



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Terapias avançadas no tratamento da dor crónica não oncológica

Joana Filipa de Sousa Costa Novo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Vico Ávalos

Covilhã, abril de 2017

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Manuel Vico Ávalos por toda a disponibilidade, apoio e profissionalismo demonstrados em todas as fases da elaboração desta dissertação.

Aos meus pais e ao meu irmão pelo amor e suporte incondicional, pelo encorajamento constante e pelos valores que me transmitem.

Aos “FacFriends” pela amizade e companhia nesta viagem, por tornarem estes anos na Covilhã memoráveis.

Obrigada!

Resumo

Introdução: A investigação de métodos que permitam um melhor e mais adequado controlo da dor crónica tem assumido cada vez mais relevância. Atualmente o controlo da dor crónica não oncológica assenta sobretudo em fisioterapia, medicação analgésica ou em técnicas invasivas. A medicina regenerativa é uma área emergente que oferece agora novas soluções para a redução da dor e aumento da funcionalidade destes doentes.

O conhecimento, cada vez mais aprofundado, da fisiopatologia subjacente às principais causas de dor crónica não oncológica tem sido fulcral para o desenvolvimento de terapias avançadas. Estas subdividem-se em terapias celulares, de indução celular e em técnicas derivadas da engenharia de tecidos. Pretende-se com estas técnicas de medicina regenerativa não só uma analgesia mais eficaz, mas também a modificação do curso natural da doença, com regressão do processo degenerativo.

Objetivos: 1- Identificar o potencial terapêutico na dor crónica não oncológica de técnicas avançadas de medicina regenerativa; 2- Identificar o estado da arte nas terapias avançadas (indução celular, terapia celular e engenharia de tecidos) para o tratamento da dor crónica; 3- Caracterizar a eficácia das terapias regenerativas no controlo da dor crónica não oncológica.

Metodologias: Para responder a estes objetivos foi feita uma pesquisa alargada de literatura sobre o tema, privilegiando-se a informação mais recente e usando como principais palavras-chave: “Dor crónica não oncológica”; “Dor neuropática”, “Dor osteoarticular”; “Dor musculotendinosa”; “Terapia Celular”; “Engenharia de Tecidos”; “Medicina Regenerativa” e “Células estaminais”.

Palavras-chave

Dor crónica não oncológica; Medicina regenerativa; Terapias Avançadas; Células estaminais; Engenharia de Tecidos.

Abstract

Introduction: The research of new methods that allow a better control of chronic pain has assumed more and more relevance over the past years. Currently, the control of non-oncologic chronic pain is based upon the management of physiotherapy, analgesic medication and invasive techniques. Regenerative medicine is an emerging area that offers new options in order to reduce pain and increase functionality of these patients.

The increasing understanding of the mechanisms behind the main causes of non-oncologic chronic pain has been essential for the development of advanced therapies. These can be divided into cellular therapies, cellular induction therapies and also tissue-engineering derived techniques. The goal with these procedures is to attain not only a more effective analgesia but to change the natural course of the disease, by reversing the degenerative process.

Objectives: 1- Identify the therapeutic potential of advanced regenerative medicine techniques, and their application in non-oncologic chronic pain; 2- Identify the State of the Art in advanced therapies (cellular induction, cellular therapy and tissue-engineering) for treatment of chronic pain; 3 - Distinguish the efficacy of regenerative therapies in the control of non oncologic chronic pain.

Materials and Methods: In order to fulfill these objectives, a broad research of scientific literature was undertaken, with more recent information having been favoured, whilst using the following key-words: “Non-oncologic chronic pain”, “neuropathic pain”; “Osteoarticular pain”; “Musculotendinous pain”; “Cellular Therapy”; “Tissue Engineering”; “Regenerative Medicine” and “Stem Cells”.

