

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

FELIPE RODRIGUES DE CARVALHO

**USO DE CÉLULAS TRONCO EM LESÃO DO NERVO CIÁTICO INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR: TRATAMENTO DA DOR
NEUROPÁTICA E REGENERAÇÃO NERVOSA.**

CAMPOS DOS GOYTACAZES

JUNHO 2024

FELIPE RODRIGUES DE CARVALHO

**USO DE CÉLULAS TRONCO EM LESÃO DO NERVO CIÁTICO INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR: TRATAMENTO DA DOR
NEUROPÁTICA E REGENERAÇÃO NERVOSA.**

Dissertação apresentada ao Centro de
Ciência da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
requisito para obtenção do grau de
mestre.

Orientadora: Prof. Fernanda Antunes

Coorientador: Fabio Ferreira de Queiroz

CAMPOS DOS GOYTACAZES

JUNHO 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C331 Carvalho, Felipe Rodrigues de.

USO DE CÉLULAS TRONCO EM LESÃO DO NERVO CIÁTICO INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR : TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA E
REGENERAÇÃO NERVOSA. / Felipe Rodrigues de Carvalho. - Campos dos Goytacazes, RJ,
2024.

44 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2024.
Orientadora: Fernanda Antunes.

1. Axotomia parcial . 2. células tronco mesenquimais . 3. alodínia mecânica. I.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 636

FELIPE RODRIGUES DE CARVALHO

**USO DE CÉLULAS TRONCO EM LESÃO DO NERVO CIÁTICO INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE EM RATOS WISTAR: TRATAMENTO DA DOR
NEUROPÁTICA E REGENERAÇÃO NERVOSA.**

Dissertação apresentada ao Centro de
Ciência da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
requisito para obtenção do grau de
mestre.

Aprovada 20 de Junho de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adriana Jardim (Doutora, Produção Animal) – UENF

Prof. Fabio Ferreira de Queiroz (Doutor, Ciência Animal) – UENF

Prof. Josias Alves Machado (Doutor, Biologia Molecular) – UENF

Prof. Fernanda Antunes (Pós doutora, Farmacologia Básica) – UFRJ
(ORIENTADORA)

RESUMO

O trabalho avaliou a resposta da lesão do nervo ciático induzida experimentalmente em ratos Wistar ao tratamento com células tronco mesenquimais. O modelo de dor desenvolvido foi denominado axotomia parcial do nervo espinhal (APNE).

Foram avaliados, a resposta clínica da dor neuropática através do teste de Von Frey com a utilização do analgesímetro digital, e a regeneração tecidual com análise histológica do nervo lesionado ao final do experimento.

Os animais apresentaram melhora clínica expressiva evidenciando o controle da dor neuropática e a análise histológica indicam processo de regeneração.

Foi utilizado o software Graph Pad Prism versão 6.0 para a análise das variáveis quantitativas, e uma Análise de Variância (ANOVA) one-way, com posterior teste de média Newmann-Keuls, Tukey e t de Student, dependendo de cada caso, respeitando-se um $p < 0,05$ (99,95% de confiabilidade).

ABSTRACT

The work evaluated the response of experimentally induced sciatic nerve injury in Wistar rats to treatment with mesenchymal stem cells. The pain model developed was called partial spinal nerve axotomy (PNAP).

The clinical response to neuropathic pain was evaluated using the Von Frey test using a digital analgesimeter, and tissue regeneration with histological analysis of the injured nerve at the end of the experiment.

The animals showed significant clinical improvement, showing control of neuropathic pain and histological analysis indicates a regeneration process.

The Graph Pad Prism version 6.0 software was used to analyze quantitative variables, and a one-way Analysis of Variance (ANOVA), with subsequent Newmann-Keuls, Tukey and Student's mean tests, depending on each case, respecting $p < 0.05$ (99.95% reliability).

SUMÁRIO

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
2. HIPÓTESE	9
3. JUSTIFICATIVA	9
4. OBJETIVOS	10
OBJETIVOS GERAIS	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
5. REVISÃO DE LITERATURA	11
Fisiopatologia da dor	11
Dor neuropática	15
Sensibilização periférica na dor neuropática	17
Sensibilização central	19
Modelo de dor	20
Modelo por Axotomia Parcial do Nervo Espinhal (APNE)	20
Fármacos para controle da dor neuropática	21
Uso de células tronco	22
6. MATERIAIS E MÉTODOS	23
Modelo por Axotomia parcial do nervo espinhal (APNE)	24
Avaliação do modelo da dor neuropática	25
Alodínia mecânica	25
Eutanásia	27
Análise estatística	27
7. RESULTADOS	28
Grupo controle	28
Pós-operatório:	29
8. CONCLUSÕES	36
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma condição clinicamente importante, que resulta em sofrimento e afeta a qualidade de vida dos animais. Foi conceituada pela primeira vez em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como uma experiência sensorial ou emocional desagradável, que está associada a lesões reais ou potenciais. O termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de sinais, no sistema nervoso, que se originam em receptores sensoriais (nociceptores) e que fornecem informações relacionadas ao dano tissular. Baseado nestes conceitos, o termo dor seria melhor aplicado a seres humanos do que aos animais, pelo fato deste termo envolver um componente emocional. Apesar dessa diferença relevante e significativa na definição, o termo dor é usado igualmente em animais e seres humanos, tanto pela comunidade médica como pelo público leigo (HELLEBREKERS, 2002).

A exposição da pele ou qualquer outro órgão a estímulos potencialmente nocivos induz à sensação desagradável, informando o indivíduo sobre o perigo real ou potencial para sua integridade física. Portanto, a informação processada pode ser diferenciada como dor fisiológica ou dor patológica (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; ALMEIDA et al, 2006).

A dor fisiológica é aquela que induz respostas protetoras, como o reflexo de retirada (ou reação de fuga), com intuito de interromper a exposição ao estímulo nocivo. Este sinal é típico da dor aguda produzida por estímulos intensos na superfície da pele. A dor visceral e a dor somática profunda são causadas por estímulos inevitáveis e apresentam respostas adaptativas específicas, geralmente são subagudas e podem vir acompanhadas de respostas autonômicas ou comportamentais específicas (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; HELLEBREKERS, 2002).

Embora a inatividade temporária e o comportamento protetor como resposta à dor subaguda possam trazer benefícios, a dor persistente pode levar a um estado de depressão semelhante ao desencadeado por estímulos estressantes inevitáveis, não podendo ser considerada como uma resposta adaptativa. Estados dolorosos prolongados estimulam persistentemente os aferentes nociceptivos induzindo alterações que aumentam os efeitos deletérios da dor crônica, introduzindo então o conceito de dor patológica. Enquanto a dor aguda é um sintoma de alguma doença, a dor crônica é uma doença propriamente dita, sendo nociva e independente ao

estímulo que a gerou (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; HELLEBREKERS, 2002).

A dor persistente pode ser subdividida segundo sua origem em nociceptiva e neuropática. A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação. A dor neuropática ou neurogênica origina-se devido a lesões de nervos periféricos ou do sistema nervoso central (FANTONI e MASTROCINQUE, 2002; ALMEIDA et al, 2006).

A percepção da dor para os animais é uma experiência sensorial e emocional ruim que os leva a adquirir um comportamento protetor específico para a sua espécie e pode modificar o comportamento social, causando alterações fisiológicas, como: vocalização, alterações posturais, tremores, agitação, depressão, perturbações nos ciclos de sono, inapetência, agressividade, aumento das frequências respiratórias e cardíaca, elevação da pressão arterial, midríase, salivação, supressão do sistema imunológico e alterações do sistema endócrino (DAY, 2008; DUNNING et al, 2005; LORENZ et al. 2011; MEIJ et al, 2010). O

tratamento analgésico minimiza os efeitos adversos no sistema cardiovascular, incluindo arritmias cardíacas, além dos efeitos nos sistemas nervoso, endócrino e imunológico (SHAFFRAN, 2008), assim, a gestão eficaz da dor é parte vital da prorrogação da qualidade de vida adequada e faz parte do tratamento ético (NORTH & BANKS, 2009).

O tratamento da dor neuropática costuma ser difícil e muitas vezes desapontador. Os analgésicos anti-inflamatórios não esteroidais praticamente não funcionam e geralmente nem devem ser prescritos (GALVÃO, 2005). Dessa forma, destaca-se a necessidade de descobrir novos agentes analgésicos que atuem de forma mais eficiente e tolerável pelo paciente.

As células-tronco representam uma unidade natural de desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual. Caracterizam-se por suas propriedades de autorrenovação e por sua capacidade de gerar linhagens celulares diferenciadas. São classificadas em pluripotentes, multipotentes e adultas. As pluripotentes ou embrionárias fazem parte do estágio inicial, sendo assim, são capazes de se transformar em qualquer célula, podendo gerar qualquer tecido do organismo. Dessa forma, pretende-se utilizar células tronco pluripotentes nos ratos diabéticos e avaliar como se comportam e a evolução da doença.

Portanto, esse trabalho tem como objetivo reproduzir o modelo de dor neuropática para a utilização de células-tronco pluripotentes na tentativa de promover a regeneração da lesão neurológica e com isso, também criar uma possibilidade de tratamento para o controle da dor.

2. HIPÓTESE

As células tronco mesenquimais serão capazes de regenerar de forma parcial ou total o tecido lesionado experimentalmente gerando melhora clínica nos animais testados, se apresentando assim como alternativa eficaz para o tratamento da dor neuropática;

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, existe uma conscientização evidente da presença (potencial) da dor e de suas consequências negativas para o bem-estar e o estado geral da saúde do animal. Isto atribui aos veterinários uma responsabilidade clara para tentarem proporcionar um alívio adequado da dor nos animais sob seus cuidados (HELLEBREKERS, 2002).

Segundo Mathews (2008), a dor neuropática não tem qualquer propósito vantajoso para o animal e pode ser encarada como uma doença por si só, o que nos conduz a busca por melhores métodos e fármacos para controle dessa dor, pois como já foi dito, as classes de fármacos atualmente utilizadas possuem eficácia limitada neste tipo de tratamento.

Além dos fatores anteriormente indicados, este trabalho justifica-se pela possibilidade de estabelecimento de novas alternativas de regeneração nervosa e controle da dor neuropática, e para isso pretende-se reproduzir o modelo experimental de dor neuropática.

Dessa forma, foi feito um convênio com outros laboratórios para o uso das células tronco no tratamento e regeneração da lesão induzida e controle da dor.

4. OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

- Reproduzir o modelo de dor neuropática utilizando axotomia parcial do nervo espinhal (APNE), onde se origina o nervo ciático, na altura dos processos transversos de L5 e L6. Desta forma, pretende-se mimetizar a dor neuropática para utilização em testes de novos fármacos comparando com a utilização de células tronco na regeneração e com isso, a resolução da dor;
- Utilizar células tronco na regeneração nervosa;

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia do modelo de dor desenvolvido, axotomia parcial do nervo espinhal (APNE);
- Avaliar a resposta clínica dos animais após o tratamento da lesão nervosa com células tronco mesenquimais através do teste de Von Frey;
- Avaliar se ocorreu regeneração do nervo lesionado após o tratamento com células tronco mesenquimais através de análise histológica;

5. REVISÃO DE LITERATURA

FISIOPATOLOGIA DA DOR

Os nervos periféricos podem ser considerados como uma extensão do Sistema nervoso central (SNC), consistindo de fibras nervosas sensoriais, motoras e autônomas. São condutores elétricos sobre os quais as informações sensoriais e motoras são transmitidas. Os terminais nervosos das fibras nervosas sensoriais reconhecem e transformam vários estímulos ambientais em sinais elétricos (potenciais de ação) que são transmitidos ao corno dorsal do SNC, onde são alterados e retransmitidos ao tronco cerebral e ao cérebro que interpreta e produz a sensação de dor (MUIR III, 2009) (Figura 1). Estes terminais nervosos são terminações livres, não mielinizadas chamados de nociceptores (PATEL, 2010).

A classificação de um nociceptor é baseada na classificação da fibra nervosa e sua extremidade terminal. Existem dois tipos de fibras nervosas: uma de pequeno diâmetro, não mielinizada que conduz o impulso nervoso de forma lenta (7,2 km/h) chamada de fibras C, e outra de diâmetro maior, levemente mielinizada e que conduz impulsos nervosos de forma rápida (72 km/h) chamadas de fibra A δ . Os nociceptores das fibras C respondem a vários estímulos como térmico, mecânico e estímulos químicos. Já os nociceptores das fibras A δ são de dois tipos e respondem a estímulos mecânicos e mecanotérmicos (PATEL, 2010).

A sensação de dor é composta por duas categorias: uma dor primária, rápida, forte e aguda e depois uma dor secundária, lenta e contínua. Esse padrão é explicado pela diferença da velocidade de propagação do impulso nervoso nos dois tipos de fibras nervosas descritas anteriormente. O impulso nervoso de rápida condução dos nociceptores das fibras A δ produz a sensação da dor primária, enquanto os nociceptores das fibras C produzem a sensação da dor secundária (BEAR et al, 2008; PATEL, 2010).

O corno dorsal da medula espinhal (CDME), local onde os neurônios fazem suas sinapses é subdividido em camadas (lâminas) distintas de acordo com as características citológicas de seus neurônios. A maioria dos neurônios da lâmina I responde exclusivamente por interneurônios excitatórios e inibitórios, alguns dos quais respondem somente a aferências nociceptiva. As lâminas III e IV contêm neurônios que recebem aferências de fibras A β , respondendo predominantemente a

estímulos não nocivos. A lâmina V recebe aferências de fibras A β , A δ , C e também de estruturas viscerais (PURVES et al, 2005).

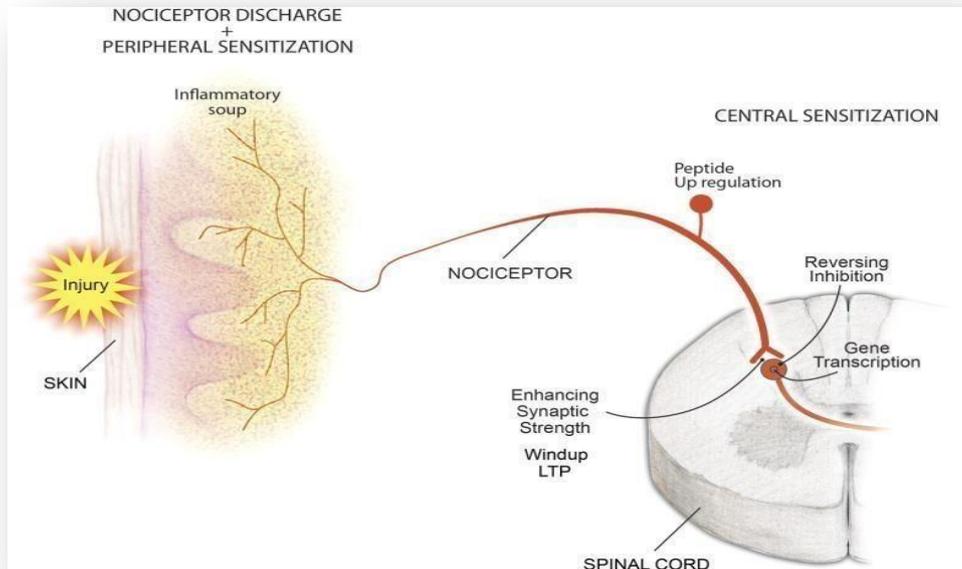


Figura 1: Esquema representativo da transdução da injúria pelo nociceptor e condução do sinal elétrico até o corno dorsal da medula espinhal onde ocorre a modulação da dor.

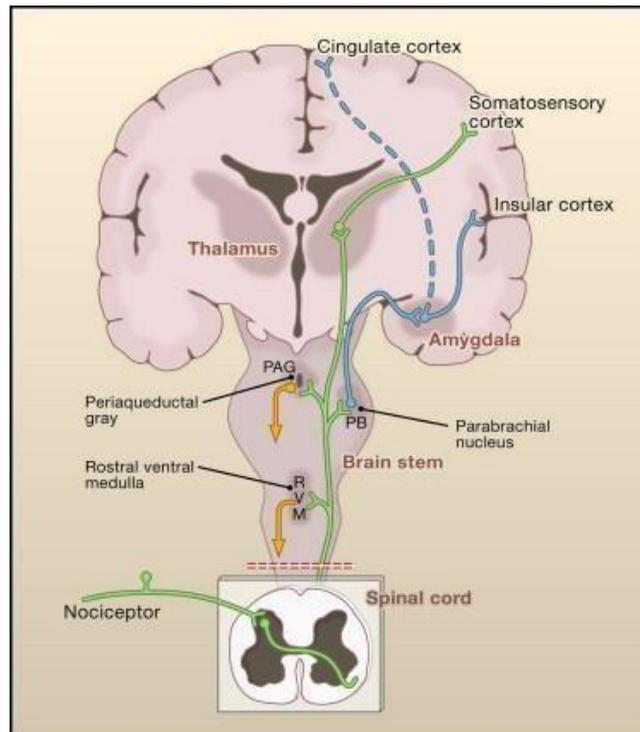


Figura 2: Esquema representativo da transdução da injúria pelo nociceptor; condução do sinal elétrico até o corno dorsal da medula espinhal onde ocorre a modulação da dor e posteriormente a condução do sinal elétrico até a córtex cerebral, área de percepção da dor.

A transmissão sináptica entre as fibras aferentes primárias e neurônios do CDME é mediada por neurotransmissores, aminoácidos excitatórios, aminoácidos e receptores inibitórios e receptores excitatórios (MUIR III, 2009).

Quando se produz uma lesão em um tecido, ocorre liberação local e difusa de íons K^+ e H^+ , ATP, prostaglandinas, bradicininas e fatores de crescimento dos nervos, ativando assim os nociceptores periféricos. A resposta inflamatória produzida ativa os mastócitos, linfócitos, neutrófilos os quais liberam substâncias vasoativas como histamina e substância P, que sensibilizam ainda mais os nociceptores resultando em uma hiperalgesia primária. Os linfócitos, neutrófilos e macrófagos liberam citocinas (IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral α) formando uma “sopa de mediadores” amplificando a resposta de dor. Todos esses eventos são denominados sensibilização periférica (CRUCIANI & NIETO, 2006; MUIR III, 2009) (Figura 3).

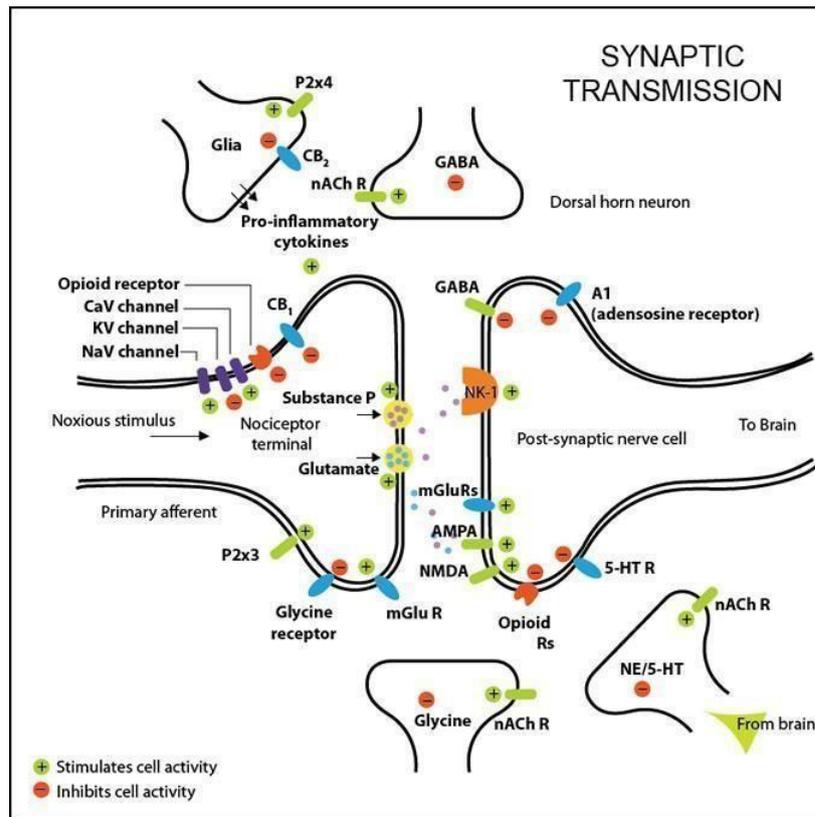


Figura 3: Esquema representativo da transmissão sináptica entre fibras aferentes primárias e neurônios do corno dorsal da medula espinhal (CDME), mostrando a liberação de marcadores e neurotransmissores da dor.

