aos setores farmacêutico e de biotecnologia. Na figura 6 estão representadas as seis principais empresas detentoras de ativos e as porcentagens correspondentes à fração que estas empresas detém em relação ao total de patentes, por tipo de PTLC-CTM. Entre as empresas com foco em exossomos, as instituições asiáticas Shenzhen Cell Technology, The Second Military Medical University, Shenzhen Lailisai e Seoul National University R&DB Foundation depositaram cada uma 2,5% do portfólio relacionado a este PTLC-CTM. A norte-americana Xon Cells e a chinesa Yue Zhao depositaram 2,5% dos ativos relacionados aos exossomos. Quando se trata de invenções relacionadas a meios condicionados, Zi-Jiang Yang foi responsável por 8,8%, seguido por Corion Biotech e T-Helper Cell Technologies, com 5,9% cada. A empresa de biotecnologia Med Cell Bahamas predomina em número de depósitos de patentes que protegem o secretoma (28,6%).

Em relação aos documentos que protegem vesículas extracelulares, o Tianjin Medical University Eye Hospital foi responsável pela maior parte dos depósitos de patentes (11,1%). Ainda assim, outras empresas como Samsung Life Public Welfare Foundation, Omnispirant e Unicyte Ag (5,56% cada) também contribuíram para os depósitos. As organizações que optaram por proteger outros tipos de produtos, como lisado ou extrato celular, sobrenadante ou fatores de crescimento derivados de MSC incluem Direct Biologics, Histogen, Ethicon, BioMimetics Sympathies, Guangzhou Sailang Biotechnology, Huazhong University of Science and Technology cada uma com uma contribuição de 5,9% para o total de depósitos de patentes.

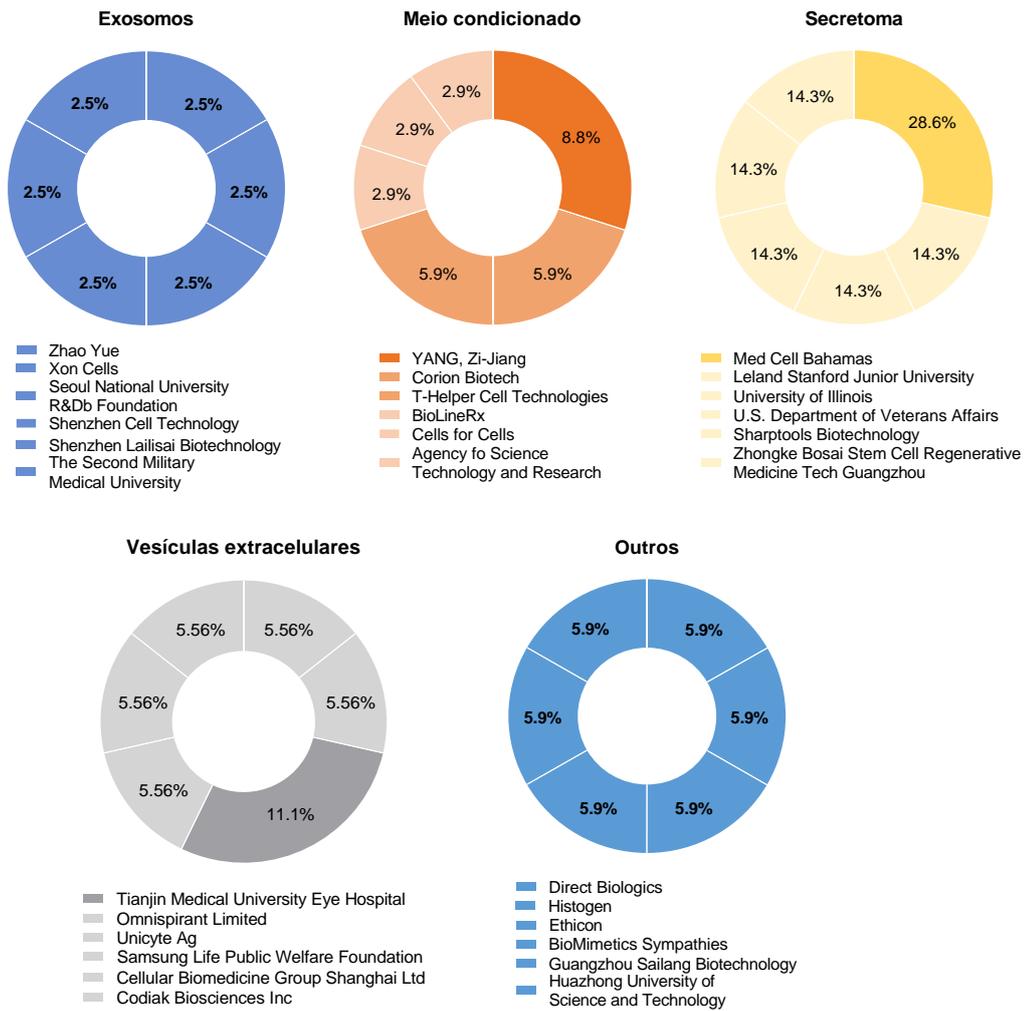


Figura 6 – Principais organizações que depositaram patentes segmentadas por tipo de PTLC-CTM. Os percentuais correspondem à sua contribuição para o total de patentes publicadas em cada segmento.

Antes de entrar no mercado, os produtos terapêuticos devem ser extensivamente testados em ensaios clínicos, que englobam uma fase de testes complexos e caros. Portanto, iniciar um ensaio clínico geralmente significa que a terapia em questão mostra um potencial significativo para se tornar um produto. Mais de mil pesquisas clínicas foram registradas para estudar os resultados da terapia com células-tronco mesenquimais (KOUCHAKIAN et al., 2021), indicando interesse em inserir estas pesquisas no mercado. Da mesma forma, o número de estudos com foco na terapia livre de células está aumentando. Dos 69 ensaios clínicos registrados testando produtos derivados de células mesenquimais, quase metade (33) começou em 2022 ou depois (Tabela S1 – Material Suplementar)(“U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov Database.”, [s.d.]). Assim, também podemos esperar um crescimento contínuo de ensaios clínicos envolvendo PTLC-CTM.

A Figura 7 apresenta a proporção de ensaios clínicos por tipo de produto derivado de célula-tronco mesenquimal. Assim como observado nas patentes, os exossomos também respondem pela maior parcela dos ensaios clínicos registrados – já existem 42 ensaios clínicos com foco em exossomos de células mesenquimais registrados no *ClinicalTrials.gov*. Além disso, houve ensaios clínicos avaliando vesículas extracelulares (7), secretoma (10), meio condicionado (4) e outras moléculas bioativas derivadas de células mesenquimais (5).

A maioria destes estudos, 18 em 69 estudos clínicos (26%), teve como objetivo utilizar os PTLCTM para tratar a síndrome do desconforto respiratório agudo e condições relacionadas à COVID-19, já que a COVID-19 tem sido um tópico de interesse nos últimos anos. Outras condições abordadas pelos estudos foram diabetes (NCT02138331), feridas crônicas e queimaduras (NCT04134676; NCT05078385), alopecia (NCT05658094), doença de Alzheimer (NCT04388982), neuralgia craniofacial (NCT04202783) e osteoartrite (NCT04314661). A China (15), a Indonésia (13) e os EUA (10) foram os países que lideraram em relação ao número de estudos clínicos. Curiosamente, a Direct Biologics, uma das principais detentoras de patentes, patrocina 10 (14,5%) dos 69 ensaios clínicos.

Estudos clínicos com produtos terapêuticos livres de células derivadas de células-tronco mesenquimais



Figura 7 – Distribuição dos produtos terapêuticos derivados das CTM entre os estudos clínicos registrados em *ClinicalTrials.gov*.

O patenteamento, por si só, não garante que tecnologias livres de células serão desenvolvidas em um produto e entrarão no mercado. Por outro lado, entrar na fase clínica implica que algumas tecnologias livres de células passam a ter maior nível de evidência e

robustez na qualidade dos dados, estando mais próximas de se tornarem um produto real. Embora não tenha sido possível verificar se os ensaios clínicos registrados referem-se aos PTLC-CTM com patentes ativas, estes dados indicam que estas tecnologias já avançaram em seu status de desenvolvimento e estão cada vez mais próximas de serem introduzidas no mercado como um produto comercial.

Em síntese, os medicamentos de terapia avançada que utilizam PTLC-CTM são um domínio inovador e em rápida evolução. Como consequência, a proteção intelectual dessas novas tecnologias aumentou exponencialmente na última década. Existem alguns tipos diferentes de tecnologias que podem ser usadas como PTCA, entre elas os exossomos lideram como a tecnologia mais patenteada. Além disso, a China emergiu como o principal local onde as patentes foram desenvolvidas e depositadas, estabelecendo-se como um grande representante em relação à pesquisa e desenvolvimento de PTLC-CTM e como um mercado potencial para a fabricação e comércio destes produtos. Embora a proteção de patentes inclua uma grande variedade de aplicações terapêuticas, ainda há muitos ramos de aplicação a serem explorados, seja usando as tecnologias por si só ou combinando-as com outras tecnologias.

3.4. REFERÊNCIAS

- AHARONSON, B. S.; SCHILLING, M. A. Mapping the technological landscape: Measuring technology distance, technological footprints, and technology evolution. *Research Policy*, v. 45, n. 1, p. 81–96, 1 fev. 2016.
- ANCANS, J. Cell therapy medicinal product regulatory framework in Europe and its application for MSC-based therapy development. *Frontiers in Immunology*, v. 3, p. 253, 2012.
- BAFFOUR, R. et al. Bone marrow-derived stem cell interactions with adult cardiomyocytes and skeletal myoblasts in vitro. *Cardiovascular Revascularization Medicine: Including Molecular Interventions*, v. 7, n. 4, p. 222–230, 2006.
- BOGATCHEVA, N. V.; COLEMAN, M. E. Conditioned Medium of Mesenchymal Stromal Cells: A New Class of Therapeutics. *Biochemistry. Biokhimiia*, v. 84, n. 11, p. 1375–1389, nov. 2019.
- CARLOMAGNO, C. et al. Raman Fingerprint of Extracellular Vesicles and Conditioned Media for the Reproducibility Assessment of Cell-Free Therapeutics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, p. 640617, 2021.
- CHENG, H. et al. Hypoxia-challenged MSC-derived exosomes deliver miR-210 to attenuate post-infarction cardiac apoptosis. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 11, n. 1, p. 224, 8 jun. 2020.
- DAS, M. et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of traumatic brain injury: progress and prospects. *Reviews in the Neurosciences*, v. 30, n. 8, p. 839–855, 1 dez. 2019.
- DECHEZLEPRÊTRE, A.; MÉNIÈRE, Y.; MOHNEN, M. International patent families: from application strategies to statistical indicators. *Scientometrics*, v. 111, n. 2, p. 793–828, 1 maio 2017.
- DEFTU, A. T. et al. Chapter 9 - Exosomes as intercellular communication messengers for cardiovascular and cerebrovascular diseases. Em: EDELSTEIN, L. et al. (Eds.). *Exosomes*. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 199–238.
- DOYLE, L. M.; WANG, M. Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, v. 8, n. 7, p. 727, jul. 2019.
- EATON, J.; KORTUM, S. International Technology Diffusion: Theory and Measurement. *International Economic Review*, v. 40, n. 3, p. 537–570, 1999.
- ERNST, H. Patent information for strategic technology management. *World Patent Information*, v. 25, n. 3, p. 233–242, 1 set. 2003.
- EVANGELISTA, A. F.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Cell-free therapy: a neuroregenerative approach to sensory neuropathy? *Neural Regeneration Research*, v. 14, n. 8, p. 1383, ago. 2019.
- FU, M. et al. Exosomes derived from MSC pre-treated with oridonin alleviates myocardial IR injury by suppressing apoptosis via regulating autophagy activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 25, n. 12, p. 5486–5496, 2021.
- GATTI, S. et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, v. 26, n. 5, p. 1474–1483, maio 2011.
- GNECCHI, M. et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 20, n. 6, p. 661–669, abr. 2006.