Keywords

Non oncological chronic pain; Regenerative medicine; Stem cells; Advanced Therapies; Tissue Engineering

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice	ix
Lista de acrónimos.....	xi
1. Introdução	1
2. Objetivos.....	3
3. Metodologias	5
4. Dor crónica não oncológica	7
4.1 Dor crónica neuropática	7
4.2. Dor crónica nociceptiva	8
4.2.1. Dor crónica músculo-esquelética.....	8
4.2.2. Dor crónica pós-cirúrgica ou pós-traumática	8
5. Terapias avançadas	9
5.1 Terapias celulares	9
5.1.1. Células estaminais pluripotentes.....	9
5.1.2. Células estaminais multipotentes	10
5.2 Terapias de indução celular	11
5.3. Engenharia de tecidos	12
5.3.1. Suporte para as terapias celulares.....	12
5.3.2 Exossomas	12
6. Aplicações das terapias avançadas na dor neuropática.....	15
6.1. Lesão Medular	15
6.1.1. Terapias celulares	16
6.1.2. Terapias de indução celular.....	16
6.1.3. Engenharia de tecidos como suporte às terapias celulares	17
7. Aplicações das terapias avançadas na dor nociceptiva	19
7.1. Osteoartrose	19
7.1.1. Implante Autólogo de Condrócitos (ACI)	19
7.1.2. Células estaminais mesenquimais (MSCs).....	20
7.1.3. Terapias de indução celular.....	22
7.1.4. Engenharia de tecidos.....	22
7.2. Lesões tendinosas.....	23
7.2.1. Terapias Celulares	23
7.2.2. Terapias de indução celular.....	24
7.2.3. Engenharia de tecidos.....	24

7.3. Degeneração do disco intervertebral	25
7.3.1. Terapias celulares	25
7.3.2. Terapias de indução celular	26
7.3.3. Engenharia de tecidos	27
8. Conclusão	29
Referências bibliográficas.....	31

Lista de Acrónimos

ACI	Implante autólogo de condrócitos
AD-MSCs	Célula estaminal mesenquimal derivada do tecido adiposo
BFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BM-MSC	Célula estaminal mesenquimal derivada da medula óssea
BMP	Proteína morfogénica óssea
DDIV	Degeneração do disco intervertebral
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ESC	Célula estaminal embrionária
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDF	Fator de crescimento e diferenciação
GDNF	Fator Neurotrófico derivado da Linhagem de Células Gliais
HLA	Antigénio Leucocitário Humano
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
iPSCs	Célula estaminal induzida pluripotente
ISRSN	Inibidor seletivo da recaptção da serotonina e da noradrenalina
LM	Lesão medular
miRNA	Micro ácido ribonucleico
MSC	Célula estaminal mesenquimal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NK	<i>Natural killer</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
S-MSCs	Célula estaminal mesenquimal derivada de tecido sinovial
TENS	Neuroestimulação elétrica transcutânea
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
UC-MSCs	Célula estaminal mesenquimal derivada de cordão umbilical humano
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

1. Introdução

A dor crónica é uma importante causa de morbilidade, tendo impacto sobre o bem-estar físico, emocional e social (1). A investigação de métodos que permitam um melhor e mais adequado controlo da dor crónica tem assumido, por isso, um crescente interesse nas últimas décadas. Atualmente o controlo da dor crónica não oncológica assenta sobretudo em fisioterapia, medicação analgésica ou em técnicas invasivas. Apesar de moderadamente eficazes no alívio da dor, estes tratamentos visam apenas a abordagem dos sintomas e não da cura da sua etiologia. Esta limitação pode resultar, a longo prazo, na progressiva perda da capacidade funcional e na ausência de melhoria sintomática (2).

O crescente conhecimento da fisiopatologia subjacente às principais causas de dor crónica poderá permitir uma intervenção mais especificamente direcionada, abordando a condição a nível celular ou molecular e interrompendo a cascata degenerativa. A solução para uma terapia que cumpra estes objetivos poderá estar na medicina regenerativa. O objetivo principal das técnicas de medicina regenerativa na abordagem da dor será, portanto, a cura da lesão precedente, resultando na associação da redução da dor ao aumento da capacidade funcional do doente (3).

Nesta revisão bibliográfica serão abordadas as principais causas de dor crónica não oncológica, neuropática ou nociceptiva, particularmente aquelas às quais a comunidade científica tem dado mais relevo na aplicação de terapias avançadas.

As terapias avançadas podem ser divididas em três grupos principais:

- Terapias celulares, com a introdução de células pluripotentes ou multipotentes no tecido lesado (4);
- Terapias de indução celular, recorrendo a moléculas que possuam a capacidade de alterar o fenótipo do tecido lesado (5,6);
- Engenharia de tecidos, neste contexto, a partir da produção de substratos físicos para as terapias celulares, com estrutura semelhante à do tecido saudável (5,7,8) ou da produção de exossomas (9).