Após a hiperalgesia primária, desencadeia-se a hiperalgesia secundária. Esta ocorre em um tecido não lesionado em torno do local da lesão, devido à sensibilização central. A sensibilização se inicia por um estímulo doloroso crônico que ativa as fibras C, provocando a liberação de glutamato, substância P e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em terminais nervosos centrais. Isso resulta na ativação de receptores do AMPA, NMDA, tirosinoquinases, que aumentam a atividade de um grupo de moléculas sinalizadoras que alteram a expressão de genes, resultando em mudanças neuroquímicas (neuroplasticidade) na medula espinhal, o que faz com que todos os estímulos resultem em dor (MOALEM & TRACEY, 2006; MUIR III, 2009).

A informação sobre a dor é conduzida da medula espinhal ao encéfalo por meio de vias ascendentes da dor. As fibras A δ e C entram na medula espinhal pela raiz dorsal dos nervos espinhais e fazem suas sinapses nas lâminas específicas (PURVES et al, 2005; BEAR et al, 2008) (Figura 4). As informações nociceptivas recebidas pelos neurônios sensoriais periféricos seguem por neurônios do trato ascendente, que ativam o sistema tálamo- cortical, produzindo a consciência da sensação de dor (SCHAIBLE & RICHTER, 2004).

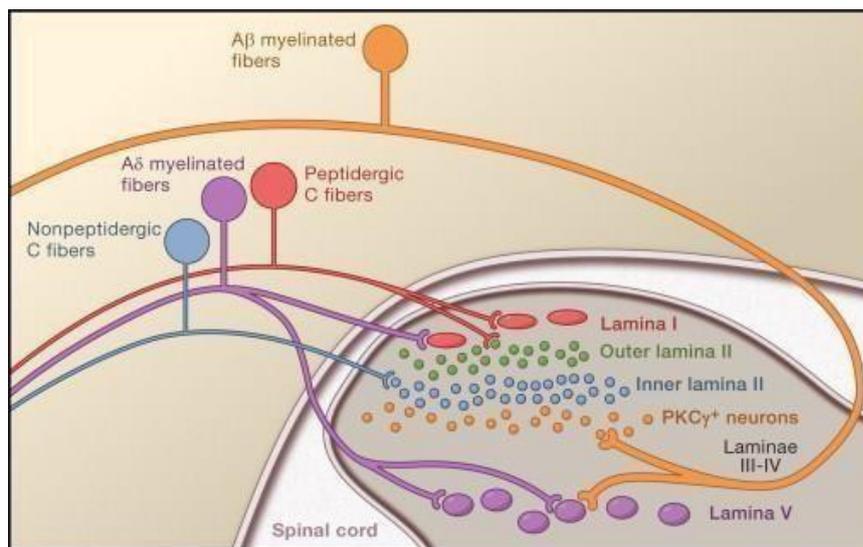


Figura 4: Esquema representativo da sinapse entre as diferentes fibras nervosas e as lâminas do corno dorsal da medula espinhal (CDME).

DOR NEUROPÁTICA

Originalmente, a dor neuropática foi utilizada para descrever apenas a dor proveniente de neuropatias periféricas e a dor central para lesões do sistema nervoso central (SCADDING, 2003). No entanto, definiu-se que a dor neuropática é uma dor crônica causada por uma consequência direta de lesão, ou disfunção, dos axônios ou corpo dos neurônios que cause interrupção da bainha de mielina tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (BACKONJA, 2003).

Têm-se descrito muitos tipos de dor neuropática e não se tem uma classificação que satisfaça totalmente. A mais frequentemente utilizada é a que se baseia na localização da geração da dor, tendo-se descrito dois tipos: dor de origem central e dor de origem periférica. Na dor de origem central, pode-se citar o acidente

cardiovascular e a esclerose múltipla. Na dor de origem periférica observa-se como exemplo, a neuropatia diabética e a induzida por agentes quimioterápicos (CRUCIANI & NIETO, 2006).

Um estudo avaliando aleatoriamente 6000 adultos procedentes de postos de saúde do Reino Unido observou-se uma prevalência de dor crônica de origem predominantemente neuropática de 8,2% (TORRANCE, 2005). No entanto, a prevalência da dor neuropática provavelmente aumentará no futuro, devido ao aumento da sobrevivência de paciente com doenças crônicas (câncer, infecções pelo vírus da imunodeficiência humana e diabetes) e ao envelhecimento populacional como a herpes zoster e diabetes (SCHESTATSKY, 2008).

Na medicina, a dor neuropática é comum na rotina clínica e causa prejuízos na qualidade de vida dos pacientes. As maiorias dos casos se enquadram em quatro grandes classes: 1- Lesão nervosa periférica focal e multifocal (traumática isquêmica ou inflamatória); 2- Polineuropatias periféricas generalizadas (tóxicas, metabólicas, hereditárias ou inflamatórias); 3- Lesões do SNC (acidente vascular cerebral, esclerose múltipla e lesão da coluna vertebral); 4- Complexos distúrbios neuropáticos (Complexo da síndrome da dor regional – CSRD) (BARON, 2006).

Na medicina veterinária, o maior foco para avaliação de lesão neurológica é após cirurgias ou traumas e se resume no déficit da função motora e sensitiva. No entanto, danos ou doenças dos axônios e da bainha de mielina prejudicam sua habilidade de conduzir impulsos nervosos, causando hipoestesia (sensação reduzida ao estímulo de dor) e dormência, juntamente com o déficit da função motora. No entanto, lesões nestes nervos podem também causar dor (MATHEWS, 2008).

As principais queixas se dividem em dores espontâneas (aquelas que aparecem sem nenhum estímulo detectável) e dores evocadas (respostas anormais ao estímulo) (SCHESTATSKY, 2008).

As dores espontâneas são descritas como parestesias e disestesias. A parestesia é uma sensação anormal não desagradável, como os formigamentos e os agulhamentos. Já a disestesia é uma sensação desagradável, normalmente de “queima” provocado provavelmente por descargas ectópicas em qualquer tipo de fibra nervosa. As dores evocadas são chamadas de hiperalgesia e alodinia. A hiperalgesia, também chamada de hiperpatia, é a resposta exagerada a um estímulo doloroso e a alodinia é uma dor produzida por um estímulo que normalmente não causa dor, como por exemplo, um leve toque na pele (WOOLF & MAX, 2001; WOOLF, 2014).

Essa diferença na qualidade e no padrão de alteração da sensibilidade dolorosa ocorre devida a uma reorganização da transmissão sensorial dentro do sistema nervoso após a lesão do nervo. Tais mudanças incluem alterações na expressão de neurotransmissores, neuromoduladores, receptores, canais de íons e proteínas estruturais (MATHEWS, 2008).

SENSIBILIZAÇÃO PERIFÉRICA NA DOR NEUROPÁTICA

No sistema nervoso periférico, após a ocorrência de um evento causador de lesão direta do nervo, ocorre primeiramente uma resposta inflamatória. A lesão no nervo resulta, além da inflamação, na degeneração Walleriana. Esses eventos induzem a ativação e migração de macrófagos e células de Schwann para o nervo e gânglio da raiz dorsal. O recrutamento e ativação destes macrófagos fazem com que as metaloproteases sejam ativadas interrompendo a barreira hemato-cefálica. Na sequência, mediadores vasoativos como o peptídeo relacionado ao agente da calcitonina (calcitonin gene-related peptide – CGRP), substância P, bradicininas e óxido nítrico são liberados no local da lesão causando hiperemia e inchaço, promovendo a invasão de monócitos e linfócitos T. Os monócitos são atraídos para o local da lesão pelas quimiocinas CCL2 (quimiocina ligante 2) e CCL3 (quimiocina ligante 3). Os macrófagos e mastócitos liberam prostaglandinas e citoninas IL - 1 β , IL- 6, IL- 18, TNF (fator de necrose tumoral) e o fator de inibição da leucemia (LIF). Todos estes fatores induzem a ativação das fibras nociceptivas (SCHOLZ & WOOLF, 2007).

As fibras A β , normalmente envolvidas na transmissão de impulsos não nocivos, são as que apresentam maior quantidade de impulsos ectópicos nas vigências de lesão em nervo periférico. Estas fibras enviam respostas exageradas para a medula espinhal e, associados à sensibilização central, contribuem para o desenvolvimento da dor espontânea, da hiperalgesia e da alodinia (SCHAIBLE & RICHTER, 2004). Esses impulsos ectópicos podem persistir por longos períodos de tempo e acredita-se que possam desempenhar um papel importante na iniciação e manutenção da dor neuropática (STACEY, 2005).

As descargas contínuas nas fibras C podem produzir sensações de queimação intermitente, enquanto que descargas espontâneas em fibras A β ou A δ podem produzir disestesias cortante ou parestesias (AMIR, 2002). Além disso, um neuroma pode ser formado no local da lesão. Descargas anormais ectópicas a partir de um neuroma parecem ser causadas por alterações intracelulares de diferentes subtipos de canais de sódio (MATZNER & DEVOR, 1994; BLACK et al, 2008). Isto leva ao aumento da frequência de disparo, possivelmente, resultando em não apenas dor espontânea, mas também a sensibilização central (STACEY, 2005).

Após lesão do nervo, além da inflamação descrita anteriormente, eventos envolvendo canais de sódio também são relatados. O aumento da atividade ectópica espontânea é acompanhado por um aumento da expressão do RNA mensageiro de genes que codificam canais de sódio, como o Nav1.3 (proteína do canal de sódio tipo 3) e Nav1.8 (proteína do canal de sódio tipo 8), nos neurônios aferentes primários. O Nav1.3 é um canal de sódio que, após lesão nervosa, se acumula ao redor de neurônios sensoriais e desempenha papel significativo no aumento da excitabilidade neuronal, contribuindo assim, para a dor neuropática (WOOD et al, 2004). LAI et al (2003) concluíram em seu estudo que o Nav1.8 é o canal que predominantemente está envolvido na abertura dos canais de sódio em condições fisiopatológicas da dor, e que a localização deste canal sugere que intervenções farmacológicas podem ajudar na terapia de neuropatias.

Esses canais de sódio não só acumulam no local da lesão do nervo periférico, mas também ao redor e dentro do gânglio da raiz dorsal (GRD) intacta. Assim os disparos ectópicos ocorrem no GRD quando atingem seu limiar (AMIR, 2002).