- GOLCHIN, A.; SHAMS, F.; KARAMI, F. Advancing Mesenchymal Stem Cell Therapy with CRISPR/Cas9 for Clinical Trial Studies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1247, p. 89–100, 2020.
- GUADIX, J. A.; ZUGAZA, J. L.; GÁLVEZ-MARTÍN, P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. *Medicina Clinica*, v. 148, n. 9, p. 408–414, 10 maio 2017.
- HE, C. et al. Comparison of two cell-free therapeutics derived from adipose tissue: small extracellular vesicles versus conditioned medium. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 13, n. 1, p. 86, 3 mar. 2022.
- HERRMANN, I. K.; WOOD, M. J. A.; FUHRMANN, G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nature Nanotechnology*, v. 16, n. 7, p. 748–759, jul. 2021.
- HSU, M.-F. et al. Can mesenchymal stem cell lysate reverse aging? *Aging*, v. 10, n. 10, p. 2900–2910, 24 out. 2018.
- KESHTKAR, S.; AZARPIRA, N.; GHAREMANI, M. H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 9, n. 1, p. 63, 9 mar. 2018.
- KINNAIRD, T. et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, v. 109, n. 12, p. 1543–1549, 30 mar. 2004.
- KOUCHAKIAN, M. R. et al. The Clinical Trials of Mesenchymal Stromal Cells Therapy. *Stem Cells International*, v. 2021, p. e1634782, 3 nov. 2021.
- LAI, R. C. et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, v. 4, n. 3, p. 214–222, maio 2010.
- LEE, S.-J. et al. Mesenchymal Stem Cells Contribute to Improvement of Renal Function in a Canine Kidney Injury Model. *In Vivo*, v. 31, n. 6, p. 1115–1124, 1 nov. 2017.
- LI, T. et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells and Development*, v. 22, n. 6, p. 845–854, 15 mar. 2013.
- LIANG, Y. et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*, v. 11, n. 7, p. 3183–3195, 1 jan. 2021.
- LIAU, L. L. et al. Treatment of spinal cord injury with mesenchymal stem cells. *Cell & Bioscience*, v. 10, p. 112, 2020.
- LÖTVALL, J. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 3, p. 26913, 2014.
- MALIK, S.; MALIK, T. Mesenchymal Stem Cells Lysate as a Cell-Free Therapy: A Review. *Current Biotechnology*, v. 10, n. 2, p. 78–87, [s.d.].
- MARCATO, J. DE M.; NORONHA, D. P. Indicadores bibliométricos e cientométricos em CT&I: apontamentos históricos, metodológicos e tendências de aplicação. 2013.
- NISHIKAWA, T. et al. Filtrated Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Lysate Ameliorates Experimental Acute Colitis in Mice. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 66, n. 4, p. 1034–1044, abr. 2021.
- OHNISHI, S. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 42, n. 1, p. 88–97, jan. 2007.
- POOMANI, M. S. et al. Mesenchymal Stem Cell (MSCs) Therapy for Ischemic Heart Disease: A Promising Frontier. *Global Heart*, v. 17, n. 1, p. 19, 8 mar. 2022.
- QIU, X. et al. Exosomes released from educated mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing via promoting angiogenesis. *Cell Proliferation*, v. 53, n. 8, p. e12830, 2020.

- SANTOS, E. J. C.; WINCK, C. P.; BRAGA, C. L. Utilização terapêutica das células progenitoras adultas multipotentes alogênicas em cães acometidos pela doença renal. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 13, n. 4, p. 534–543, 2019.
- SANTOS, J. R. DE J.; PINTO, C. D.; ROCHA, A. M. Technological scenarios of the use of nanobiotechnology in strategies against Zika virus. *COLLNET Journal of Scientometrics and Information Management*, v. 15, n. 2, p. 413–428, 3 jul. 2021.
- SANTOS, J. R.; ROCHA, A. M. Perfil das Bases de Dados Científicas e Tecnológicas Utilizadas por Pesquisadores Brasileiros em Estudos nas áreas de Ciências da Vida. *Cadernos de Prospecção*, v. 14, n. 3, p. 784–784, 1 jul. 2021.
- SPEES, J. L.; LEE, R. H.; GREGORY, C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 7, n. 1, p. 125, 31 ago. 2016.
- TAKEDA, Y. et al. Nanobiotechnology as an emerging research domain from nanotechnology: A bibliometric approach. *Scientometrics*, v. 80, n. 1, p. 23–38, 20 mar. 2009.
- THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.
- U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov Database. Disponível em: <<https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/home>>. Acesso em: 1 jun. 2023.
- VIZOSO, F. J. et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 9, p. 1852, 25 ago. 2017.
- YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, v. 4, n. 1, p. 27066, 1 jan. 2015.

CONCLUSÃO

- Os tratamentos com MSC ou VE-MSC induziram antinocicepção duradoura e melhoraram parâmetros funcionais de capacidade física em modelo de dor neuropática de forma similar.
- Os mecanismos associados a esses efeitos foram compartilhados por MSC e VE-MSC e envolveram a modulação da produção de citocinas por macrófagos, o aumento dos níveis de IL-10, a ativação de receptores CXCR2 e a regulação da expressão gênica de peptídeos opioides endógenos.
- As MSC-LIF e VE-LIF inibem citocinas pró-inflamatória e aumentam a produção de IL-10, *in vitro*.
- As VE-LIF preservam as propriedades terapêuticas das células de origem, tanto nos testes *in vitro*, como nas avaliações *in vivo*.
- As MSC-LIF e VE-LIF melhoram a capacidade física de camundongos neuropáticos.
- A potencialização do efeito antinociceptivo de MSC pela manipulação genética para superexpressão de LIF não foi observada.
- A proteção intelectual das tecnologias *cell free* derivadas de MSC aumentou exponencialmente na última década.
- Vesículas extracelulares e exossomos lideram como a tecnologia mais patenteada.
- A China emergiu como o principal local onde as patentes foram desenvolvidas e depositadas, estabelecendo-se como um dos principais agentes em pesquisa e desenvolvimento e um mercado potencial para a fabricação e comércio de produtos terapêuticos derivados de MSC.
- A proteção de patentes inclui uma grande variedade de aplicações terapêuticas, e ainda há muitos campos tecnológicos a se explorar, seja usando as tecnologias por si só ou combinando-as com outras tecnologias.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABOUZID, M. R. et al. The Safety and Efficacy of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure and Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of Clinical Trials. **Cureus**, v. 15, n. 11, p. e49645, nov. 2023.
- ABY, F. et al. Switch of serotonergic descending inhibition into facilitation by a spinal chloride imbalance in neuropathic pain. **Science Advances**, v. 8, n. 30, p. eabo0689, 29 jul. 2022.
- ADAM, F.; CHATELLIER, G.; ALFONSI, P. Assessment of the concordance between DN4 scores performed by the patient (self-assessment) or by the physician (hetero-assessment) to detect subacute neuropathic postoperative pain. **European Journal of Pain (London, England)**, 19 jan. 2024.
- AGUIAR, D. P. et al. Prevalence of chronic pain in Brazil: systematic review. **BrJP**, v. 4, p. 257–267, 1 set. 2021.
- AHARONSON, B. S.; SCHILLING, M. A. Mapping the technological landscape: Measuring technology distance, technological footprints, and technology evolution. **Research Policy**, v. 45, n. 1, p. 81–96, 1 fev. 2016.
- ALLES, S. R. A.; SMITH, P. A. Etiology and Pharmacology of Neuropathic Pain. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 315–347, 1 abr. 2018.
- BAGNO, L. L. et al. Mechanism of action of mesenchymal stem cells (MSCs): Impact of Delivery Method. **Expert opinion on biological therapy**, v. 22, n. 4, p. 449–463, abr. 2022.
- BALOG, B. M.; SONTI, A.; ZIGMOND, R. E. Neutrophil biology in injuries and diseases of the central and peripheral nervous systems. **Progress in Neurobiology**, v. 228, p. 102488, 1 set. 2023.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 16 out. 2009.
- BERNARDI, C. et al. GM-CSF in Allogenic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: from Graft-versus-Host Disease to Graft-versus-Tumor effect. **Transplantation and Cellular Therapy**, p. S2666- 6367(24)00141–6, 13 jan. 2024.
- BOGATCHEVA, N. V.; COLEMAN, M. E. Conditioned Medium of Mesenchymal Stromal Cells: A New Class of Therapeutics. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 84, n. 11, p. 1375–1389, nov. 2019.
- BREIVIK, H.; EISENBERG, E.; O'BRIEN, T. The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1229, 24 dez. 2013.
- BRINI, A. T. et al. Therapeutic effect of human adipose-derived stem cells and their secretome in experimental diabetic pain. **Scientific Reports**, v. 7, p. 9904, 29 ago. 2017.
- BRYK, M. et al. Mesenchymal stem cells and extracellular vesicles for the treatment of pain: Current status and perspectives. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 17, p. 4281–4299, 2022.
- CABAÑA-MUÑOZ, M. E. et al. Adult Mesenchymal Stem Cells from Oral Cavity and Surrounding Areas: Types and Biomedical Applications. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2109, 9 ago. 2023.
- CAPLAN, A. I. Are All Adult Stem Cells The Same? **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 4–10, 1 dez. 2015.
- CARLSON, J. D. et al. Sensitization of pain-modulating neurons in the rostral ventromedial medulla after peripheral nerve injury. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 48, p. 13222–13231, 28 nov. 2007.
- CARREIRA, E. U. et al. Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 5, p. 654–663, 2013.
- CELIK, M. Ö. et al. IL-4 induces M2 macrophages to produce sustained analgesia via opioids. **JCI insight**, v. 5, n. 4, p. e133093, 133093, 27 fev. 2020.

- CHAKRAVARTHY, K. et al. Stem Cell Therapy for Chronic Pain Management: Review of Uses, Advances, and Adverse Effects. **Pain Physician**, v. 20, n. 4, p. 293–305, maio 2017.
- CHEN, G. et al. Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 137, n. Pt 8, p. 2193–2209, ago. 2014.
- CHEN, O.; DONNELLY, C. R.; JI, R.-R. Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. **Current Opinion in Neurobiology**, Brain, gut, and immune system interactions. v. 62, p. 17–25, 1 jun. 2020.
- CHENAF, C. et al. Prevalence of chronic pain with or without neuropathic characteristics in France using the capture-recapture method: a population-based study. **Pain**, v. 159, n. 11, p. 2394–2402, nov. 2018.
- CHENG, T.; XU, Z.; MA, X. The role of astrocytes in neuropathic pain. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 1007889, 20 set. 2022.
- CHU, M. et al. Nebulization Therapy with Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for COVID-19 Pneumonia. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, n. 6, p. 2152–2163, ago. 2022.
- CHUNG, K. et al. Sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia of the injured peripheral nerve in a rat neuropathic pain model. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 376, n. 2, p. 241–252, 9 dez. 1996.
- COBOS, E. J.; PORTILLO-SALIDO, E. “Bedside-to-Bench” Behavioral Outcomes in Animal Models of Pain: Beyond the Evaluation of Reflexes. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 6, p. 560–591, dez. 2013.
- COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 16 fev. 2017.
- CORDER, G. et al. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. **Annual review of neuroscience**, v. 41, p. 453–473, 8 jul. 2018.
- DABROWSKA, S. et al. Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 591065, 5 fev. 2021.
- DAHLHAMER, J. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults — United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, 2018.
- DALTRO, P. S. et al. Therapy with mesenchymal stromal cells or conditioned medium reverse cardiac alterations in a high-fat diet-induced obesity model. **Cytotherapy**, v. 19, n. 10, p. 1176–1188, 1 out. 2017.
- DAMASCENO, P. K. F. et al. Genetic Engineering as a Strategy to Improve the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.
- DAOU, I. et al. Optogenetic Silencing of Nav1.8-Positive Afferents Alleviates Inflammatory and Neuropathic Pain. **eNeuro**, v. 3, n. 1, 1 jan. 2016.
- DAVOLI-FERREIRA, M. et al. Regulatory T cells counteract neuropathic pain through inhibition of the Th1 response at the site of peripheral nerve injury. **Pain**, v. 161, n. 8, p. 1730–1743, ago. 2020.
- DE FREITAS-SUAREZ, A. et al. An Integrative Approach to the Current Treatment of HIV-Associated Neurocognitive Disorders and the Implementation of Leukemia Inhibitor Factor as a Mediator of Neurocognitive Preservation. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 11, p. 2194, 11 nov. 2023.
- DE RIDDER, D.; ADHIA, D.; VANNESTE, S. The anatomy of pain and suffering in the brain and its clinical implications. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 130, p. 125–146, 1 nov. 2021.