As desordens nos canais de sódio também foram relatadas como causa de dor neuropática. Um estudo utilizando microneurografia indicou atividade ectópica em fibras aferentes nociceptivas sem sinais de lesão direta no nervo, mas com sinais de anormalidade nos canais de sódio (ORSTAVIK & JORUM, 2010). Além dos canais de sódio, vários outros canais iônicos, sofrem alterações após lesão no nervo, como por exemplo, os canais de potássio. Um estudo em ratos testou o papel dos canais de cálcio e potássio na transmissão sensorial na medula espinhal e concluíram que os canais de potássio ao serem bloqueados provocaram um aumento no estímulo

nociceptivo. Estes resultados demonstram que esses canais têm importante papel no controle dos estímulos sensoriais para a medula espinhal (BAHIA et al, 2005).

Danos aos nervos periféricos também induzem a regulação de várias proteínas na membrana dos axônios aferentes primários. A capsaicina, por exemplo, é uma proteína expressa predominantemente pelas fibras aferentes nociceptivas, e possui receptores vaniloides (VR1) específicos nas terminações nervosas dos neurônios nociceptivos. Fisiologicamente, o VR1 é ativado por estímulos térmicos nocivos (>43°C) tornando-se o mediador da hiperalgesia térmica (CATERINA et al.,2000). Em estudo com ratos diabéticos, após lesão parcial do nervo periférico observou-se uma situação diferente: a lesão desencadeou uma baixa regulação do receptor VR1 nas fibras lesionadas, mas grande regulação em receptores nas fibras A e C intactas no CDME. Essa persistência de receptores VR1 em nervos próximos a lesão e em gânglios da raiz dorsal intactos pode ser crucial para o desenvolvimento ou manutenção da dor neuropática (HUDSON, 2001). Em pacientes com neuralgia pós-herpética, a aplicação tópica de capsaicina na série aumenta a sensação de dor, indicando sensibilidade anormal de VR1 na área afetada da pele, devido à expressão de novos receptores (PETERSEN et al, 2000). Há, portanto, evidências crescentes de que fibras não lesionadas que se misturam com fibras em degeneração podem participar da sinalização da dor expressando canais de sódio durante inflamação (WASNER et al, 2005) e como esses neurônios estão ainda conectados com seus órgãos alvo eles podem ter um papel crucial na geração da dor neuropática (BARON, 2006).

SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL

Como consequência da hiperexcitabilidade dos nociceptores periféricos mudanças secundárias ocorrem no CDME. O aumento da atividade neuronal propaga essa hiperexcitabilidade para os segmentos espinhais. Este evento é chamado de sensibilização central. Quando a sensibilização central é estabelecida normalmente, estímulos inócuos táteis são capazes de ativar na medula espinhal sinais dolorosos a partir de neurônios de baixo limiar como as fibras A δ e A β . Acredita-se ser esse o mecanismo responsável pelo fenômeno clínico da alodinia (SIDDAL & COUSINS, 1997; BRIDGES et al, 2001).

Experiências em animais têm-se concentrado no CDME como sendo o local de sensibilização central. Em roedores, no entanto, os neurônios são sensibilizados também no tálamo e no córtex somatossensorial após lesão parcial de nervo periférico (GUILBAUD et al, 1992).

MODELO DE DOR

Modelos experimentais de dor patológica têm sido desenvolvidos para permitir o estudo de mecanismos de estados de dor inflamatória e neuropática. O conhecimento da fisiopatologia desses modelos experimentais pode conduzir a uma melhor compreensão de condições de dor em humanos, e assim, trazer benefícios para as terapias (ANDERSEN, 1999).

Injúrias a nervos têm sido estudadas em animais há mais de 100 anos (BENNETT, 1993). Mas foram nos últimos 20 anos que desenvolveram muitos modelos animais de neuropatia periférica em ratos que mimetizam as manifestações fisiopatológicas e comportamentais vistas em humanos (BENNETT & XIE, 1988; KIM & CHUNG, 1992; SELTZER, 1990).

A dor neuropática crônica pode ser produzida por denervação parcial ou total de um membro, mas modelos nos quais o objetivo comportamental final é a automutilação são considerados desumanos. Em geral, são usados modelos que resultam em posições anormais do membro (claudicação) e retração alterada do membro em resposta a agravos mecânicos e térmicos (HELLEBREKERS, 2002).

No presente trabalho, optamos por desenvolver o modelo por axotomia parcial do nervo espinal por ser um modelo que mantém a dor neuropática por um período maior.

MODELO POR AXOTOMIA PARCIAL DO NERVO ESPINHAL (APNE)

O modelo de Axotomia parcial do nervo espinal consiste em realizar uma pequena incisão no nervo espinal na região entre L5 e L6. A grande maioria dos axônios que viajam no nervo ciático têm seus ramos centrais no quarto e quinto ramo da raiz lombar dorsal; uma pequena porcentagem tem seus axônios no terceiro e sextos ramos lombares.

Na APNE a lesão é criada ao nível do nervo espinhal (L5 e L6), onde raízes dorsal e ventral juntam-se distalmente dos gânglios das raízes dorsais, mas proximais ao plexo lombar onde os nervos espinhais separam-se em vários nervos periféricos. Uma das principais vantagens do modelo APNE é que os axônios não lesionados do nervo ciático são acessíveis através do quarto ramo da raiz lombar dorsal (BENNET et al. 2003).

FÁRMACOS PARA CONTROLE DA DOR NEUROPÁTICA

Estudos recentes mostram que a maioria dos pacientes tratados para dor neuropática recebe medicação de eficácia não demonstrada ou em subdoses da medicação apropriada (FINNERUP et al, 2001; RICHEIMER et al, 1997). A dor neuropática costuma responder pobremente aos analgésicos comuns, sendo os fármacos antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes os principais representantes no tratamento deste tipo de dor, seja de origem periférica ou central.

Tabela 1: Opções medicamentosas para tratamento de dores neuropáticas periféricas e centrais, modificado de Finnerup et al, (2005) e Beniczky et al, (2005).

Dor neuropática	Droga	NNT (IC 95%)	Doses recomendadas
Periférica	Tricíclicos	2.2 (1.9–2.6)	Até 150 mg/dia
	ISRS	6.8 (3.4–441)	Até 80 mg/dia
	Gabapentina	4.4 (3.4–6.2)	600 a 1200 mg 3x/dia
	Pregabalina	5.0 (3.5–8.6)	50 a 100mg 3x/dia
	Tramadol	3.9 (2.7–6.7)	200–400 mg/dia
	Oxicodona-CR	2.6 (1.9–4.1)	60–120 mg/dia
	Lidocaína tópica	4.4 (2.5–17.5)	Patch ou gel a 5% (12 h/dia)
	Carbamazepina	1.8 (1.4–2.7)	Até 1000 mg/dia
Central	Tricíclicos	4.0 (2.6–8.5)	Até 75 mg/dia
	Lamotrigina	2.9 (1.3–5.0)	Até 200 mg/dia
	Carbamazepina	3.4 (1.7–105)	Até 1000 mg/dia

NNT, Número de pacientes necessários para reduzir mais de 50% da intensidade da dor

IC, Intervalo de confiança

ISRS, Inibidor seletivo da recaptação da serotonina

USO DE CÉLULAS TRONCO

As células-tronco estromais multipotentes, também chamadas de células-tronco mesenquimais (CTM), são células progenitoras não hematopoiéticas encontradas em todos os tecidos adultos. Em medicina veterinária as principais fontes para obtenção das CTM são o tecido adiposo e a medula óssea (PECK, 2011; LIEW et al., 2026).

As CTM têm grande capacidade de multiplicação e diferenciação tanto in vivo como in vitro, sendo elas as responsáveis pela reparação e reposição dos tecidos de origem mesodermal, como por exemplo a pele, ossos, cartilagem, tendões e ligamentos (PECK, 2011; LIEW et al., 2026).

O efeito terapêutico das CTM já é bem descrito em diversos estudos científicos tanto na medicina veterinária como em humanos e se baseia em três princípios de ação:

- 1- Reposição tecidual pela diferenciação celular;
- 2- Imunomodulação e efeito anti-inflamatório;
- 3- Efeito paracrino pela secreção de moléculas bioativas.

No tratamento, as células-tronco são atraídas para o processo inflamatório e liberam os chamados biofatores. Por serem indiferenciadas (capazes de exercer várias funções), elas podem se transformar em alguns tipos de célula e, principalmente, liberar citocinas e fatores de crescimento que promovem a recuperação dos tecidos, melhora o funcionamento do microambiente celular e proporcionam qualidade de vida ao animal (PECK, 2011; LIEW et al., 2026).

A célula-tronco é um produto e, por isso, deve ter registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para que possa ser utilizada na prática clínica. O laboratório que produz as células-tronco também precisa ser registrado no Mapa e, adicionalmente, no Conselho Regional de Medicina Veterinária (CRMV) do estado de atuação, seguindo as diretrizes da Resolução CFMV nº 1.041/2013.

Com a finalidade de orientar os médicos-veterinários, em 2020, o Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) regulamentou a terapia ([Resolução CFMV nº 1.363](https://www.cfmv.gov.br/terapia-com-celulas-tronco-em-animais-o-que-diz-a-regulamentacao/comunicacao/noticias/2022/02/09/)) com as orientações sobre a indicação, a prescrição e o uso de células-tronco em animais. A norma recomenda que os profissionais contem com respaldo técnico que indique segurança e eficácia para o tratamento da doença, além da dose e via indicada, seja de forma isolada, adjuvante ou complementar (<https://www.cfmv.gov.br/terapia-com-celulas-tronco-em-animais-o-que-diz-a-regulamentacao/comunicacao/noticias/2022/02/09/>)

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes foram realizados em ratos wistar machos e fêmeas (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 e 300g, visando observar se existe diferença no modelo da dor neuropática entre machos e fêmeas. Após a lesão proposta, foram utilizadas células tronco mesenquimais pluripotentes de cães, cedidos pela CELLEN¹, e os animais distribuídos da seguinte forma:

Grupo 1: 6 machos submetidos ao procedimento de Axotomia parcial do nervo espinhal e tratados com células tronco pluripotentes, contendo 1 milhão de células por ml.

Grupo 2: 6 fêmeas submetidas ao procedimento de Axotomia parcial do nervo espinhal e tratados com células tronco pluripotentes, contendo 1 milhão de células por ml.

Os animais foram mantidos num ambiente com temperatura controlada a 19 °C e umidade de 50 a 60%, ficando em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e comida foram disponibilizadas para os animais sem restrição. Antes de iniciar os experimentos, os animais foram aclimatados no laboratório durante pelo menos 60 minutos.

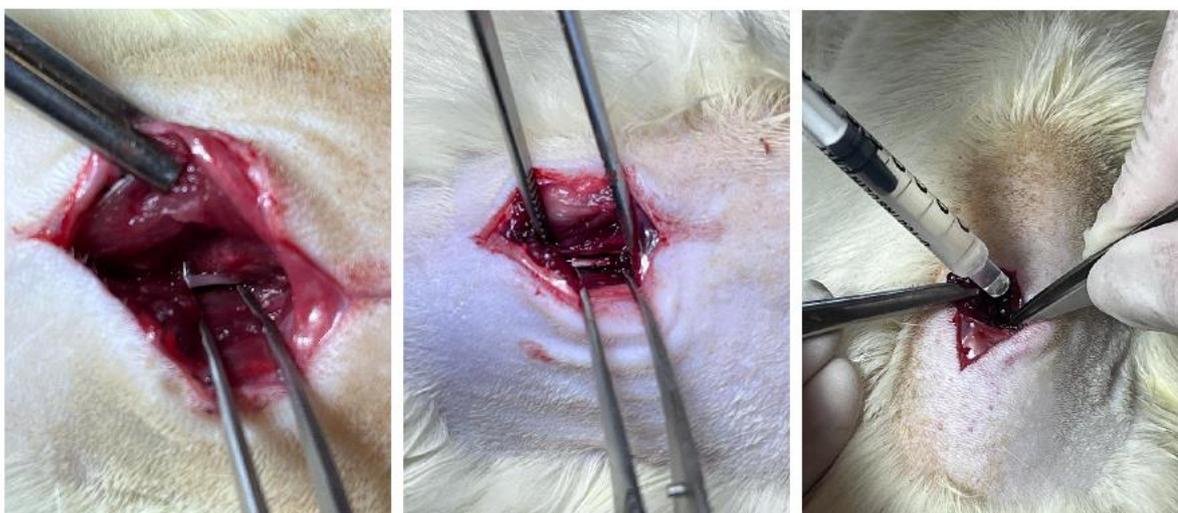
¹ Célula-tronco veterinária - Centro de Ciências da Saúde (UFRJ) - Rio de Janeiro - RJ.

MODELO POR AXOTOMIA PARCIAL DO NERVO ESPINHAL (APNE)

Para este modelo foram utilizados 12 ratos Wistar, sendo seis fêmeas e seis machos, pesando entre 250 e 300g (n=6), que foram submetidos à anestesia pela associação de cetamina na dose de 100 mg/kg e xilazina na dose de 50 mg/kg, injetado pela via intraperitoneal, e posteriormente os animais foram posicionados em decúbito esternal.

Após tricotomia e antissepsia, foi realizada uma incisão de pele ao lado do processo espinhal do lado direito da coluna, dissecando-se o sub-cutâneo e os músculos paraespinhais, cuidadosamente separando-os na região das vértebras L5 a S1. O processo transverso de L6 foi removido (laminectomia) para a visualização dos nervos espinhais L4 e L5, os quais também foram cuidadosamente separados para que fosse feita uma pequena incisão em L5 interrompendo assim parte dos axônios no nervo. Após o procedimento, as células tronco foram “instiladas” sobre a lesão nervosa. Para finalizar, os músculos paraespinhais e a pele foram suturados, com fio inabsorvível em pontos simples separados (Figura 6).

Logo após o procedimento espera-se uma mudança no posicionamento do membro, onde o animal evita apoiar o peso sobre o membro pélvico direito e o limiar de dor diminui. Dessa forma, considera-se o animal com dor neuropática (Figura 7).



Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 6: (A) Exposição do nervo ciático na altura de L5 para a realização do modelo APNE; e (B) Realização do modelo APNE; (C) Administração das Células Tronco (Arquivo Pessoal)

AVALIAÇÃO DO MODELO DA DOR NEUROPÁTICA

ALODÍNIA MECÂNICA

Para avaliar modificações na sensação e no desenvolvimento da alodínia mecânica, utilizamos o aparelho analgesímetro digital, versão digitalizada dos filamentos de Von Frey. Este teste tem como objetivo avaliar mudanças na sensibilidade tátil em resposta a um estímulo mecânico resultantes de um dano neural. O uso de filamentos de Von Frey (1986) é um método para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico bastante utilizado clinicamente. Entretanto, tal método passou a ser utilizado também para experimentos laboratoriais, no sentido de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais. Mais ainda, essa técnica foi transformada em um método eletrônico usado primeiramente em humanos (JENSEN et al, 1986) e posteriormente em ratos (MÖLLER et al, 1998) (Figura 7).

Este aparelho possui um braço transdutor de força ligado a um pino sensor, através do qual é realizada uma força de intensidade crescente contra a superfície plantar do membro pélvico do animal para que seja determinado o limiar de retirada do membro. Os estímulos são repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de “*flinch*” (resposta caracterizada como sacudida) após a retirada do membro. A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na pressão (D de reação em gramas) obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observada antes do procedimento experimental (0 hora) e da média de três valores em gramas (força) após a administração dos estímulos, que variam de acordo com o experimento.

O analgesímetro digital registra automaticamente a força máxima (g) na qual o animal responde ao estímulo.

Este teste é realizado antes da realização dos procedimentos cirúrgicos (avaliação controle), onde obtemos a média de três avaliações, com intervalos superiores a 30 minutos entre elas. Posteriormente, sete dias após a realização dos procedimentos cirúrgicos com a finalidade de determinar se os mesmos foram capazes de mimetizar a dor neuropática em ratos; procedimento este realizado

também se obtendo a média entre três avaliações, com intervalos superiores a 30 minutos entre elas. Após realização da técnica e o tratamento com as células tronco, foram feitas avaliações semanais para avaliação da recuperação da lesão induzida experimentalmente.

Desta forma, após sete dias da realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram colocados em caixas acrílicas individuais para aclimatização por 20 a 30 minutos antes do início do teste. Após este período, foram determinados os limiares de retirada dos dois membros pélvicos, da mesma forma como descrito anteriormente, fazendo uma média de três valores obtidos. Se os valores forem menores aos observados antes dos procedimentos cirúrgicos, ou seja, na avaliação controle, é considerada a presença da dor neuropática.

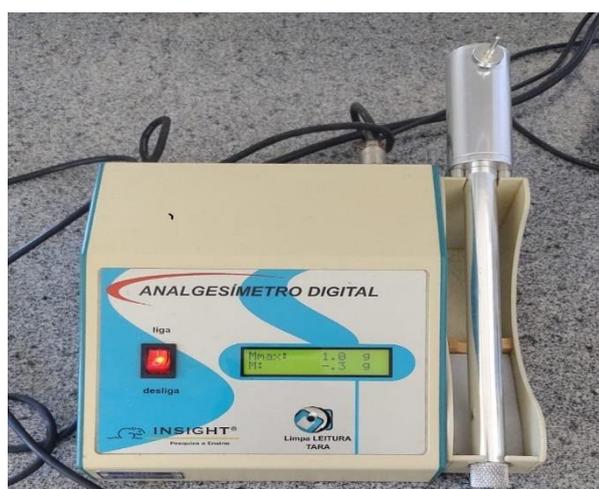


Figura 7: Equipamento de Medida Dinâmica da Sensibilidade Plantar (Teste Von Frey).

Fonte: Arquivo Pessoal

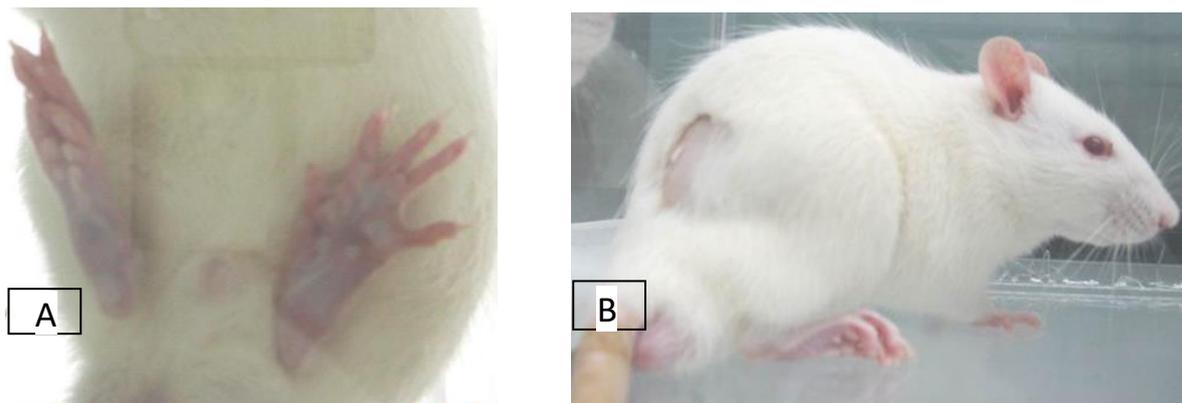


Figura 8: Posicionamento do membro pélvico em ratos operados e com lesão do nervo espinhal. Observe que não há perda da propriocepção. Animais operados para mimetizar a dor neuropática através da Axotomia parcial do nervo espinhal (APNE) em A e B;

EUTANÁSIA

Ao final do experimento foram administradas sobredose de fármaco anestésico tiopental, a fim de causar uma depressão do sistema cardiorrespiratório progredindo assim para parada cardiorrespiratória. O local onde o nervo espinhal foi lesionado e tratado com células tronco foi coletado e enviado para análise histopatológica. E para fins de comparação, foi enviado nervo ciático de animais saudáveis, sem lesão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com o auxílio do software Graph Pad Prism versão 6.0 para a análise das variáveis quantitativas, será feita uma Análise de Variância (ANOVA) one-way, com posterior teste de média Newmann-Keuls, Tukey e t de Student, dependendo de cada caso, respeitando-se um $p < 0,05$ (99,95% de confiabilidade).

7. RESULTADOS

Nesse modelo experimental, fazemos os testes controle dos animais sem a lesão espinhal. Dessa forma, podemos observar na figura 9, os resultados expressos em média \pm erro padrão de três medidas efetuadas, com intervalo e 30 minutos, da pressão exercida nas patas, antes da lesão. Na figura 10 verificamos uma redução significativa no tempo de retirada do membro, após a pressão exercida, validando o modelo de dor neuropática induzida pelo método proposto. Ou seja, todos os animais apresentaram neuropatia. E mesmo com a aplicação das células tronco, ainda não foi possível observar uma melhora aos 7 dias de pós-operatório.

Foram estabelecidas mensurações a cada 7 dias. Perfazendo um total de 3 aferições aos 7, 15 e 21 dias após a neuropatia induzida.