- DI STEFANO, G. et al. Pharmacotherapeutic Options for Managing Neuropathic Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pain Research and Management**, v. 2021, p. e6656863, 26 abr. 2021.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.
- DOS SANTOS, G. G. L. et al. Mesenchymal stem cells reduce the oxaliplatin-induced sensory neuropathy through the reestablishment of redox homeostasis in the spinal cord. **Life Sciences**, v. 265, p. 118755, 15 jan. 2021.
- DWORKIN, R. H. et al. Diagnosis and assessment of pain associated with herpes zoster and postherpetic neuralgia. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 1 Suppl 1, p. S37-44, jan. 2008.
- DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **PAIN**, v. 132, n. 3, p. 237, dez. 2007.
- EDELMANN, M. J.; KIMA, P. E. Current understanding of extracellular vesicle homing/tropism. **Zoonoses (Burlington, Mass.)**, v. 2, p. 14, 2022.
- ESCH, T.; KREAM, R. M.; STEFANO, G. B. Emerging regulatory roles of opioid peptides, endogenous morphine, and opioid receptor subtypes in immunomodulatory processes: Metabolic, behavioral, and evolutionary perspectives. **Immunology Letters**, v. 227, p. 28–33, nov. 2020.
- EVANGELISTA, A. F. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, p. 189, 22 jun. 2018.
- EVANGELISTA, A. F.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Cell-free therapy: a neuroregenerative approach to sensory neuropathy? **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 8, p. 1383, ago. 2019.
- FERREIRA, G. E. et al. Efficacy, safety, and tolerability of antidepressants for pain in adults: overview of systematic reviews. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 380, p. e072415, 1 fev. 2023.
- FINNERUP, N. B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 2, p. 162–173, 1 fev. 2015.
- FIGLIORE, N. T. et al. Pain-resolving immune mechanisms in neuropathic pain. **Nature Reviews. Neurology**, v. 19, n. 4, p. 199–220, abr. 2023.
- FLATTERS, S. J. L.; BENNETT, G. J. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: Evidence for mitochondrial dysfunction. **Pain**, v. 122, n. 3, p. 245–257, jun. 2006.
- FOROUZANFAR, F. et al. New approach for the treatment of neuropathic pain: Fibroblast growth factor 1 gene-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 22, n. 2, p. 295–310, fev. 2018.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, n. 3, p. 381–390, dez. 1966.
- GABAY, E. et al. Chronic blockade of interleukin-1 (IL-1) prevents and attenuates neuropathic pain behavior and spontaneous ectopic neuronal activity following nerve injury. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 15, n. 3, p. 242–248, mar. 2011.
- GALVIN, D. A.; C, M. The role of T-lymphocytes in neuropathic pain initiation, development of chronicity and treatment. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 18, p. 100371, dez. 2021.
- GAMA, K. B. et al. Conditioned Medium of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Approach to Neuropathic Pain: A Preclinical Evaluation. **Stem Cells International**, v. 2018, p. 8179013, 2018.

- GANE, J. M.; STOCKLEY, R. A.; SAPEY, E. TNF- α Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF- α Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1079851, 2016.
- GAO, X. et al. Huc-MSCs-derived exosomes attenuate neuropathic pain by inhibiting activation of the TLR2/MyD88/NF- κ B signaling pathway in the spinal microglia by targeting Rsad2. **International Immunopharmacology**, v. 114, p. 109505, jan. 2023a.
- GAO, X. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles carrying miR-99b-3p restrain microglial activation and neuropathic pain by stimulating autophagy. **International Immunopharmacology**, v. 115, p. 109695, fev. 2023b.
- GAO, Y. et al. Transfer of inflammatory mitochondria via extracellular vesicles from M1 macrophages induces ferroptosis of pancreatic beta cells in acute pancreatitis. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12410, fev. 2024.
- GE, M. et al. Effects of mesenchymal stem cells transplantation on cognitive deficits in animal models of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **Brain and Behavior**, v. 8, n. 7, p. e00982, jul. 2018.
- GHEORGHE, R.-O. et al. The Yin/Yang Balance of Communication between Sensory Neurons and Macrophages in Traumatic Peripheral Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12389, jan. 2022.
- GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–231, abr. 2014.
- HAN, Y. et al. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 886, 13 ago. 2019.
- HARRELL, C. R. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1605, 11 dez. 2019.
- HIGGINS, C. et al. Cross-sectional study examining the epidemiology of chronic pain in Nepal. **Pain Reports**, v. 8, n. 2, p. e1067, 2023.
- HOERDER, S. et al. Acupuncture in diabetic peripheral neuropathy-neurological outcomes of the randomized acupuncture in diabetic peripheral neuropathy trial. **World Journal of Diabetes**, v. 14, n. 12, p. 1813–1823, 15 dez. 2023.
- HSU, J.-M. et al. Locally Applied Stem Cell Exosome-Scaffold Attenuates Nerve Injury-Induced Pain in Rats. **Journal of Pain Research**, v. 13, p. 3257–3268, 2020.
- HU, Y. et al. Progress in Pathological and Therapeutic Research of HIV-Related Neuropathic Pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 43, n. 7, p. 3343–3373, out. 2023.
- HUA, T. et al. Huc-MSCs-derived exosomes attenuate inflammatory pain by regulating microglia pyroptosis and autophagy via the miR-146a-5p/TRAF6 axis. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 324, 14 jul. 2022.
- HUNG, A. L.; LIM, M.; DOSHI, T. L. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 17, p. 287–293, out. 2017.
- HUNT, C. et al. Prevalence of chronic pain after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. **Regional Anesthesia & Pain Medicine**, v. 46, n. 4, p. 328–336, 1 abr. 2021.
- IASP, I. A. FOR THE S. OF P. **Terminology** | **International Association for the Study of Pain**. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>>. Acesso em: 6 fev. 2024.
- ISLAM, M. A. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 19, p. 6311, 30 set. 2023.
- JHENG, Y.-W. et al. Neuropathic Pain Affects Quality of Life in Breast Cancer Survivors with Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Pain Management Nursing: Official Journal**

- of the American Society of Pain Management Nurses, p. S1524- 9042(23)00250-3, 25 jan. 2024.
- JI, Y. et al. Effect of sympathetic sprouting on the excitability of dorsal root ganglion neurons and afferents in a rat model of neuropathic pain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 587, p. 49–57, 8 jan. 2022.
- JIANG, Y. et al. Structural Designs and Mechanogating Mechanisms of the Mechanosensitive Piezo Channels. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 6, p. 472–488, jun. 2021.
- KARIMI, S. A.; ZAHRA, F. T.; MARTIN, L. J. IUPHAR review: Navigating the role of preclinical models in pain research. **Pharmacological Research**, v. 200, p. 107073, fev. 2024.
- KERCKHOVE, N. et al. Cross-Sectional Study of Prevalence, Characterization and Impact of Chronic Pain Disorders in Workers. **The Journal of Pain**, v. 22, n. 5, p. 520–532, 1 maio 2021.
- KISSOON, N. R. et al. Quantitative assessment of painful diabetic peripheral neuropathy after high-frequency spinal cord stimulation: a pilot study. **Pain Medicine (Malden, Mass.)**, v. 24, n. Supplement_2, p. S41–S47, 13 out. 2023.
- KRISHNA MOHAN, G. V. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy for a Better Prognosis of Heart Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Cureus**, v. 15, n. 8, p. e43037, ago. 2023.
- LABUZ, D. et al. T lymphocytes containing β -endorphin ameliorate mechanical hypersensitivity following nerve injury. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 7, p. 1045–1053, out. 2010.
- LAMBARTH, A. et al. Prevalence of chronic pain or analgesic use in children and young people and its long-term impact on substance misuse, mental illness, and prescription opioid use: a retrospective longitudinal cohort study. **The Lancet Regional Health - Europe**, v. 35, p. 100763, 15 nov. 2023.
- LIGHTNER, A. L. et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle Infusion for the Treatment of Respiratory Failure From COVID-19: A Randomized, Placebo-Controlled Dosing Clinical Trial. **Chest**, v. 164, n. 6, p. 1444–1453, dez. 2023.
- LIU, T.; VAN ROOIJEN, N.; TRACEY, D. J. Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. **Pain**, v. 86, n. 1, p. 25–32, 1 maio 2000.
- LONDON, A.; COHEN, M.; SCHWARTZ, M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 34, 8 abr. 2013.
- LOPES, D. M. et al. Sex differences in peripheral not central immune responses to pain-inducing injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16460, 28 nov. 2017.
- LOTFY, A.; ABOQUELLA, N. M.; WANG, H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, p. 66, 7 abr. 2023.
- LU, W. et al. Efficacy and safety of mesenchymal stem cell therapy in liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, n. 1, p. 301, 20 out. 2023.
- LU, Y. et al. Human PMSCs-derived small extracellular vesicles alleviate neuropathic pain through miR-26a-5p/Wnt5a in SNI mice model. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 221, 7 set. 2022.
- LUO, D. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a promising cell-free therapy for knee osteoarthritis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1309946, 2024.
- MA, L. et al. Spinal microglial β -endorphin signaling mediates IL-10 and exenatide-induced inhibition of synaptic plasticity in neuropathic pain. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 27, n. 10, p. 1157–1172, 10 jun. 2021.
- MARCATO, J. DE M.; NORONHA, D. P. Indicadores bibliométricos e cientométricos em CT&I: apontamentos históricos, metodológicos e tendências de aplicação. 2013.

- MCLACHLAN, E. M. et al. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. **Nature**, v. 363, n. 6429, p. 543–546, jun. 1993.
- MEAADI, J. et al. The safety and efficacy of gabapentinoids in the management of neuropathic pain: a systematic review with meta-analysis of randomised controlled trials. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 45, n. 3, p. 556–565, jun. 2023.
- MENDONÇA, M. V. P. et al. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 6, p. 126, 17 nov. 2014.
- MESSAOUDI, O. et al. Stem Cells and Extrusion 3D Printing for Hyaline Cartilage Engineering. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 2, jan. 2021.
- MICLESCU, A. et al. Chronic neuropathic pain after traumatic peripheral nerve injuries in the upper extremity: prevalence, demographic and surgical determinants, impact on health and on pain medication. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 20, n. 1, p. 95–108, 18 dez. 2019.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, abr. 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasília). Agência Nacional de Vigilância Sanitária . INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 270, DE 13 DE DEZEMBRO DE 2023. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação Complementares aos Produtos de Terapias Avançadas. Diário Oficial [da] União, [S. l.], n. 239, 18 dez. 2023.
- MIRANPURI, G. S. et al. Role of Microglia and Astrocytes in Spinal Cord Injury Induced Neuropathic Pain. **Annals of Neurosciences**, v. 28, n. 3–4, p. 219–228, jul. 2021.
- MOCCHI, M. et al. Freeze-Dried Mesenchymal Stem Cell-Secretome Pharmaceuticalization: Optimization of Formulation and Manufacturing Process Robustness. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1129, 23 jul. 2021.
- MONTOTO-MEIJIDE, R. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Traumatic Spinal Cord Injury: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11719, 20 jul. 2023.
- MØRCH, C. D. et al. Oxaliplatin causes increased offset analgesia during chemotherapy - a feasibility study. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 23, n. 4, p. 729–734, 26 out. 2023.
- MUSOLINO, P. L. et al. Bone marrow stromal cells induce changes in pain behavior after sciatic nerve constriction. **Neuroscience Letters**, v. 418, n. 1, p. 97–101, 11 maio 2007.
- NIEMEYER, C. S. et al. Trigeminal Postherpetic Neuralgia: From Pathophysiology to Treatment. **Current Pain and Headache Reports**, 23 jan. 2024.
- OLIVEIRA COSTA, J. F. et al. Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 469–474, 1 dez. 2014.
- ONORATO, C. et al. Navigating the mycelium patent maze: A holistic approach to patent mapping in production technologies. **World Patent Information**, v. 76, p. 102265, 1 mar. 2024.
- PADDA, J. et al. Stem Cell Therapy and Its Significance in Pain Management. **Cureus**, v. 13, n. 8, 2021.
- PAICIUS, R. et al. Safety and Efficacy of Intravenous ExoFlo in the Treatment of Complex Regional Pain Syndrome. **Pain Physician**, v. 26, n. 7, p. E851–E857, nov. 2023.
- PANDELANI, F. F. et al. Chronic pain: its impact on the quality of life and gender. **Frontiers in Pain Research (Lausanne, Switzerland)**, v. 4, p. 1253460, 2023.
- PEREIRA, S. et al. Cancer-Related Neuropathic Pain, Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy and Cognitive Decline in a 5-Year Prospective Study of Patients with Breast Cancer-NEON-BC. **Healthcare (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 24, p. 3132, 9 dez. 2023.