Quando avaliamos os animais dentro do mesmo grupo, e nas sequências das figuras 11 (15 dias após a lesão) e 12 (21 dias após a lesão), percebemos uma melhora gradual e significativa no tempo de permanência com a pressão exercida. Dessa forma, podemos confirmar dados da literatura condizentes com a recuperação através do uso células tronco mesenquimais que apresentam a capacidade de se diferenciarem em células lesionadas em diferentes tecidos, substituindo-as, com a mesma capacidade da célula original (PECK, 2011; LIEW et al, 2016).

GRUPO CONTROLE

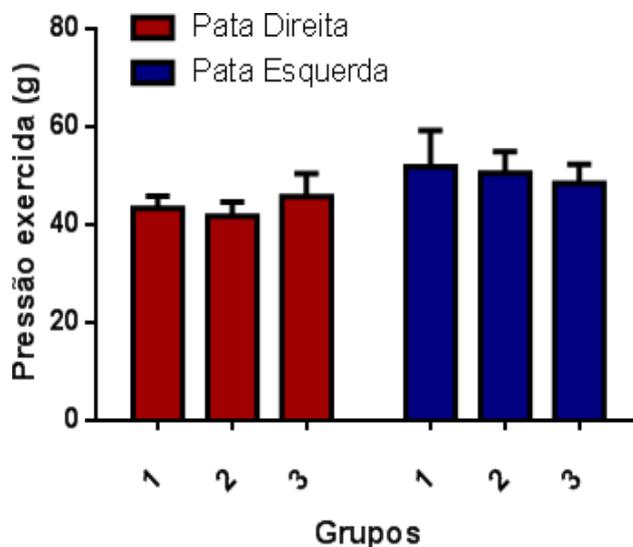


Figura 9: Resposta analgésica após neuropatia induzida pelo modelo APNE, em ratos wistar.

PÓS-OPERATÓRIO:

Ao compararmos todos os animais dentro dos grupos e entre os grupos, percebemos que aos 21 dias, os animais recuperaram a deambulação, melhoraram o posicionamento do membro com lesão nervosa, e aumentaram o tempo de permanência no teste de Von Frey (Figuras 12). Em relação às fêmeas, os resultados em relação à recuperação, algumas apresentaram recuperação aos 15 dias (Figura 13), mas piora logo em seguida. Confirmando dados de literatura onde fêmeas requerem doses maiores de substâncias analgésicas entre outros fármacos.

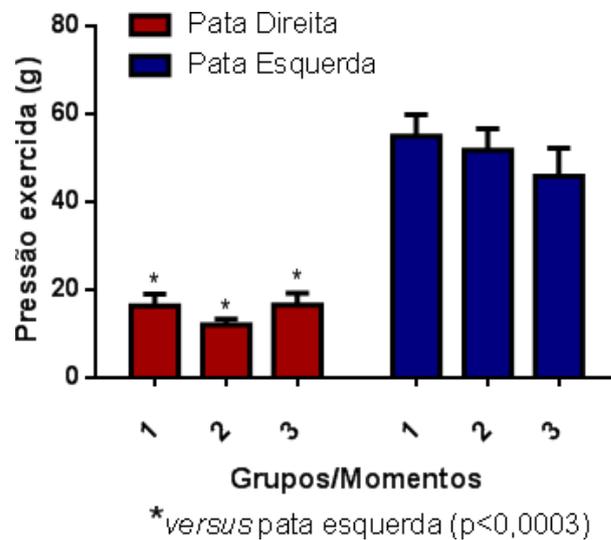


Figura 10: 7º dia de pós-operatório da APNE e inoculação de células-tronco, em ratos wistar.

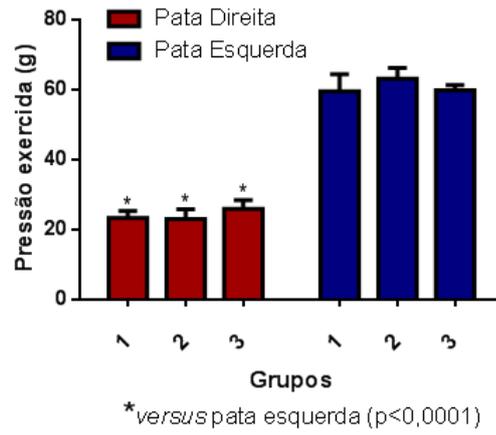


Figura 11: 15º dia de pós-operatório da APNE e inoculação de células-tronco, em ratos wistar.

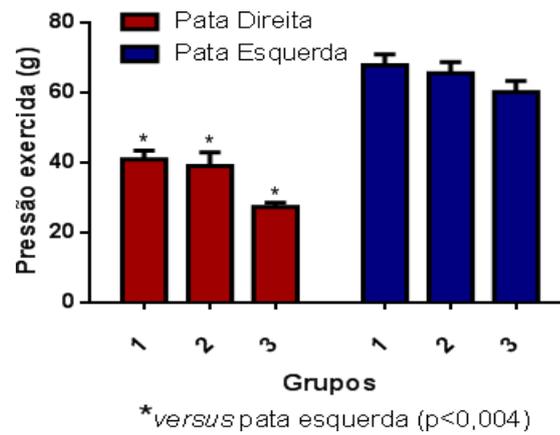


Figura 12: 21º dia de pós-operatório da APNE e inoculação de células-tronco, em ratos wistar.

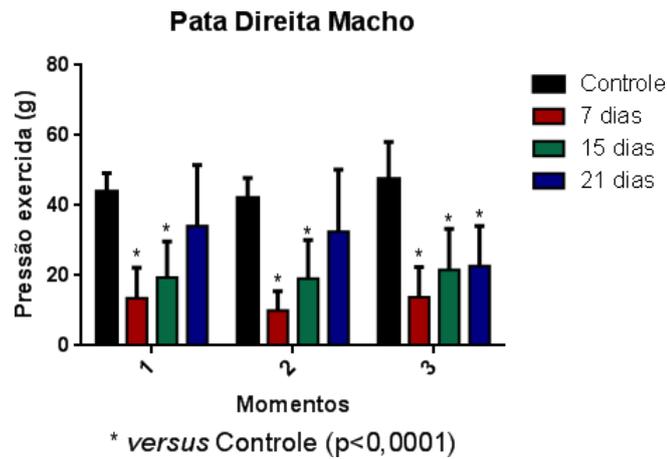


Figura 13: Avaliação da retirada do membro após pressão exercida (Von Frey). Comparativo das mensurações pata direita grupo 1 (machos)

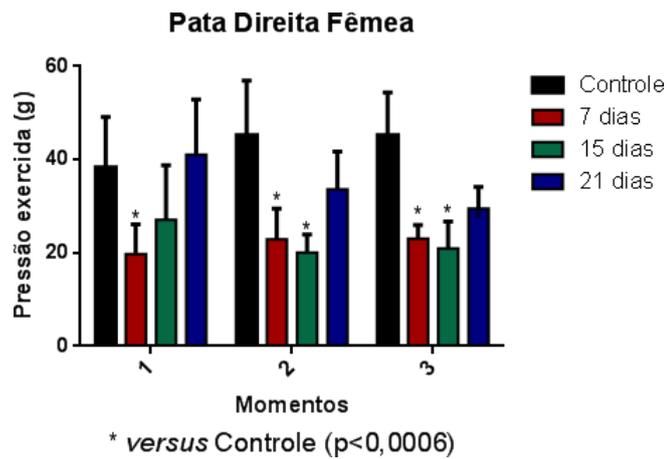


Figura 14: Avaliação da retirada do membro após pressão exercida (Von Frey). Comparativo das mensurações pata direita grupo 2 (fêmeas)

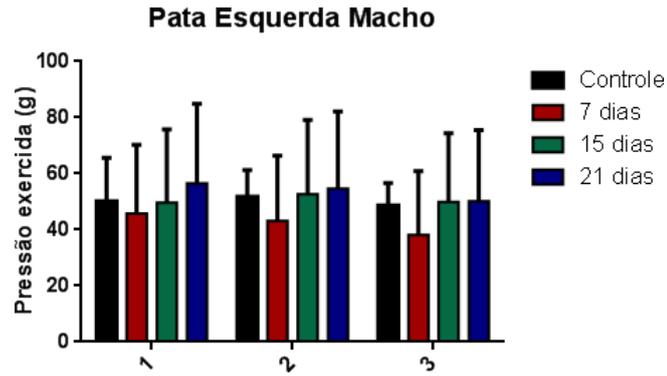


Figura 15: Avaliação da retirada do membro após pressão exercida (Von Frey). Comparativo das mensurações pata esquerda grupo 1 (machos)

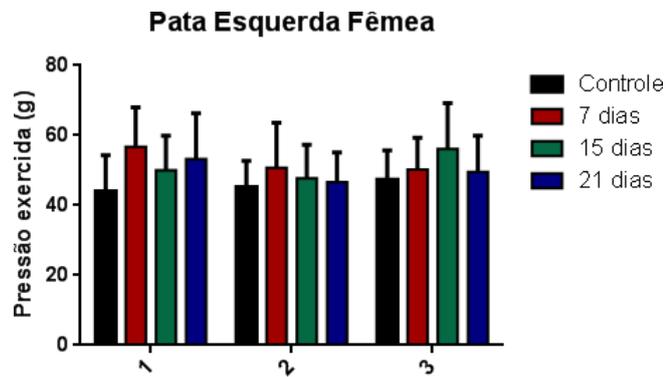


Figura 16: Avaliação da retirada do membro após pressão exercida (Von Frey). Comparativo das mensurações pata esquerda grupo 2 (fêmeas)

Com a finalidade de comparação entre o nervo íntegro e o lesionado, foi feito o corte histológico do nervo ciático removido após morte por sobre dose de agente anestésico. Na figura 17 (em A, aumento de 10x; em B, aumento de 20x) pode se visualizar as estruturas neurais periféricas íntegras compostas por axônios monomórficos e regulares, ausentes de quaisquer alterações ou patologias isoladas por fina camada eosinofílica denominada perineuro.

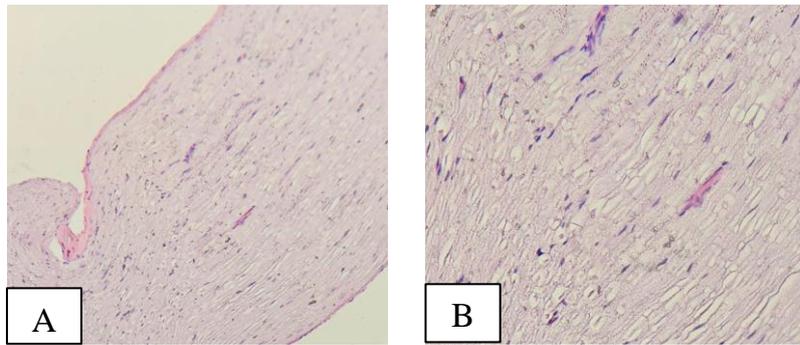


Figura 17: Fotomicrografia de nervo ciático íntegro de ratos wistar machos.