- PITCHER, G. M.; HENRY, J. L. Governing role of primary afferent drive in increased excitation of spinal nociceptive neurons in a model of sciatic neuropathy. **Experimental Neurology**, v. 214, n. 2, p. 219–228, 1 dez. 2008.
- POKROVSKAYA, L. A. et al. Biological activity of mesenchymal stem cells secretome as a basis for cell-free therapeutic approach. **Research Results in Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 57–68, 30 mar. 2020.
- POTTORF, T. S. et al. The Role of Microglia in Neuroinflammation of the Spinal Cord after Peripheral Nerve Injury. **Cells**, v. 11, n. 13, p. 2083, 30 jun. 2022.
- RAJA, S. N. et al. The Revised IASP definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 1 set. 2020.
- RAMEZANKHANI, R. et al. Two Decades of Global Progress in Authorized Advanced Therapy Medicinal Products: An Emerging Revolution in Therapeutic Strategies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 547653, 17 dez. 2020.
- RAPOSO, G.; STAHL, P. D. Extracellular vesicles, genetic programmers. **Nature Cell Biology**, v. 26, n. 1, p. 22–23, jan. 2024.
- RATTÉ, S.; PRESCOTT, S. A. Afferent hyperexcitability in neuropathic pain and the inconvenient truth about its degeneracy. **Current Opinion in Neurobiology**, Neurobiology of disease. v. 36, p. 31–37, 1 fev. 2016.
- REINERT, J. P.; VERONIN, M. A.; MEDINA, C. Tricyclic Antidepressants in Nociceptive and Neuropathic Pain: A Review of Their Analgesic Properties in Combination With Opioids. **The Journal of Pharmacy Technology: jPT: Official Publication of the Association of Pharmacy Technicians**, v. 39, n. 1, p. 35–40, fev. 2023.
- RITTNER, H. L. et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. **Anesthesiology**, v. 95, n. 2, p. 500–508, ago. 2001.
- RIZZO, M. G. et al. Therapeutic Perspectives for Inflammation and Senescence in Osteoarthritis Using Mesenchymal Stem Cells, Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Senolytic Agents. **Cells**, v. 12, n. 10, p. 1421, 18 maio 2023.
- SANSONE, P. et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 43, p. E9066–E9075, 24 out. 2017.
- SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. The NOD2 signaling in peripheral macrophages contributes to neuropathic pain development. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 102–116, jan. 2019.
- SANTOS, J. R.; ROCHA, A. M. Perfil das Bases de Dados Científicas e Tecnológicas Utilizadas por Pesquisadores Brasileiros em Estudos nas áreas de Ciências da Vida. **Cadernos de Prospecção**, v. 14, n. 3, p. 784–784, 1 jul. 2021.
- SCHEFF, N. N. et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor-Induced Neutrophil Recruitment Provides Opioid-Mediated Endogenous Anti-nociception in Female Mice With Oral Squamous Cell Carcinoma. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 217, 2019.
- SHAHROR, R. A. et al. Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: The Next Generation of Stem Cell-Based Therapy for TBI. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 4051, 5 jun. 2020.
- SHAMASH, S.; REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. The Cytokine Network of Wallerian Degeneration: Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 α , and Interleukin-1 β . **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3052–3060, 15 abr. 2002.
- SHELASH AL-HAWARY, S. I. et al. The microRNAs (miRs) overexpressing mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in neurological disorders; hope or hype. **Biotechnology Progress**, v. 39, n. 6, p. e3383, 2023.

- SHI, J.-T. et al. Local analgesia of electroacupuncture is mediated by the recruitment of neutrophils and released β -endorphins. **Pain**, v. 164, n. 9, p. 1965–1975, 1 set. 2023.
- SHIMOJI, K.; KUROKAWA, S. Anatomical Physiology of Pain. Em: SHIMOJI, K.; NADER, A.; HAMANN, W. (Eds.). **Chronic Pain Management in General and Hospital Practice**. Singapore: Springer, 2021. p. 21–42.
- SHIUE, S.-J. et al. Mesenchymal stem cell exosomes as a cell-free therapy for nerve injury–induced pain in rats. **PAIN**, v. 160, n. 1, p. 210, jan. 2019.
- SILVA, C. E. A.; GUIMARÃES, R. M.; CUNHA, T. M. Sensory neuron–associated macrophages as novel modulators of neuropathic pain. **Pain Reports**, v. 6, n. 1, p. e873, 9 mar. 2021.
- SILVA, D. N. et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Exhibit Enhanced Immunomodulatory Actions Through the Recruitment of Suppressor Cells in Experimental Chagas Disease Cardiomyopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.
- SILVA, D. N. et al. Intramyocardial transplantation of cardiac mesenchymal stem cells reduces myocarditis in a model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 4, p. 81, 1 jul. 2014.
- SILVA, E. F. DA et al. Patente: da importância e sua proteção: patente de invenção e modelo de utilidade. Rio de Janeiro: Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2021.
- SINICA, V.; VLACHOVÁ, V. Transient receptor potential ankyrin 1 channel: An evolutionarily tuned thermosensor. **Physiological Research**, v. 70, n. 3, p. 363–381, 12 jul. 2021.
- SMITH, P. A. Neuropathic pain; what we know and what we should do about it. **Frontiers in Pain Research**, v. 4, p. 1220034, 22 set. 2023.
- SMOLINSKÁ, V.; BOHÁČ, M.; DANIŠOVIČ, L. Current Status of the Applications of Conditioned Media Derived from Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. **Physiological Research**, v. 72, n. Suppl 3, p. S233–S245, 31 out. 2023.
- SONG, K. et al. Microneedle-mediated delivery of Ziconotide-loaded liposomes fused with exosomes for analgesia. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 356, p. 448–462, abr. 2023.
- SORGE, R. E. et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 1081–1083, ago. 2015.
- SORKIN, L. S. et al. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. **Neuroscience**, v. 81, n. 1, p. 255–262, nov. 1997.
- STAEHELIN JENSEN, T. The pathogenesis of painful diabetic neuropathy and clinical presentation. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 206 Suppl 1, p. 110753, dez. 2023.
- STOMPÓR, M. et al. Prevalence of Chronic Pain, Particularly with Neuropathic Component, and Its Effect on Overall Functioning of Elderly Patients. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 25, p. 2695–2701, 12 abr. 2019.
- STUBHAUG, A. et al. The costs of chronic pain-Long-term estimates. **European Journal of Pain (London, England)**, 12 jan. 2024.
- SU, P.-Y. P. et al. The Role of Neuro-Immune Interactions in Chronic Pain: Implications for Clinical Practice. **Journal of Pain Research**, v. 15, p. 2223–2248, 2022.
- SUMAN, S. et al. Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1201, p. 1–22, 2019.
- TAKEDA, Y. et al. Nanobiotechnology as an emerging research domain from nanotechnology: A bibliometric approach. **Scientometrics**, v. 80, n. 1, p. 23–38, 20 mar. 2009.

- THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.
- TIAN, J. et al. Intrathecal Injection of SIRT1-modified Human Mesenchymal Stem Cells Alleviates Neuropathic Pain in Rat. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n. 5, p. 972–980, 1 maio 2021.
- TIAN, Z. et al. Chapter One - Introduction to stem cells. Em: HIGUCHI, A.; ZHOU, Y.; CHIOU, S.-H. (Eds.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. Stem Cell in Medicine. [s.l.] Academic Press, 2023. v. 199p. 3–32.
- TOGIOKA, B. M. et al. Frequency and Characteristics of Postoperative Neuropathy in Individuals on Gender-Affirming Hormone Therapy Undergoing Gender Affirmation Surgery: A Retrospective Cohort Study. **Cureus**, v. 15, n. 10, p. e47988, out. 2023.
- TOTH, C.; LANDER, J.; WIEBE, S. The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population. **Pain Medicine (Malden, Mass.)**, v. 10, n. 5, p. 918–929, 2009.
- TRAN, H. et al. Descending mechanism by which medial prefrontal cortex endocannabinoid signaling controls the development of neuropathic pain and neuronal activity of dorsal root ganglion. **Pain**, v. 165, n. 1, p. 102–114, 1 jan. 2024.
- VELIKIC, G. et al. Harnessing the Stem Cell Niche in Regenerative Medicine: Innovative Avenue to Combat Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, 2024.
- VERA-PORTOCARRERO, L. P. et al. Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization. **Neuroscience**, v. 140, n. 4, p. 1311–1320, 21 jul. 2006.
- VIDERMAN, D. et al. The Prevalence of Pain in Chronic Diseases: An Umbrella Review of Systematic Reviews. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 23, p. 7302, 25 nov. 2023.
- VILLARREAL-MARTÍNEZ, L. et al. Stem Cell Therapy in the Treatment of Patients With Autism Spectrum Disorder: a Systematic Review and Meta-analysis. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 18, n. 1, p. 155–164, jan. 2022.
- VIZOSO, F. J. et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1852, 25 ago. 2017.
- WALTERS, E. T. Exaptation and Evolutionary Adaptation in Nociceptor Mechanisms Driving Persistent Pain. **Brain, Behavior and Evolution**, 30 nov. 2023.
- WANG, J. et al. Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. **Tissue & Cell**, v. 64, p. 101330, jun. 2020a.
- WANG, Q. et al. Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Neuropathic Pain Induced By Peripheral Nerve Injury in Animal Models: A Systematic Review. **Stem Cells and Development**, v. 29, n. 22, p. 1420–1428, 15 nov. 2020b.
- WANG, R. et al. Stem cell therapy for Crohn's disease: systematic review and meta-analysis of preclinical and clinical studies. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 463, 18 ago. 2021.
- WANG, X. et al. Small Extracellular Vesicles Released from miR-211-5p-Overexpressed Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Spinal Cord Injuries in Rats. **eNeuro**, v. 11, n. 2, p. ENEURO.0361-23.2023, fev. 2024.
- WEI, H. et al. Reduced mechanical hypersensitivity by inhibition of the amygdala in experimental neuropathy: Sexually dimorphic contribution of spinal neurotransmitter receptors. **Brain Research**, v. 1797, p. 148128, 15 dez. 2022.

- WELSH, J. A. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12404, fev. 2024.
- WEST, S. J. et al. Circuitry and plasticity of the dorsal horn – Toward a better understanding of neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 300, p. 254–275, ago. 2015.
- WORTON, R. G.; MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 74, n. 2, p. 171–182, 1969.
- WYSE, R. D.; DUNBAR, G. L.; ROSSIGNOL, J. Use of Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells to Treat Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 1719–1745, 23 jan. 2014.
- XIUMEI, G. et al. Clinical effect of acupuncture along fascia, meridians, and nerves combined with ultrasound-guided paravertebral nerve block in the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized parallel-controlled study. **Journal of Traditional Chinese Medicine = Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan**, v. 43, n. 2, p. 359–364, abr. 2023.
- XU, Z. et al. Pain Relief Dependent on IL-17-CD4+ T Cell- β -Endorphin Axis in Rat Model of Brachial Plexus Root Avulsion After Electroacupuncture Therapy. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 596780, 2020.
- YAMANAKA, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. **Cell Stem Cell**, v. 27, n. 4, p. 523–531, 1 out. 2020.
- YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, n. 1, p. 27066, 1 jan. 2015.
- YANG, G. et al. Immunomodulatory Mechanisms and Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 19, n. 5, p. 1214–1231, 2023.
- YAO, Y. et al. Alendronate Attenuates Spinal Microglial Activation and Neuropathic Pain. **The Journal of Pain**, v. 17, n. 8, p. 889–903, 1 ago. 2016.
- YATZIV, S.-L.; DEVOR, M. Suppression of neuropathic pain by selective silencing of dorsal root ganglion ectopia using nonblocking concentrations of lidocaine. **Pain**, v. 160, n. 9, p. 2105–2114, set. 2019.
- YEH, J. J.; FERNANDEZ, D. Patent prosecution strategies for biotechnological inventions. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 2, n. 6, p. 697–702, dez. 2004.
- YOU, J.; SHIN, Y. K.; SEOL, G. H. Alleviating effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) and its major components on postherpetic pain: a randomized blinded controlled trial. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 24, n. 1, p. 54, 24 jan. 2024.
- YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 877, p. 173090, 15 jun. 2020.
- ZAKRZEWSKI, W. et al. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, p. 68, 26 fev. 2019.
- ZARRABI, M. et al. Allogenic mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles in COVID-19 induced ARDS: a randomized controlled trial. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 14, n. 1, p. 169, 26 jun. 2023.
- ZELENKA, M.; SCHÄFERS, M.; SOMMER, C. Intraneural injection of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 257–263, ago. 2005.
- ZHANG, Q. et al. Brain Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Transfected Bone Mesenchymal Stem Cells for the Repair of Periphery Nerve Injury. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2020.
- ZHANG, X.-L. et al. Stem Cell-Based Therapy for Experimental Ischemic Stroke: A Preclinical Systematic Review. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, p. 628908, 2021.

- ZHOU, H. et al. MSC based gene delivery methods and strategies improve the therapeutic efficacy of neurological diseases. **Bioactive Materials**, v. 23, p. 409–437, maio 2023.
- ZHOU, Y.-Q. et al. Minocycline as a promising therapeutic strategy for chronic pain. **Pharmacological Research**, v. 134, p. 305–310, ago. 2018.
- ZHU, X. et al. Somatosensory cortex and central amygdala regulate neuropathic pain-mediated peripheral immune response via vagal projections to the spleen. **Nature Neuroscience**, 30 jan. 2024.
- ZIS, P. et al. Prevalence and Determinants of Chronic Pain Post-COVID; Cross-Sectional Study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 19, p. 5569, 22 set. 2022.

APÊNDICE**PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO:****PRÊMIAS**

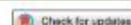
ARTIGOS PUBLICADOS

1- DO ESPÍRITO SANTO, RENAN FERNANDES ; LIMA, MILENA DA SILVA ; JUIZ, PAULO JOSÉ LIMA ; OPRETZKA, LUÍZA CAROLINA FRANÇA ; NOGUEIRA, RENATA CAMPOS ; RIBEIRO, IVONE MARIA ; TOMASSINI, THEREZINHA COELHO BARBOSA ; SOARES, MILENA BOTELHO PEREIRA ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA . *Physalis angulata* concentrated ethanolic extract suppresses nociception and inflammation by modulating cytokines and prostanoids pathways. *NATURAL PRODUCTS RESEARCH*, v. 35, p. 4675-4679, 2019.