Após a lesão, onde foi adicionado células tronco, os ratos apresentaram melhora clínica e após morte por sobredose de anestésico, coletamos o nervo ciático da mesma forma que o tecido íntegro para avaliação histológica. Os resultados são descritos a seguir.

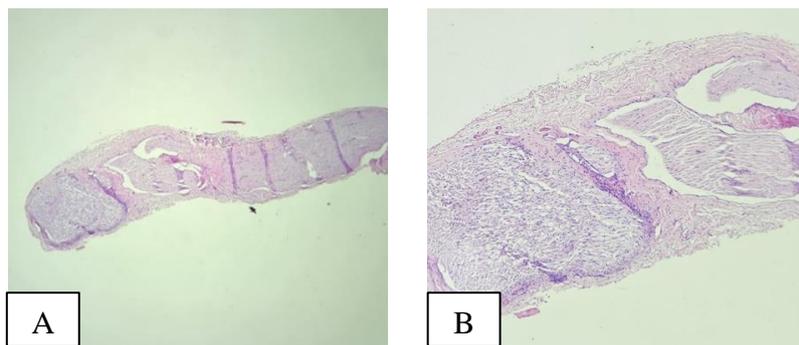


Figura 18: Fotomicrografia de nervo ciático após lesão do nervo ciático e adição de células tronco pluripotentes de cães em ratos wistar machos.

Na figura anterior (Figura 18), observa-se proliferação de tecido conjuntivo com intensa produção de colágeno, moderada angiogênese com discreta congestão entremeando fibras musculares esqueléticas. Com tecido de granulação em tecido muscular esquelético. Em A, aumento de 10x; em B, aumento de 20x.

Na figura 19 há presença de celularidade e de miofibroblastos em meio ao tecido de granulação.

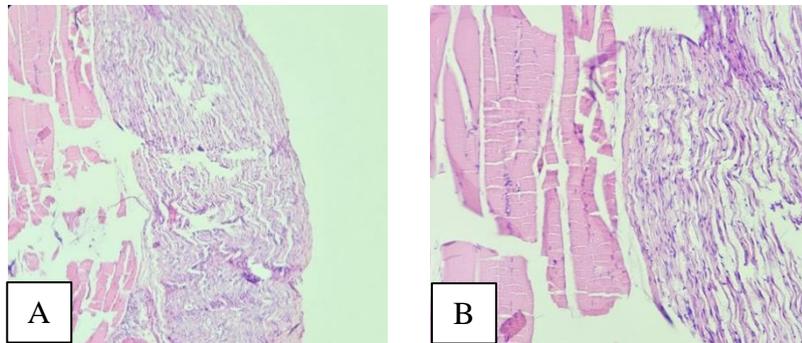


Figura 19: Fotomicrografia de nervo ciático após lesão parcial do nervo ciático e adição de células tronco pluripotentes(mesenquimais) de cães em ratos wistar machos.

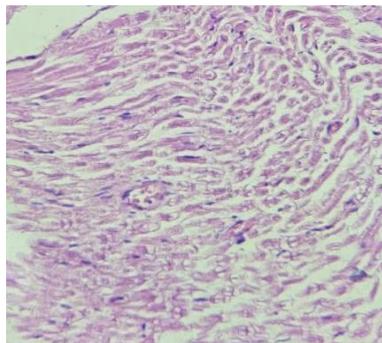


Figura 20: Fotomicrografia de nervo ciático após lesão parcial do nervo ciático e adição de células tronco pluripotentes(mesenquimais) de cães em ratos wistar machos.

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células tronco adultas normalmente presentes em quantidades variadas em quase todos os tecidos de origem

mesodérmica do organismo. Essas células preservam sua capacidade multipotencial, ou seja, se diferenciam em quase todos os tipos de celulares existentes. Sabe-se que elas têm a função de promover peças de tecidos e órgãos quando danificadas, sendo esse papel crucial para o controle da homeostasia tecidual (com a realização de forma equilibrada da substituição das células senescentes) (PECK, 2011; LIEW et al., 2026).

Os resultados de estudos clínicos permaneceram promissores, levando-se em consideração dados apresentados em uma metanálise sobre o assunto que apresentou redução das taxas de amputação e melhoria do índice tornozelo-braquial, sem incremento de risco para os pacientes. Esses estudos geralmente são realizados com CTMs de coleta direta ou apenas com separação por centrifugação, e são raros os que utilizam diretrizes técnicas de coleta, expansão e caracterização, conforme as orientações da International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT). Por isso, há necessidade de estudos com esse delineamento para que haja um melhor esclarecimento da aplicação clínica de marcas comunitárias (LIEW et al., 2016). Apesar do uso de células tronco ser estudado em vários tecidos, existem poucos relatos na aplicabilidade clínica; mas sabe-se que podem acontecer falhas. Outros estudos em pequenas séries de casos ou relatos isolados em humanos trazem sucesso técnico na aplicação de enxertos alogênicos (de cadáveres) ou xenogênicos (derivados de animais - ovelhas ou porcos) com uso de CTMs humanos, mas muitas vezes envolvendo falhas relacionadas à resposta imunológica autoimune e conseqüente hiperplasia miointimal ou formação de aneurismas (PECK et al., 2011).

É possível afirmar com base na análises histológicas que a lesão provocada no presente experimento está em processo de regeneração. Trabalhos que relatam lesões nervosas, até mesmo pós injeção inadvertida de anestésico local (KAPUR et al., 2007) apresentaram, na histologia, marcada inflamação intersticial, com necrose das miofibras com miofagocitose e degeneração muscular, além da degeneração da mielina. O ponto em comum das lesões citadas em literatura e a do presente experimento, é a deposição intraneural de fibras colágenas determinando a fibrogênese (EL-GOWELLI et al., 2016).

O trabalho de EL-GOWELLI e colaboradores, relatam a injeção de fosfatidilcolina/deoxicolato (PC/DC) intraneural de forma inadvertida. Esse composto, que é utilizado no tratamento de lipomas, e redução de gordura em tecido subcutâneo, causou moderada infiltração de células inflamatórias ao redor dos vasos sanguíneos locais e lesão da musculatura lisa vascular. Estudos relataram que o

deoxicolato causa desnudamento do endotélio vascular (Herath et al., 2013; Mangold et al., 2015) e danificam a musculatura lisa vascular (Ralevic, 2002).

A presença de injúria neural e intensa resposta inflamatória no sítio de injeção no trabalho está de acordo com estudos clínicos onde a injeção da mistura de PC/DC causa eritema, calor localizado, edema, dor intensa (Mokosch et al., 2012; Yagima Odo et al., 2007). Evidências demonstram inflamação estéril desenvolvendo injúria nervosa periférica. A infiltração de leucócitos libera citocinas que causam hiperexcitabilidade e contribuem para a dor neuropática (McLachlan and Hu, 2014). A inflamação crônica que desenvolve injúria nervosa periférica é usualmente associada com mais lesões nervosas (Li et al., 2013).

A ligação entre inflamação e degeneração da musculatura esquelética não pode ser ignorada. A infiltração de células recrutadas pela injúria nervosa podem causar injúria na musculatura esquelética. Confirmando essa teoria, Hodgetts et al. (2006) demonstraram que a infiltração de células inflamatórias no músculo esquelético leva a produção de citocinas pró-inflamatórias causando necrose muscular. Dessa forma, a lesão do músculo esquelético pode produzir mais citocinas pró-inflamatórias que atraindo neutrófilos para a área lesionada (Marklund et al., 2013; KAPUR et al., 2021) e o “círculo vicioso” continua culminando com mais danos ao músculo esquelético e nervos no sítio de injeção. Notavelmente, estudos demonstraram que esse aumento nas citocinas pró-inflamatórias podem resultar em catabolismo muscular (Acharyya et al., 2004; KAPUR et al., 2021).

Diante dessa afirmação, pudemos verificar no presente estudo que não houve lesão muscular ou qualquer alteração do tecido subjacente, demonstrando recuperação da área lesionada ou afetada experimentalmente, com o uso das CTMs.

8. CONCLUSÕES

Após a realização do experimento, podemos concluir que o uso de células tronco mesenquimais de cães ajudou na recuperação da lesão parcial do nervo ciático, tanto clinicamente, como histologicamente, e denominamos a técnica de lesão parcial como axotomia parcial do nervo espinhal (APNE).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIR, R.; LIU, C. N.; KOCSIS, J. D.; DEVOR, M. Oscillatory mechanism in primary sensory neurones. **Brain**, Oxford, v. 125, p. 421-435, 2002.

ANDERSEN, M. L. **Estudo das alterações do sono em modelos de dor crônica**. Dissertação de Mestrado – Escola Paulista de Medicina – UNIFESP.Sao Paulo,1999. 122f.

ACHARYYA, S., LADNER, K.J., NELSEN, L.L., DAMRAUER, J., REISER, P.J., SWOAP, S., GUTTRIDGE, D.C. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products (2004) *Journal of Clinical Investigation*, 114 (3), pp. 370-378.

BAHIA, P. K.; SUZUKI, R.; BENTON, D. C. H.; JOWETT, A. J.; CHEN, M. X.; TREZISE, D. J.; DICKENSON, A. H.; MOSS, G. W. J. **A functional role for small-conductance calcium-activated potassium channels in sensory pathways including nociceptive processes**. *The Journal of Neuroscience*, Washington, v.25, n. 14, p. 3489-3498, 2005.

BARON, R. **Mechanisms of disease: neuropathic pain – a clinical perspective**. *Nature Clinical Practice Neurology*, New York, v. 2, n. 2, p. 95-106, 2006.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **O Sistema Sensorial Somático**. In: ____Neurociências – Desvendando o sistema nervoso.3. ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 12, 2008, p. 387 – 422.

BENNET, G. J. and XIE, Y.-K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 1988. 33: 87-107.

BENNET, G.J. **An animal modelo f neuropathic pain: a review**. *Muscle Nerve*. 1993; 16:1040-8.

BLACK, J. A.; NIKOLAJSEN, L.; KRONER, K.; JENSEN, T. S.; WAXMAN, S. G. **Multiple sodium channel isoforms and mitogen-activated protein kinases are present in painful human neuromas.** Annals of Neurology, New York, v. 64, p.644-653, 2008.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; **Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical.** Bast, A. Eur. J. Pharmacol. **2008**, 585, 325.