NATURAL PRODUCT RESEARCH
<https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1705812>



SHORT COMMUNICATION



Physalis angulata concentrated ethanolic extract suppresses nociception and inflammation by modulating cytokines and prostanoids pathways

Renan Fernandes do Espírito Santo^{a,b}, Milena da Silva Lima^a, Paulo José Lima Juiz^f, Luíza Carolina França Opretzka^a, Renata Campos Nogueira^b, Ivone Maria Ribeiro^d, Therezinha Coelho Barbosa Tomassini^d, Milena Botelho Pereira Soares^b and Cristiane Flora Villarreal^{b,b}

^aFaculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil; ^bInstituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Brazil; ^cCentro de Ciência e Tecnologia em Energia e Sustentabilidade, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Feira de Santana, Brazil; ^dFarmanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

Physalins are seco-steroids with a variety of pharmacological activities already described. In this study the pharmacological properties of a standardized concentrated ethanolic extract from *Physalis angulata* (CEEPA), rich in physalins B, D, F and G, were studied in models of pain and inflammation in mice. Inflammatory mediators were measured by radioimmunoassay and Real-Time PCR in mice paws after the CFA stimuli. Systemic administration of CEEPA produced antinociceptive effect on the writhing test and formalin test. In the writhing test, physalins B, D, F and G showed that the antinociceptive effect of CEEPA is more potent than that of these purified compounds. In addition, CEEPA reduced the levels of TNF- α , IL-1 β , COX-2 and iNOS mRNA in the CFA-induced paw inflammation. Likewise, CEEPA decreased the TNF- α , IL-1 β and PGE₂ paw levels. In conclusion, CEEPA induces antinociceptive and anti-inflammatory effects, with improved pharmacological potency relative to pure physalins, associated to modulation of cytokine and cyclooxygenase pathways.

ARTICLE HISTORY

Received 31 May 2019
 Accepted 1 December 2019

KEYWORDS

Anti-inflammatory;
 antinociception;
 immunomodulation;
 physalins; herbal
 drug extracts

NON-STANDARD

ABBREVIATION

CEEPA - concentrated
 ethanolic extract from
Physalis angulata



Physalis angulata

PHYSALIN B

Antinociceptive activity

PHYSALIN D

Anti-inflammatory activity

PHYSALIN F

Cytokine reduction

PHYSALIN G

COX-2 reduction

CONTACT Cristiane Flora Villarreal cfv@ufba.br

Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1705812>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

2- LEMOS, PAULO VITOR FRANÇA ; OPRETZKA, LUIZA CAROLINA FRANCA ; ALMEIDA, LETÍCIA SANTOS ; CARDOSO, LUCAS GUIMARÃES ; SILVA, JANIA BETÂNIA ALVES DA ; SOUZA, CAROLINA OLIVEIRA DE ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA ; DRUZIAN, JANICE IZABEL. Preparation and characterization of C-phycoerythrin coated with STMP/STPP cross-linked starches from different botanical sources. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, v. 159, p. 739-750, 2020.

International Journal of Biological Macromolecules 159 (2020) 739–750



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



Preparation and characterization of C-phycoerythrin coated with STMP/STPP cross-linked starches from different botanical sources



Paulo Vitor França Lemos^{a,*}, Luiza Carolina Franca Oprezka^b, Letícia Santos Almeida^b, Lucas Guimarães Cardoso^b, Jânia Betânia Alves da Silva^c, Carolina Oliveira de Souza^b, Cristiane Flora Villarreal^b, Janice Izabel Druzian^b

^a Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Avitor Miguel Calmon, Canela, 40231-300 Salvador, BA, Brazil

^b Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia, Barão de Jeremoabo, 147, Campus Universitário de Ondina, 40170-115 Salvador, BA, Brazil

^c Center for Exact and Technological Sciences, College of Mechanical Engineering, Federal University of Recôncavo da Bahia, Rua Barbosa, 710, Cruz das Armas, BA 44430-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2020

Received in revised form 13 May 2020

Accepted 15 May 2020

Available online 18 May 2020

Keywords:

Starches

Chemical modification

Composites

Inflammatory model

Prolonged effect

ABSTRACT

This work aimed to use sodium trimetaphosphate/sodium tripolyphosphate cross-linked potato, banana, corn, cassava, and breadfruit starches as wall materials for C-phycoerythrin encapsulation, characterize them and evaluate their *in vivo* pharmacological effects in an inflammation model. The cross-linked starches were successfully obtained, characterized, and submitted to C-phycoerythrin encapsulation by freeze-drying. The characterization of cross-linked starches-C-phycoerythrin composites by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, thermogravimetry, and differential scanning calorimetry demonstrated that the C-phycoerythrin was encapsulated between amorphous chains of cross-linked starches. Among the five preparations, the cross-linked potato starch presented the highest phosphorous content (0.084%), substitution degree (0.004), water uptake capacity (0.88 g g⁻¹), and C-phycoerythrin encapsulation efficiency (67.58%), thus was tested *in vivo*. The cross-linked potato starch-C-phycoerythrin prolonged the antihyperalgesic effects attributed to C-phycoerythrin, evaluated by complete Freund's adjuvant (CFA) model. Starch cross-linking promoted the formation of a hydrogel network in swollen state entrapping C-phycoerythrin, thus, acting as a barrier to its release to the medium and promoting long-lasting *in vivo* effects. The combination of chemical modification of starches followed by physical treatment presented itself as a useful tool for the development of pharmaceutical formulations.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The phycobiliproteins are a family of soluble proteins, mainly presenting in algae (about 40–60%) [1]. Chemically, these proteins contain covalently linked tetrapyrrole groups (bilins) which absorb light between 470 and 660 nm [2]. In this range, phycobiliproteins can be divided into three classes based on their spectral properties: phycoerythrin (λ_{max} 565 nm); phycocyanin (λ_{max} 620 nm) and allophycocyanin (λ_{max} 650 nm) [3]. Structurally, phycocyanin is composed of two polypeptide chains named α unit (12–19 kDa) and β unit (14–21 kDa) [2]. These two subunits form $\alpha\beta$ monomers, which aggregate into $\alpha_3\beta_3$ trimers and further into disc-shaped $\alpha_6\beta_6$ hexamers, the functional unit of C-phycoerythrin [4].

C-Phycocyanin is a very promising molecule for drug development as several health benefits have been associated with this compound. For instance, anti-inflammatory [5]; anti-hyperalgesic [5]; anti-allergic [6]; immunomodulatory [6]; anti-oxidant [7] and anti-tumorigenic effects [8] have already been reported.

The new generation of drug development concerns to microencapsulation. This process is recognized for improving the bioavailability of bioactive compounds [9,10] and to protect them to adverse surrounding conditions, such as pH variation, light, temperature, oxidative atmosphere, and relative humidity, [11]. This approach mainly includes processes for the food and pharmaceutical industries. Several kinds of microencapsulation techniques as emulsification, coacervation, spray drying, spray cooling, freeze-drying, fluid bed coating, and extrusion were previously described [12,13]. Each technique has its advantages and disadvantages. However, the freeze-drying technique is interesting because it prevents the chemical and thermal degradation of the compounds. Among several coating materials used for microencapsulation purposes, the carbohydrates have been widely investigated for many years [11,14].

Abbreviations: STMP, sodium trimetaphosphate; STPP, sodium tripolyphosphate; SEM, scanning electron microscopy; FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy; XRD, X-ray diffraction; TG, thermogravimetry; DSC, differential scanning calorimetry.

* Corresponding author.

E-mail address: lemospaulo@yahoo.com (P.V.E. Lemos).

3- OPRETZKA, LUIZA CAROLINA FRANÇA; FREITAS, HUMBERTO FONSECA DE ; ESPÍRITO-SANTO, RENAN FERNANDES ; ABREU, LUCAS SILVA ; ALVES, IURA MUNIZ ; TAVARES, JOSEAN FECHINE ; VELOZO, EUDES DA SILVA ; CASTILHO, MARCELO SANTOS ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA . 5-O-methylcneorunchromone K Exerts Antinociceptive Effects in Mice via Interaction with GABAA Receptors. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, v. 22, p. 3413, 2021.



International Journal of
Molecular Sciences



Article

5-O-methylcneorunchromone K Exerts Antinociceptive Effects in Mice via Interaction with GABAA Receptors

Luiza Carolina França Opretzka ¹, Humberto Fonseca de Freitas ¹, Renan Fernandes Espírito-Santo ^{1,2}, Lucas Silva Abreu ³, Iura Muniz Alves ¹, Josean Fechine Tavares ³, Eudes da Silva Velozo ¹, Marcelo Santos Castilho ¹ and Cristiane Flora Villarreal ^{1,2,*}

¹ Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador CEP 40 170-115, Brazil; luizacio@ufba.br (L.C.F.O.); hffreitas@ufba.br (H.F.d.F.); r.fernandes88@hotmail.com (R.F.E.-S.); iuratr4@gmail.com (I.M.A.); euvvelozo@ufba.br (E.d.S.V.); castilho@ufba.br (M.S.C.)

² Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador CEP 40 296-710, Brazil

³ Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa CEP 58 050-585, Brazil; lucas.abreu@ufpb.br (L.S.A.); josean@itf.ufpb.br (J.F.T.)

* Correspondence: cfv@ufba.br; Tel.: +55-71-3283-6933

Abstract: The proper pharmacological control of pain is a continuous challenge for patients and health care providers. Even the most widely used medications for pain treatment are still ineffective or unsafe for some patients, especially for those who suffer from chronic pain. Substances containing the chromone scaffold have shown a variety of biological activities, including analgesic effects. This work presents for the first time the centrally mediated antinociceptive activity of 5-O-methylcneorunchromone K (5-CK). Cold plate and tail flick tests in mice showed that the 5-CK-induced antinociception was dose-dependent, longer-lasting, and more efficacious than that induced by morphine. The 5-CK-induced antinociception was not reversed by the opioid antagonist naloxone. Topological descriptors (fingerprints) were employed to narrow the antagonist selection to further investigate 5-CK's mechanism of action. Next, based on the results of fingerprints analysis, functional antagonist assays were conducted on nociceptive tests. The effect of 5-CK was completely reversed in both cold plate and tail-flick tests by GABA_A receptor antagonist bicuculline, but not by atropine or glibenclamide. Molecular docking studies suggest that 5-CK binds to the orthosteric binding site, with a similar binding profile to that observed for bicuculline and GABA. These results evidence that 5-CK has a centrally mediated antinociceptive effect, probably involving the activation of GABAergic pathways.

Keywords: chromone; analgesic; GABA; docking



Citation: Opretzka, L.C.F.; Freitas, H.F.d.; Espírito-Santo, R.F.; Abreu, L.S.; Alves, I.M.; Tavares, J.F.; Velozo, E.d.S.; Castilho, M.S.; Villarreal, C.F. 5-O-methylcneorunchromone K Exerts Antinociceptive Effects in Mice via Interaction with GABAA Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3413. <https://doi.org/10.3390/ijms22073413>

Academic Editors: Claudia Sisti

Received: 2 December 2020

Accepted: 30 December 2020

Published: 26 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pain is a symptom associated with a variety of pathological states, frequently it is the first or the most important manifestation of a disease. However, sometimes pain can turn into a disease itself. When pain exceeds its biological function of protection and becomes chronic it negatively impacts both day-to-day life and mental health [1,2]. The proper pharmacological control of pain is an unsolved challenge for patients and health care providers. The ongoing treatment is primarily based on the use of opioid analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). Even though those pharmacological classes are among the most widely used medications, they still are ineffective or unsafe for some patients, especially for those who suffer from chronic pain [3,4]. Yet, there are few drug development efforts that focus on targeting novel pathophysiological mechanisms to supply the treatment of patients who do not respond to available drugs [5,6].

Chromones are a class of naturally occurring substances, widely distributed throughout nature, which has been recognized as a privileged structure for drug discovery since it

4- VIANA, MAX DENISSON MAURÍCIO ; LAURIA, PEDRO SANTANA SALES ; LIMA, ALYNE ALMEIDA DE ; OPRETZKA, LUIZA CAROLINA FRANÇA ; MARCELINO, HENRIQUE RODRIGUES ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA .
Alpha-Lipoic Acid as an Antioxidant Strategy for Managing Neuropathic Pain.
ANTIOXIDANTS, v. 11, p. 2420, 2022.



antioxidants



Review

Alpha-Lipoic Acid as an Antioxidant Strategy for Managing Neuropathic Pain

Max Denisson Mauricio Viana ¹, Pedro Santana Sales Lauria ¹, Alyne Almeida de Lima ²,
Luiza Carolina França Oprezka ¹, Henrique Rodrigues Marcelino ¹ and Cristiane Flora Villarreal ^{1,2,*}

¹ School of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador 40170290, BA, Brazil

² Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador 40296710, BA, Brazil

* Correspondence: cfv@ufba.br

Abstract: Neuropathic pain (NP) is the most prevalent and debilitating form of chronic pain, caused by injuries or diseases of the somatosensory system. Since current first-line treatments only provide poor symptomatic relief, the search for new therapeutic strategies for managing NP is an active field of investigation. Multiple mechanisms contribute to the genesis and maintenance of NP, including damage caused by oxidative stress. The naturally occurring antioxidant alpha-lipoic acid (ALA) is a promising therapeutic agent for the management of NP. Several pre-clinical in vitro and in vivo studies as well as clinical trials demonstrate the analgesic potential of ALA in the management of NP. The beneficial biological activities of ALA are reflected in the various patents for the development of ALA-based innovative products. This review demonstrates the therapeutic potential of ALA in the management of NP by discussing its analgesic effects by multiple antioxidant mechanisms as well as the use of patented ALA-based products and how technological approaches have been applied to enhance ALA's pharmacological properties.