BRIDGES, D.; THOMPSON, S. W. N.; RICE, A. S. C. **Mechanisms of neuropathic pain.** British Journal of Anaesthesia. London, v. 87, n. 01, p. 12- 26, 2001.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. **Flavonoids: prospective drug candidates.** Mini-Rev. Med. Chem. 2008, 8, 1429.

CRUCIANI, R. A.; NIETO, M. J. **Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes.** Revista de la Sociedad Española Del Dolor, La Coruña, v. 13, n. 5, p. 312-327, 2006.

DAY, M. J. **Basic Immunology**, in: ___ Clinical Immunology of the Dog and Cat, 2th ed. London: Manson Publishing, 2008, p. 11-60.

DUNNING, D.; HALLING, K. B.; EHRHART, N. **Rehabilitation of medical and acute care patients.** Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v. 35, p. 1411-1426, 2005.

FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. **Fisiopatologia e Controle da Dor.** In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S. R. G. Anestesia em Cães e Gatos. São Paulo: Rocca, 2002. p. 323-334.

FINNERUP, N. B.; JOHANNESSEN, I.L.; SINDRUP, S.H.; BACH, F.W.; JENSEN, T. S. **Pain and dysaesthesia in patients with spinal cord injury: a postal survey.** Spinal Cord, 2001. 39:256-262.

GALVÃO, A. C. R. **Dor neuropática: tratamento com anticonvulsivantes.** Instituto SIMBIDOR- São Paulo: Segmento Farma, 2005.

GUILBAUD, G., BENOIST, J. M.; LEVANTE, A.; GAUTRON, M.; WILLER, J. C. **Primary somatosensory cortex in rats with pain-related behaviours due to a peripheral mononeuropathy after moderate ligation of one sciatic nerve: neuronal responsivity to somatic stimulation.** *Experimental Brain Research*, Berlin, v. 92, n. 2, p. 227-245, 1992.

HANAN M. EL-GOWELLIA, BASSMA EL SABAAB , EMAD YOSRYC , HISHAM EL-SAGHIRC **Histopathological and ultra-structural characterization of local neuromuscular damage induced by repeated phosphatidylcholine/deoxycholate injection.** *Experimental and Toxicologic Pathology* 68 (2016) 39–46.

HAVSTEEN, B. H. **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** *Pharmacol. Ther.* 2002, 96, 67.

HELLEBREKERS, L. **Fisiopatologia da dor em animais e sua consequência para a terapia analgésica.** *Dor em animais.* São Paulo: Ed. Manole Ltda., p. 69 - 74, 2002.

HELLEBREKERS, L. **Reconhecimento do comportamento doloroso em animais.** *Dor em animais.* São Paulo: Ed. Manole Ltda., p. 50-51, 2002.

HERATH, C. B.; MAK, K.; BURRELL, L. M.; ANGUS, P. W. Angiotensin-(1–7) reduces the perfusion pressure response to angiotensin II and methoxamine via an endothelial nitric oxide-mediated pathway in cirrhotic rat liver. *American Journal of Physiology-gastrointestinal and Liver Physiology*. Vol. 304, No. 1, 2013.

JENSEN, K.; ANDERSEN, H.O.; OLESEN, J.; LINDBLOM, U. **Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer.** *Pain.* 25, 313-323, 1986.

KIM, S. H. and CHUNG, J.M. **An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat.** *Pain*, 1992. 50:355-363.

LAI, J. HUNTER, J. C.; PORRECA, F. **The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain.** *Current Opinion in Neurobiology*, London, v. 13, p. 291-297, 2003.

LI, J., WEI, G.-H., HUANG, H., LAN, Y.-P., LIU, B., LIU, H., ZHANG, W., ZUO, Y.-X. Nerve injury-related autoimmunity activation leads to chronic inflammation and chronic neuropathic pain (2013) *Anesthesiology*, 118 (2), pp. 416-429.

LIEW A, BHATTACHARYA V, SHAW J, STANSBY G. Cell therapy for critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Angiology*. 2016;67(5):444–455.

LORENZ, M. D.; COATES, J. R.; KENT, M. **Pain.** In: *Handbook of veterinary neurology*. 5th ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2011, p. 413 – 431.

MANGOLD, S.; SCHRAMMEL, S.; HUBER, G.; NIEMEYER, M.; SCHMID, C.; STANGASSINGER, M. E HOENICKA, M. Evaluation of decellularized human umbilical vein (HUV) for vascular tissue engineering – comparison with endothelium-denuded HUV. *Tissue Eng Regen Med* 2015; 9: 13–23.

MARKLUND, P.; MATTSSON, C. M.; WAHLIN-LARSSON, B.; PONSOT, E.; LINDVALL, B.; LINDVALL, L.; EKBLUM, B.; E KADI, F. *J. Appl. Fisiol.*, 114: 66 –72, 2013.

MATHEWS, K. A. **Neuropathic pain in dogs and cats: if only they could tell us if they hurt.** *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Philadelphia, v. 38, p. 1365-1414, 2008.

MATZNER, O.; DEVOR, M. **Hyperexcitability at sites of nerve injury depends on voltage-sensitive Na⁺ channels.** *Journal of neurophysiology*, Washington, v. 72, n. 1, p. 349-359, 1994.

MCLACHLAN, E. M.; HU, P. Inflammation in dorsal root ganglia after peripheral nerve injury: Effects of the sympathetic innervation. *Autonomic Neuroscience*. Volume 182, 2014, páginas 108-117

MEIJ, B, P; KOOISTRA, H.S.; RIJNBERK, A. Hypothalamus-pituitary system. In: KOOISTRA, H. S; RIJNBERK, A. **Clinical Endocrinology of Dog and Cats**. 2th ed. Hannover: Schlutersche, 2010, p. 13-54.

MIDLETTON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52, 673.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. **Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain**. *Brain Research Review*, Amsterdam, v. 52, p. 240-264, 2006.

MOKOSCH, A.; MOTA, R.; GERBER, P. A.; HOMEY, P.. Schwere toxische Dermatitis nach Injektionslipolyse. *Hautarzt* . 2012 · 63:282–285.

MÖLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. **Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer**. *J. Neurosci. Methods*, 84, 41-47, 1998.

MUIR III, W. W. **Dor e estresse**. In: MUIR III, W. W.; GAYNOR, J. S. *Manual de controle da dor em Medicina Veterinária*. 2.ed. São Paulo: MedVet, cap. 2,2009, p. 13-41.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications**. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001, 74, 418.

NORTH, S.; BANKS, T. Cancer pain. In: **Introduction to Small Animal Oncology**. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2009, p. 74- 81.

ORSTAVIK, K.; JORUM, E. **Microneurographic findings of relevance to pain in patients with erythromelalgia and patients with diabetic neuropathy**.

Neuroscience Letters, Amsterdam, v. 470, p. 180-184, 2010.

PECK M, GEBHART D, DUSSERRE N, MCALLISTER TN, L'HEUREUX N. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs*. 2011;195(1-2):144–158.

PATEL, N. B. Physiology of pain. In: KOPF, A.; PATEL, N. B. **Guide to pain management in low-resource settings**. Amsterdam: Internacional Association for the Study of Pain, 2010. cap. 3, p.13-18.

PETERSEN, K. L. FIELDS, H. L.; BRENNUM, J. SANDRONI, P. ROWBOTHAM, M. C. **Capsaicina evoked pain and allodynia in post- herpetic neuralgia**. *Pain*, Amsterdam, v. 88, p. 125-133, 2000.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. **Dor**. In: _____ *Neurosciência*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, cap.10, 2005, 209-221p.

RALEVIC,V., KENDALL, D. A., RANDALL, M. D., SMART, D. Cannabinoid modulation of sensory neurotransmission via cannabinoid and vanilloid receptors: roles in regulation of cardiovascular function. *Life Sci*. 2002 Oct 18;71(22):2577-94.

RAQUEL M.P.; CAMPOS A.; MARIA CAROLINA BARBOSA-SILVA, A. , VICTOR T. RIBEIRO-RESENDE. Comparison of effect of crush or transection peripheral nerve lesion on lumbar spinal cord synaptic plasticity and microglial dynamics **IBRO Neuroscience Reports** Volume 10, June 2021, Pages 225-235.

SCADDING, J. **Neuropathic pain**. *Advances in Clinical Neuroscience & Rehabilitation*, Edinburgh, v. 3, n. 2, p. 8-14, 2003. SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. **Pathophysiology of pain**. Langenbeck`s

SCHESTATSKY, P. *Archive Surgery*, Berlin, v. 389, p. 237-243, 2004. Definição, diagnostic e tratamento da dor neuropática. **Revista Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 28, n. 3, p.177- 187, 2008.

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

SHAFFRAN, N. **Pain management: the veterinary technician's perspective**. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v. 38, p. 1415- 1428, 2008.

SIDDALL, P. J.; COUSINS, M. J. Spinal pain mechanisms. **Spine**, Philadelphia, v. 22, n. 1, p. 98-104, 1997.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**, 5ª ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004.

STACEY, B. R. Management of peripheral neurophatic pain. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, Hagerstown, v. 84, n. 3, p. 4- 16, 2005.

TAHARA, S. **A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids**. Biosci., Biotechnol., Biochem. **2007**, 71, 1387.

VEITCH, N. C.; Grayer, R. E. J. **Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins**. Nat. Prod. Rep. 2008, 25, 555.

WASNER, G.; KLEINERT, A.; BINDER, A.; SCHATTSCHNEIDER, J.; BARON, R. **Postherpetic neuralgia: topical lidocaine is effective in nociceptor- deprived skin**. Journal of Neurology, Berlin, v. 252, p. 677-686, 2005.

WOOD, J. N.; BOORMAN, J. P.; OKUSE, K.; BAKER, M. D. Voltage- gated sodium channels and pain pathways. **Journal of Neurobiology**, Hoboken, v. 61, n. 1, p. 55- 71, 2004.

WOOLF, C. J. **Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy**. Life Sciences, Oxford, v. 74, p. 2605-2610, 2004.

WOOLF, C. J.; MAX, M. B. **Mechanisms-based pain diagnosis**. *Anesthesiology*, Philadelphia, v. 95, p. 241-249, 2001.

YAGIMA ODO, M.E., CUCÉ, L.C., ODO, L.M., NATRIELLI, A. Action of sodium deoxycholate on subcutaneous human tissue: Local and systemic effects. 2007 *Dermatologic Surgery*, 33 (2), pp. 178-189.