Keywords: alpha-lipoic acid; antioxidant; oxidative stress; neuropathy; neuropathic pain



Citation: Viana, M.D.M.; Lauria, P.S.S.; Lima, A.A.d.; Oprezka, L.C.F.; Marcelino, H.R.; Villarreal, C.F. Alpha-Lipoic Acid as an Antioxidant Strategy for Managing Neuropathic Pain. *Antioxidants* 2022, 11, 2420. <https://doi.org/10.3390/antiox11122420>

Academic Editor: Rosanna Di Paola

Received: 21 October 2022

Accepted: 6 December 2022

Published: 8 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Neuropathic pain (NP) is an umbrella term that defines chronic conditions marked by functional alterations of the somatosensory system due to injuries or pathological disorders. These painful conditions are heterogeneous and affect different areas of the nervous system resulting in several clinical manifestations [1]. As chronic painful conditions, including NP, have a prominent central sensitization component, they are often irresponsive to pharmacological treatments with conventional analgesic drugs since their onset [2]. Aside from the lack of effectiveness to promote satisfactory levels of analgesia, currently available drugs for treating NP are also often limited by adverse effects that some patients cannot tolerate [3]. This points out to the need for new and well-tolerated analgesic drugs that are effective in the management of NP.

Although the exact mechanisms leading to pain of neuropathic origin are still unknown, a growing body of evidence associates NP with oxidative stress [4,5]. Oxidative stress results from an imbalance between the production of free radicals and the body's ability to eliminate those radicals by antioxidant mechanisms [6]. During NP, a failure in these mechanisms promotes a pro-oxidative microenvironment in the site of neural damage, thus compromising somatosensory signaling.

As oxidative stress plays an important role in the pathophysiology of NP, natural products and preparations rich in antioxidants have been used for treating NP with the strongest level of evidence for diabetic polyneuropathies [7]. Among these compounds, alpha-lipoic acid (ALA) is of particular interest because many studies have successfully shown its therapeutic benefits and its ability to control NP-related symptoms [7,8]. Antioxidant compounds act on different targets and pathways that ultimately contribute to

5- LINS, FRANCISCA S. V. ; DE SOUZA, THALISSON A. ; OPRETZKA, LUIZA C. F. ; E SILVA, JOANDA P. R. ; PEREIRA, LAIANE C. O. ; ABREU, LUCAS S. ; PINHEIRO, ANDERSON A. V. ; DOS SANTOS, GEORGE L. D. ; DO NASCIMENTO, YURI M ; MELO, JOSÉ IRANILDO MIRANDA DE ; BRAZ-FILHO, RAIMUNDO ; VILLARREAL, CRISTIANE F. ; DA SILVA, MARCELO S. ; TAVARES, JOSEAN F. .
New Pregnane Glycosides from *Mandevilla dardanoi* and Their Anti-Inflammatory Activity. *MOLECULES*, v. 27, p. 5992, 2022.



Article

New Pregnane Glycosides from *Mandevilla dardanoi* and Their Anti-Inflammatory Activity

Francisca S. V. Lins ¹, Thalisson A. de Souza ¹, Luiza C. F. Opretzka ² , Joanda P. R. e Silva ¹, Laiane C. O. Pereira ¹, Lucas S. Abreu ³ , Anderson A. V. Pinheiro ¹, George L. D. dos Santos ¹, Yuri M. do Nascimento ¹ , José Iranildo Miranda de Melo ⁴, Raimundo Braz-Filho ⁵ , Cristiane F. Villarreal ² , Marcelo S. da Silva ¹ and Josean F. Tavares ^{1,*}

¹ Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-90, Paraíba, Brazil

² School of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador 40170-115, Bahia, Brazil

³ Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Fluminense Federal University, Niterói 24020-150, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Department of Biology, Centre of Biological Sciences and Health, State University of Paraíba, Campina Grande 58429-500, Paraíba, Brazil

⁵ Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica 23851-970, Rio de Janeiro, Brazil

* Correspondence: josean@itf.ufpb.br



Citation: Lins, F.S.V.; de Souza, T.A.; Opretzka, L.C.F.; e Silva, J.P.R.; Pereira, L.C.O.; Abreu, L.S.; Pinheiro, A.A.V.; dos Santos, G.L.D.; do Nascimento, Y.M.; de Melo, J.I.M.; et al. New Pregnane Glycosides from *Mandevilla dardanoi* and Their Anti-Inflammatory Activity. *Molecules* **2022**, *27*, 5992. <https://doi.org/10.3390/molecules27185992>

Academic Editor: José Carlos Tavares Carvalho

Received: 14 August 2022

Accepted: 9 September 2022

Published: 14 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Mandevilla* Lindl. is an important genus of the Apocynaceae family, not only as ornamental plants but also for its medicinal uses. In Brazil, *Mandevilla* species are indicated to treat asthma and skin infections, their anti-inflammatory potential and wound healing properties are also reported in the literature. Concerning their chemical composition, this group of plants is a conspicuous producer of pregnane glycosides. *Mandevilla dardanoi* is an endemic species from the Brazilian semiarid region not studied by any phytochemical methods. In view of the medicinal potential of *Mandevilla* species, this study aimed to isolate new pregnane glycosides from *M. dardanoi*. To achieve this main goal, modern chromatography techniques were employed. Five new pregnane glycosides, dardanols A–E, were isolated from the roots of *M. dardanoi* by HPLC. Their structures were determined using extensive 1D and 2D-NMR and mass spectrometry (MSⁿ and HRESIMS) data. The cytotoxicity and the anti-inflammatory potential of these compounds were evaluated. The first was evaluated by measuring proinflammatory cytokines and nitric oxide production by stimulated macrophages. Dardanols were able to inhibit the production of nitric oxide and reduce IL-1 β and TNF- α . The current work demonstrates the chemodiversity of Brazilian semiarid species and contributes to amplifying knowledge about the biological potential of the *Mandevilla* genus.

Keywords: *Mandevilla dardanoi*; Apocynaceae; pregnane glycosides; anti-inflammatory

1. Introduction

Mandevilla Lindl. is one of the largest neotropical genera of the Apocynaceae family, this group comprises approximately 170 species [1–3]. First registered in 2017, *M. dardanoi* M.F. Sales, Kin. Gouv. & A.O. Simões is an endemic species from the Brazilian semiarid region, occurring in the states of Pernambuco and Paraíba [4], there are no studies regarding their chemical composition or pharmacological activities [4]. Rich in flavonoids, steroids, and pregnane glycosides *Mandevilla* species have been used by folk medicine in therapy for snakebites, wound healing, and to treat skin infections and inflammation [5–10].

Composed of a steroidal scaffold, the pregnane (C₂₁) and seco-pregnane-type glycosides mainly occur in Apocynaceae, Malpighiaceae, Ranunculaceae, and Zygophyllaceae families [11]. This class of compounds has demonstrated remarkable biological activities, including anticancer, antinociceptive, anti-inflammatory, antiviral, and antibacterial

6- DOS SANTOS, GEORGE LUÍS DIAS ; DE ARAÚJO, DIEGO IGOR ALVES FERNANDES ; RAIMUNDO E SILVA, JOANDA PAOLA ; DO NASCIMENTO, YURI MANGUEIRA ; DE SOUZA, THALISSON AMORIM ; OPRETZKA, LUIZA CAROLINA FRANÇA ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA ; ABREU, LUCAS SILVA ; DOS SANTOS JUNIOR, FERNANDO MARTINS ; DE MELO, JOSÉ IRANILDO MIRANDA ; FECHINE, IVANA MARIA ; TAVARES, JOSEAN FECHINE ; DA SILVA, MARCELO SOBRAL . Sucrose Diester of Aryldihydronaphthalene-Type Lignan with Anti-inflammatory Activity from *Heliotropium angiospermum*. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, v. 32, p. 1, 2022.

Revista Brasileira de Farmacognosia (2022) 32:734–740
<https://doi.org/10.1007/s43450-022-00295-1>

ORIGINAL ARTICLE



Sucrose Diester of Aryldihydronaphthalene-Type Lignan with Anti-inflammatory Activity from *Heliotropium angiospermum*

George Luís Dias dos Santos¹ · Diego Igor Alves Fernandes de Araújo¹ · Joanda Paola Raimundo e Silva¹ · Yuri Mangueira do Nascimento¹ · Thalisson Amorim de Souza¹ · Luiza Carolina França Opretzka² · Cristiane Flora Villarreal² · Lucas Silva Abreu³ · Fernando Martins dos Santos Junior³ · José Iranildo Miranda de Melo⁴ · Ivana Maria Fachine⁵ · Josean Fachine Tavares¹ · Marcelo Sobral da Silva¹

Received: 2 May 2022 / Accepted: 8 August 2022 / Published online: 18 August 2022
 © The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2022

Abstract

A new lignan (3a → 9':6a → 9-[(7'S,8'R)-4,4'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetramethoxy-2,7'-cycloigna-7-en-9,9'dicarbonyl]-6b-(p-coumaroyl) sucrose) was isolated from *Heliotropium angiospermum* Murray, Boraginaceae, along with four known substances: trigonotin A, rosmarinic acid, narcissin, and ethyl lithospermate. Their structures were deduced based on spectroscopic data analysis (MS and NMR of ¹H and ¹³C) and a comparison with the published data. The absolute configuration for the undescribed lignan was determined using electronic circular dichroism analysis. In addition, the anti-inflammatory activity of this arylidihydronaphthalene was investigated by measuring its ability to inhibit the production of cytokines and nitric oxide by stimulated J774 macrophages. The glycosylated lignan, in a range of non-cytotoxic concentrations, reduced the production/release of pro-inflammatory mediators by stimulated macrophages, showing efficacy like that of dexamethasone, a glucocorticoid medication used as a control drug.

Keywords Aryldihydronaphthalene lignan · Borage family · Cytotoxicity · Interleukin-1 beta · NO inhibition · Sucrose esters

Introduction

The Boraginaceae family comprises 134 genera and 2650 species dispersed in tropical, subtropical, and temperate regions. *Heliotropium*, *Arnebia*, *Martensia*, *Cordia*, and *Trichodesma* are the main genera of this family, the borage or forget-me-not family. The genus *Heliotropium* has approximately 300 species worldwide. In Brazil, they are distributed in the coastal environments, tropical savanna ecoregion or “cerrado,” xeric shrubland and thorn forests or “caatinga,” and rupestrian fields of the southeastern, central, and northeastern mountains, between 21° 10' and 10° S, usually above 900 m.a.s.l. (Giulietti et al. 1997; Vasconcelos 2011) with a discontinuous distribution (Melo and Semir 2008).

Pyrrolizidine alkaloids, flavonoids, terpenoids, and naphthoquinones have been isolated from this genus (Fayed 2021). Similarly, Hosseini and Abolhassani (2011) and Fayed (2021) have also reported various therapeutic properties (e.g., antitumor, antiulcerogenic, antimicrobial, antifungal, larvicidal, anti-inflammatory, analgesic, antileishmania, healing, and antidepressant) of several representatives of this genus species. In Mexico, an anti-inflammatory leaf infusion of *Heliotropium angiospermum* Murray, Boraginaceae, is commonly used against wound infection, dysentery, and diarrhea (Erosa-Rejon et al. 2009). The aerial parts of *Heliotropium angiospermum* are traditionally used by different communities as an anti-inflammatory and wound-healing agent (Hernández-Bobio et al. 2019).

✉ Josean Fachine Tavares
 josean@lf.ufpb.br

¹ Laboratório Multiatômico de Caracterização e Análise, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

² Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Osvaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil

³ Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil

⁴ Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil

⁵ Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil

7- OPRETZKA, LUÍZA CAROLINA FRANÇA; VIANA, MAX DENISSON MAURÍCIO ; DE LIMA, ALYNE ALMEIDA ; DE SOUZA, THALISSON AMORIM ; SCOTTI, MARCUS TULLIUS ; TAVARES, JOSEAN FECHINE ; DA SILVA, MARCELO SOBRAL ; SOARES, MILENA BOTELHO PEREIRA ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA . Cleomin Exerts Acute Antinociceptive Effects in Mice via GABA_B and Muscarinic Receptors. PHARMACEUTICALS, v. 16, p. 1547, 2023.



Article

Cleomin Exerts Acute Antinociceptive Effects in Mice via GABA_B and Muscarinic Receptors

Luíza Carolina França Opretzka ¹, Max Denisson Maurício Viana ¹, Alyne Almeida de Lima ², Thalisson Amorim de Souza ³, Marcus Tullius Scotti ³, Josean Fechine Tavares ³, Marcelo Sobral da Silva ³, Milena Botelho Pereira Soares ^{2,3,4} and Cristiane Flora Villarreal ^{1,4}

¹ School of Pharmacy, Federal University of Bahia, Salvador 40170115, BA, Brazil, luizacfo@ufba.br (L.C.F.O.); max.viana@ufba.br (M.D.M.V.)

² Gonçalo Moniz Institute, FIOCRUZ, Salvador 40296710, BA, Brazil, alyne.lima@fiocruz.br (A.A.d.L.); milena.soares@fiocruz.br (M.B.P.S.)

³ Institute for Research on Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58059900, PB, Brazil, thalisson.amorim@itf.ufpb.br (T.A.d.S.); mtscotti@ceae.ufpb.br (M.T.S.); josean@itf.ufpb.br (J.F.T.); marcelosobral@itf.ufpb.br (M.S.d.S.)

⁴ Institute of Advanced Systems in Health, SENAI CIMATEC, Salvador 41650010, BA, Brazil

* Correspondence: cfv@ufba.br; Tel.: +55-71991789190

Abstract: Cleomin, a 1,3-oxazolidine-2-thione, was recently isolated from *Neocalyptocalyx longifolium*, a species traditionally used for treating painful conditions. Reports about the pharmacological activities of cleomin are lacking. Here, the antinociceptive effects of cleomin were investigated using mice models of pain, namely the formalin, the cold plate, and the tail flick tests. Motor integrity was assessed in the rota-rod test. Antagonism assays and in silico docking analyses were performed to investigate the putative mechanisms of action. Cleomin (12.5–25 mg/kg), at doses that did not induce motor impairment, induced dose-dependent antinociception in both early and late phases of the formalin test and reduced nociceptive behaviors in both the cold plate and tail flick tests. Pretreatments with phaclofen and atropine attenuated the antinociceptive effects of cleomin, implicating the involvement of GABA_B and muscarinic receptors. In silico docking studies suggested satisfactory coupling between cleomin and GABA_B and M₂ receptors, hence corroborating their role in cleomin's activity. Pretreatments with naloxone, yohimbine, bicuculline, and methysergide did not affect the antinociception of cleomin. In silico pharmacokinetics prediction showed a good drug ability profile of cleomin. In conclusion, cleomin promoted antinociception mediated by GABA_B and muscarinic receptors. These findings support further investigation of the analgesic potential of cleomin.

Keywords: cleomin; antinociception; GABAergic receptor; cholinergic receptor; pain; *Neocalyptocalyx longifolium*



Citation: Opretzka, L.C.F.; Viana, M.D.M.; de Lima, A.A.; de Souza, T.A.; Scotti, M.T.; Tavares, J.F.; da Silva, M.S.; Soares, M.B.P.; Villarreal, C.F. Cleomin Exerts Acute Antinociceptive Effects in Mice via GABA_B and Muscarinic Receptors. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1547. <https://doi.org/10.3390/ph16111547>

Academic Editor: Riccardo Petrelli

Received: 11 September 2023

Revised: 21 October 2023

Accepted: 27 October 2023

Published: 2 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The proper pharmacological control of pain is an unsolved challenge for patients and healthcare providers. Current pharmacological strategies rely on opioid analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs, which present restrictions related to their safety profile and risk of abuse [1,2]. The growing global prevalence of chronic pain and the escalating opioid epidemic have highlighted the need for a paradigm shift in pain pharmacotherapy, which will require the development of new safe and effective analgesic drugs acting through different mechanisms of action [3].

Preparations derived from medicinal plants have been used for pain control for millennia. In recent years, researchers have identified several bioactive compounds that confer medicinal properties on plants. Among these compounds, 1,3-oxazolidine-2-thiones

8- ESPÍRITO-SANTO, RENAN FERNANDES DO ; MEIRA, CÁSSIO SANTANA ; OPRETZKA, LUIZA CAROLINA FRANÇA ; DA SILVA, KAROLINE CRISTINA JATOBÁ ; DE ARAÚJO, FÊNIX ALEXANDRA ; COSTA, RAFAEL DOS SANTOS ; VELOZO, EUDES SILVA ; FORMIGA, FABIO ROCHA ; SILVA, DARIZY FLÁVIA ; SOARES, MILENA BOTELHO PEREIRA ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA .
 Inhaled braylin regulates Th2 response and induces relaxant effects in the airway muscles in a model of ovalbumin-induced asthma. *Phytomedicine Plus*, v. 1, p. 100435, 2023.

Phytomedicine Plus 3 (2023) 100435



Inhaled braylin regulates Th2 response and induces relaxant effects in the airway muscles in a model of ovalbumin-induced asthma

Renan Fernandes do Espírito Santo^a, Cássio Santana Meira^{a,f}, Luiza Carolina França Opretzka^b, Karoline Cristina Jatobá da Silva^b, Fênix Alexandra de Araújo^a, Rafael dos Santos Costa^b, Eudes Silva Velozo^b, Fabio Rocha Formiga^{c,d}, Darizy Flávia Silva^{a,c}, Milena Botelho Pereira Soares^{a,f}, Cristiane Flora Villarreal^{a,b,*}

^a Instituto Gonzaga Meniz, Fundação Osmêdo Cruz, 46.286-770, Salvador, BA, Brazil

^b Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Bahia, 40.170-115, Salvador, BA, Brazil

^c Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, 50.100-130, Recife, PE, Brazil

^d Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Osmêdo Cruz, 50.740-665, Recife, PE, Brazil

^e Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Bahia, Salvador, BA, 40110-902, Brazil

^f SENAI Instituto de Inovação em Sistemas Avançados de Saúde, Centro Universitário SENAI/CIMA/IBC, 41650-010, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Braylin
 Asthma
 Ovalbumin
 Th2 cytokines
 Tracheal muscle relaxation
 Inhalation route

ABSTRACT

Background: Coumarins are compounds with wide and relevant pharmacological properties, being considered one of the most important chemical classes among natural compounds. Braylin (6-methoxyreselin) is a coumarin whose pharmacological properties have not yet been extensively explored. Previous studies have shown its anti-inflammatory and immunomodulatory activities, potentially associated with glucocorticoid receptors, plus it is a phosphodiesterase 4 inhibitor. Thus, the present study was designed to investigate the pharmacological potential of braylin for asthma treatment.

Methods: Mice induced to an asthma model using ovalbumin (OVA) were treated with vehicle, braylin, or dexamethasone via intraperitoneal injection or inhalation, and the bronchoalveolar lavage (BAL) was collected to evaluate infiltration of inflammatory cells, and cytokine levels. Histopathological and morphometric analysis of lung tissue were also conducted, while *ex vivo* isometric measurement assessed the effect of braylin on tracheal relaxation.

Results: Braylin (50 mg/kg) showed similar efficacy in reducing the total count of inflammatory cells in the BAL of asthmatic mice by inhalation or intraperitoneal route. Inhaled braylin reduced, in a dose-dependent manner (25 to 100 mg/kg), the total count of inflammatory cells in the BAL of OVA-induced mice, more specifically eosinophils and neutrophils. Plus, inhaled braylin reduced the BAL levels of IL-4, IL-5, and IL-13, cytokines involved in asthma Th2 response. It also reduced pulmonary inflammatory infiltrate and the occurrence of goblet cell metaplasia. In a set of *ex vivo* assays, braylin was able to induce concentration-dependent relaxation of the trachea from mice with or without OVA-induced asthma.

Conclusions: The present results suggest that braylin may be a promising candidate for the treatment of asthma by regulating the Th2 response, inducing relaxant effects in the airway muscles, and presenting efficacy by inhalation route.

1. Introduction

Asthma is a heterogeneous respiratory disease characterized by

chronic airway inflammation. It includes a group of symptoms displayed by the patients that vary over time and in intensity, such as cough, shortness of breath, wheezing, and chest tightness (Asthma, 2021).

Abbreviations: ANOVA, Analysis of variance; BAL, Bronchoalveolar lavage; Dexa, Dexamethasone; HE, Hematoxylin and eosin; inh., Inhalation; ip., Intraperitoneal; OVA, Ovalbumin; PAS, Periodic acid-Schiff; PDE4, Phosphodiesterase 4; SD, Standard deviation; SEM, Standard error of the mean; PBS, Phosphate Buffered Saline.

* Corresponding author.

E-mail address: cfv@ufba.br (C.F. Villarreal).

<https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2023.100435>

Available online 21 March 2023

2667-0313/© 2023 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

9- DE SOUZA, RAFAEL LIMONGI ; DE OLIVEIRA MELO, CAMILA ; OPRETZKA, LUÍZA CAROLINA FRANÇA ; WÂNDEGA, EDUARDO LIMA ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA ; OLIVEIRA, ELQUIO ELEAMEN . Nanoemulsion Improves the Anti-inflammatory Activity of Carvacrol upon Oral Administration. BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY, v. 33, p. 1, 2023.

Revista Brasileira de Farmacognosia (2023) 33:164–172
<https://doi.org/10.1007/s43450-022-00355-6>

ORIGINAL ARTICLE



Nanoemulsion Improves the Anti-inflammatory Activity of Carvacrol upon Oral Administration

Rafael Limongi de Souza¹ · Camila de Oliveira Melo¹ · Luíza Carolina França Opretzka² · Eduardo Lima Wândega² · Cristiane Flora Villarreal² · Elquio Eleamen Oliveira¹

Received: 4 July 2022 / Accepted: 22 December 2022 / Published online: 7 January 2023
 © The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2023

Abstract

Carvacrol is the main phenolic monoterpene isolated from the essential oils of plants from the genus *Origanum* L., Lamiaceae. Carvacrol has several biological activities, including antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities. The present study aimed to develop a carvacrol-loaded nanoemulsion and evaluate whether it improves the anti-inflammatory activity of the oil. A nanoemulsion was produced and its average droplet size, polydispersity index, and zeta potential were characterized. To evaluate its anti-inflammatory activity, a complete Freund's adjuvant-induced paw edema mouse model was used, and interleukin (IL)-1 β levels were quantified using ELISA. To assess toxicity, behavioral changes and biochemical parameters in mice were evaluated. The nanoemulsion was shown to be 125.00 ± 0.782 nm in size, with a polydispersity index of 0.200 ± 0.001 and zeta potential of -26.37 ± 0.59 mV. After intraperitoneal administration, carvacrol and the carvacrol-loaded nanoemulsion showed similar anti-inflammatory efficacy as dexamethasone. Notably, both tested samples had longer anti-inflammatory effects than the control drug. The pharmacological profiles of orally administered carvacrol and its nanoemulsion were different. Although carvacrol (200 mg/kg) did not exhibit anti-inflammatory activity upon oral administration, carvacrol-loaded nanoemulsion administered at the same dose and route induced an anti-edematogenic effect that persisted for up to 24 h. Oral administration of carvacrol-loaded nanoemulsion, but not carvacrol, reduced pro-inflammatory cytokine IL-1 β levels in the inflamed mouse paw, with similar efficacy to dexamethasone. Moreover, daily treatment with carvacrol-loaded nanoemulsion did not induce any behavioral or biochemical alterations. Nanoemulsification improved the pharmacological properties of carvacrol.

Keywords Anti-inflammatory · Essential oil · Nanoemulsion · Oregano · Volatile oil · Toxicity

Introduction

Chronic inflammatory diseases are a major cause of death worldwide. According to the latest assessment of the Global Health Metrics (GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators 2020), inflammatory diseases are among the top ten diseases that cause the most deaths globally. The treatment of these diseases is limited to pharmacological therapies to

suppress the effector pathways of inflammatory stimuli to avoid tissue damage and other consequences of deregulated inflammatory processes (Scheit and Neurath 2018). Pharmacological therapies include nonsteroidal and steroidal anti-inflammatory drugs. However, the chronic use of these drugs has been associated with various adverse events affecting the cardiovascular, gastrointestinal, and renal systems. Factors such as age and the presence of comorbidities can further aggravate these conditions (Cavalcanti et al. 2019). Therefore, research on new drugs that are clinically acceptable against inflammation is needed (Silva et al. 2022). In recent decades, the use of essential oils or their constituents has received special attention, mainly because there has been a more intense search for drugs with fewer side effects as an alternative to existing synthetic anti-inflammatory drugs.

Carvacrol (1, 5-isopropyl-2-methylphenol) is the main phenolic monoterpene isolated from the volatile oil of plants

✉ Elquio Eleamen Oliveira
elquioeleamen@servidor.upeb.edu.br

¹ Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

10- DOS SANTOS, GEORGE ; LINS, FRANCISCA ; DO NASCIMENTO, YURI ; DE SOUZA, THALISSON ; OPREZKA, LUIZA ; VILLARREAL, CRISTIANE ; DE ALBUQUERQUE, ANA ; ABREU, LUCAS ; DOS SANTOS JUNIOR, FERNANDO ; DE MELO, JOSÉ ; FECHINE, IVANA ; BRAZ-FILHO, RAIMUNDO ; TAVARES, JOSEAN ; DA SILVA, MARCELO . Novel Phenylpropanoid Derivative from *Euploca procumbens* (Mill.) Diane & Hilger with Potential Anti-Inflammatory Activity. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY, v. 00, p. 1-8, 2024.

Article

Journal of
the Brazilian
Chemical
Society<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230150>J. Braz. Chem. Soc. 2024, 25, 4, e-10230150, 1-8
©2024 Sociedade Brasileira de Química

Novel Phenylpropanoid Derivative from *Euploca procumbens* (Mill.) Diane & Hilger with Potential Anti-Inflammatory Activity

George L. D. dos Santos,¹ Francisca S. V. Lins,² Yuri M. do Nascimento,³
Thalisson A. de Souza,⁴ Luiza C. F. Oprezka,⁵ Cristiane F. Villarreal,⁶
Ana C. F. de Albuquerque,⁷ Lucas S. Abreu,⁸ Fernando M. dos Santos Junior,⁹
José L. M. de Melo,¹⁰ Ivana M. Fechine,¹¹ Raimundo Braz-Filho,¹²
Josean F. Tavares¹³ and Marcelo S. da Silva¹⁴

¹Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, 58050-585 João Pessoa-PB, Brazil

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170-115 Salvador-BA, Brazil

³Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense, 24020-141 Niterói-RJ, Brazil

⁴Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba, 58109-753 Campina Grande-PB, Brazil

⁵Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, 58109-753 Campina Grande-PB Brazil

⁶Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica-RJ, Brazil

A new phenylpropanoid derivative, named euploic acid (1), was isolated from *Euploca procumbens* (Mill.) Diane & Hilger, Boraginaceae, along with lithospermic acid B (2), lithospermic acid (3), 9⁺-methyl lithospermate (4), and luteolin-7-O-glucoside (5). Compound structures were determined by mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance (NMR) analysis and comparison with published data. Absolute configuration of 1 was established via electronic circular dichroism (ECD). Anti-inflammatory potential of euploic acid (1) was assessed by measuring its inhibition of cytokine and nitric oxide production in stimulated J774 macrophages. Compound 1 significantly reduced pro-inflammatory mediator production and release by stimulated macrophages at non-cytotoxic concentrations, comparable to the efficacy of dexamethasone. Our findings demonstrate the potential of euploic acid (1) as an effective anti-inflammatory agent. This study contributes to the structural elucidation of a new phenylpropanoid derivative and highlights its promising anti-inflammatory activity in the treatment of inflammatory disorders.

Keywords: Boraginaceae, phenolic acid, anti-inflammatory, structure elucidation

Introduction

The Boraginaceae family encompasses a significant group of plants that have garnered medicinal interest due to their diverse secondary metabolites. Various compounds, such as terpenoids, naphthoquinones, flavonoids, phenylpropanoids, alkaloids, and lignans, have been isolated from different species within this family.¹⁻³ These compounds have exhibited a wide range of biological activities, including antitumor, antiulcer, antimicrobial, antifungal, larvicidal, anti-inflammatory,

analgesic, antileishmanial, and antidepressant properties.⁴⁻⁶ Among the Boraginaceae genera, *Euploca* comprises approximately 100 species and is predominantly found in South America and Mexico.⁷

Euploca procumbens (syn. *Heliotropium procumbens*) is widely distributed throughout various phytoecographic domains in Brazil, including the Amazon, Cerrado, Caatinga, and Atlantic Forest regions.⁸ In local communities, this species is referred to as “*borragem cinzenta*” in Bahia and “*erva azul*” in Pernambuco. Ethnomedicinal studies have reported the presence of steroids and pyrrolizidine alkaloids, namely heliotrine, indicine, indicinine, and supinine, in *E. procumbens*.⁹ However, there is still a lack of scientific studies focused on the isolation and

*e-mail: josean@lff.ufpb.br

Editor handled this article: Brenno A. D. Neto



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

10- SOUZA, RAFAEL LIMONGI DE ; OPRETZKA, LUÍZA CAROLINA FRANÇA ; MORAIS, MAYARA CASTRO DE ; MELO, CAMILA DE OLIVEIRA ; OLIVEIRA, BRUNNA EMANUELLY GUEDES DE ; SOUSA, DAMIÃO PERGENTINO DE ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA ; OLIVEIRA, ELQUIO ELEAMEN .

Nanoemulsion Improves the Anti-Inflammatory Effect of Intraperitoneal and Oral Administration of Carvacryl Acetate. PHARMACEUTICALS, v. 17, p. 17, 2024.



pharmaceuticals



Article

Nanoemulsion Improves the Anti-Inflammatory Effect of Intraperitoneal and Oral Administration of Carvacryl Acetate

Rafael Limongi de Souza ¹, Luíza Carolina França Opretzka ², Mayara Castro de Moraes ³, Camila de Oliveira Melo ¹, Brunna Emanuella Guedes de Oliveira ¹, Damião Pergentino de Sousa ³, Cristiane Flora Villarreal ² and Elquio Eleamen Oliveira ^{1,*}

¹ Laboratory of Synthesis and Drug Delivery, State University of Paraíba, Rua Horácio Trajano, SN, João Pessoa 58071-160, PB, Brazil

² Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, 147, Ondina, Salvador 40170-115, BA, Brazil; cfv@ufba.br (C.F.V.)

³ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-970, PB, Brazil; damiao_desousa@yahoo.com.br (D.P.d.S.)

* Correspondence: elquioeleamen@servidor.uepb.edu.br; Tel.: +55-83-3223-1128

Abstract: Carvacryl acetate (CA) is a monoterpene obtained from carvacrol, which exhibits anti-inflammatory activity. However, its low solubility in aqueous media limits its application and bioavailability. Herein, we aimed to develop a carvacryl acetate nanoemulsion (CANE) and assess its anti-inflammatory potential in preclinical trials. The optimized nanoemulsion was produced by ultrasound, and stability parameters were characterized for 90 days using dynamic light scattering after hydrophilic-lipophilic balance (HLB) assessment. To evaluate anti-inflammatory activity, a complete Freund's adjuvant-induced inflammation model was established. Paw edema was measured, and local interleukin (IL)-1 β levels were quantified using ELISA. Toxicity was assessed based on behavioral changes and biochemical assays. The optimized nanoemulsion contained 3% CA, 9% surfactants (HLB 9), and 88% water and exhibited good stability over 90 days, with no signs of toxicity. The release study revealed that CANE followed zero-order kinetics. Dose-response curves for CA were generated for intraperitoneal and oral administration, demonstrating anti-inflammatory effects by both routes; however, efficacy was lower when administered orally. Furthermore, CANE showed improved anti-inflammatory activity when compared with free oil, particularly when administered orally. Moreover, daily treatment with CANE did not induce behavioral or biochemical alterations. Overall, these findings indicate that nanoemulsification can enhance the anti-inflammatory properties of CA by oral administration.

Keywords: anti-inflammatory effect; carvacrol derivative; carvacryl acetate; essential oil; oral administration; nanoemulsion



Citation: Souza, R.L.d.; Opretzka, L.C.F.; Moraes, M.C.d.; Melo, C.d.O.; Oliveira, B.E.G.d.; Sousa, D.P.d.; Villarreal, C.F.; Oliveira, E.E. Nanoemulsion Improves the Anti-Inflammatory Effect of Intraperitoneal and Oral Administration of Carvacryl Acetate. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 17. <https://doi.org/10.3390/ph17010017>

Academic Editor: Guendalina Zucconi

Received: 21 November 2023

Revised: 5 December 2023

Accepted: 15 December 2023

Published: 21 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

It is well-established that chronic inflammatory diseases are one of the most significant causes of mortality worldwide, and a considerable proportion of adult deaths are related to diseases exhibiting inflammatory patterns, such as heart disease, stroke, cancer, diabetes mellitus, chronic kidney disease, and neurodegenerative conditions, according to the latest Global Health Metrics (GBD 2020) [1]. Pharmacological therapies for inflammatory diseases include nonsteroidal and steroidal anti-inflammatory drugs. However, in addition to controlling inflammation, chronic use of these drugs can cause foregut symptoms, peptic ulcers, small bowel enteropathy, and metabolic and endocrine disorders [2–6].

Current research endeavors are focused on developing new drugs with improved safety profiles and novel solutions. Medicinal chemistry has been widely applied as a strategy for drug development, including the use of semisynthesis of natural sources [7–9]. Carvacrol is a phenolic monoterpene found in the aerial parts of plants of the genus

RESUMOS EXPANDIDOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS /**APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSOS**

1. COSTA, C. M. M.; SANTOS, D. S. ; EVANGELISTA, A. F. ; SILVA, G. S. A. ; OPRETZKA, L. C. F. ; SOARES, M. B. P. ; VILLARREAL, C. F. . MECHANISMS INVOLVED IN THE ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF BONE MARROW MESENCHYMAL AND BONE MARROW MONONUCLEAR STEM CELLS ON EXPERIMENTAL TRIGEMINAL NEURALGIA. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Terapia Celular e Transplante de Medula Óssea, 2022, São Paulo. Proceedings of XXVI Anual Meeting of Brazilian Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy. Rio de Janeiro: Brazilian Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy, 2022. v. 3. p. 20-20
2. SANTOS, S. S. ; CORREIA, J. P. S. ; OPRETZKA, L. C. F. ; LOPES, D. L. ; LIMA, ALYNE ALMEIDA DE ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA ; VIANA, M. D. M. . Mecanismos envolvidos nos efeitos antinociceptivos de cepa probiótica sobre a neuropatia diabética experimental. 2023. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. CRUZ, A. B. O. ; OPRETZKA, L. C. F. ; VIANA, M. D. M. ; DE SOUZA, THALISSON AMORIM ; TAVARES, JOSEAN FECHINE ; SCOTTI, MARCUS TULLIUS ; VILLARREAL, C. F. . Cleomina exerce efeitos antinociceptivos mediados por receptores GABA B e muscarínicos. 2023. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. COSTA, C. M. M.; SANTOS, D. S. ; EVANGELISTA, A. F. ; SILVA, G. S. A. ; OPRETZKA, LUIZA CAROLINA FRANÇA ; SOARES, M. B. P. ; VILLARREAL, CRISTIANE FLORA . Mechanisms involved in the antinociceptive effect of bone marrow mesenchymal and bone marrow mononuclear stem cells on experimental trigeminal neuralgia. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. NASCIMENTO, Y. M. ; DOS SANTOS, GEORGE LUÍS DIAS ; ANDRADE, R. S. ; OPRETZKA, L. C. F. ; VILLARREAL, CRISTIANE F. ; TAVARES, J. F. ; DA SILVA, MARCELO SOBRAL . Ácido Euploico, novo fenilpropanoide com potencial anti-inflamatório isolado de *Euploca procumbens*. 2022. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
6. OPRETZKA, L. C. F.; FREITAS, H. F. ; ESPÍRITO-SANTO, RENAN FERNANDES DO ; NASCIMENTO, O. A. ; ALVES, IURA MUNIZ ; ABREU, L. S.; VELOZO, E. S. ; CASTILHO, M. S. ; VILLARREAL, C. F. . In silico and in vivo approaches on understanding the mechanism of action of a natural chromone. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

PATENTES DEPOSITADAS

1. LEMOS, P. V. F. ; OPRETZKA, L. C. F. ; CARDOSO, L. G. ; SOUZA, C. O. ; SILVA, J. B. A. ; COUTO, R. D. ; VILLARREAL, C. F. ; DRUZIAN, J. I. .
PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE COMPÓSITO MICROENCAPSULADO PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA DE CFICOCIANINA UTILIZANDO AMIDO DE BATATA RETICULADO COMO MATERIAL DE REVESTIMENTO E PRODUTO OBTIDO. 2020, Brasil.Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202001475, título: "PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE COMPÓSITO MICROENCAPSULADO PARA LIBERAÇÃO PROLONGADA DE CFICOCIANINA UTILIZANDO AMIDO DE BATATA RETICULADO COMO MATERIAL DE REVESTIMENTO E PRODUTO OBTIDO" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 20/07/2020
2. FONSECA, P. P. ; PEREIRA, N. P. ; VILLARREAL, C. F. ; OPRETZKA, L. C. F. .
PROCESSO DE FORMULAÇÃO, APLICAÇÃO E USO DE INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO OBTIDO A PARTIR DA ASSOCIAÇÃO DE ÓLEOS FIXOS DE SEMENTES DE PASSIFLORAS COM PRÓPOLIS VERMELHA. 2023, Brasil.Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202302149, título: "PROCESSO DE FORMULAÇÃO, APLICAÇÃO E USO DE INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO OBTIDO A PARTIR DA ASSOCIAÇÃO DE ÓLEOS FIXOS DE SEMENTES DE PASSIFLORAS COM PRÓPOLIS VERMELHA" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 17/10/2023