Será discutido o potencial terapêutico de cada uma destas técnicas para as diferentes etiologias da dor crónica não oncológica.

2. Objetivos

Identificar o potencial terapêutico na dor crónica não oncológica de técnicas avançadas de medicina regenerativa;

Identificar o estado da arte nas terapias avançadas (indução celular, terapia celular e engenharia de tecidos) para o tratamento da dor crónica;

Caracterizar a eficácia das terapias regenerativas no controlo da dor crónica não oncológica.

3. Metodologias

Esta dissertação foi realizada a partir de uma pesquisa alargada da literatura científica sobre terapias avançadas no tratamento da dor crónica não oncológica. Para a pesquisa de artigos científicos foram consultadas diferentes bases de dados, como Pubmed, ResearchGate e BioMedCentral. Foram utilizadas como principais palavras-chave: “Dor crónica não oncológica”; “Dor neuropática”, “Dor osteoarticular”; “Dor músculotendinosa”; “Terapia Celular”; “Engenharia de Tecidos”; “Medicina Regenerativa” e “Células estaminais”. A pesquisa foi restringida a artigos no idioma de português, inglês ou espanhol e foi realizada entre agosto e dezembro de 2016. Recorreu-se ainda a referências bibliográficas citadas nos artigos selecionados, bem como a livros referentes ao tema e privilegiou-se a informação mais recente. As fontes bibliográficas foram posteriormente divididas com base no seu tipo e conteúdo, de forma a que se adequassem à estrutura base e capítulos desta dissertação.

4. Dor crónica não oncológica

A *International Association for the Study of Pain (IASP)* define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” (10).

A dor crónica é definida como a dor que dura mais de três meses e/ou persiste após o tempo normal de cura, perdendo a função, vital e protetora, da nociceção de “sinal de alerta” (11,12). É uma condição frequente, contribuindo para cerca de 15 a 20% dos motivos de consultas médicas (12). Estima-se que em Portugal afete 37% da população, dos quais 68 e 35% sofre de dor moderada a grave, respetivamente (13).

Tendo um importante impacto na qualidade de vida dos doentes, a dor crónica está associada não só a disfunção física e motora mas também a *stress* psicológico, com consequências como ansiedade ou depressão, e a distúrbios do sono (1,13). Esta elevada morbidade associada justifica a extensa investigação para uma terapêutica da dor crónica segura e eficaz.

Atualmente a abordagem da dor crónica integra-se nas seguintes categorias: tratamento farmacológico ou cirúrgico, fisioterapia, psicoterapia, acupuntura e técnicas de neuroestimulação transcutânea (TENS) e técnicas invasivas. No entanto, estes tratamentos apresentam uma eficácia limitada (2).

Classicamente, a dor é classificada em neuropática ou nociceptiva. Esta distinção é importante para uma melhor compreensão do mecanismo subjacente, tendo implicações na abordagem da dor.

4.1 Dor crónica neuropática

De acordo com a *International Association for the Study of Pain (IASP)* a dor neuropática surge como consequência de uma lesão ou doença do sistema nervoso (10). Por conseguinte há uma hiper-reatividade das fibras aferentes e surge dor, que pode ser espontânea ou desencadeada, numa resposta exagerada a um estímulo doloroso (hiperalgesia) ou não doloroso (alodínia). A dor neuropática pode ser subdividida em central e periférica, conforme a localização da lesão e a distribuição anatómica da dor deve ser consistente com a lesão neurológica (12).

Para o tratamento farmacológico da dor neuropática recorre-se a antidepressivos, tricíclicos ou inibidores seletivos da recaptção da serotonina e da noradrenalina (ISRSN), ou a antiepiléticos e anticonvulsivantes, como a gabapentina ou a pregabalina. Caso a dor seja bem localizada podem usar-se adjuvantes tópicos, como a lidocaína (11,14,15) e capsaicina.

4.2. Dor crónica nociceptiva

Uma lesão tecidual resulta em estímulos das fibras nociceptivas que consequentemente geram uma dor nociceptiva, que pode ser categorizada em somática ou visceral, conforme a origem do estímulo e a caracterização da mesma. Uma dor somática resulta de uma lesão tecidual e, por norma, tem localização bem definida. A dor visceral é mediada por recetores sensíveis à distensão e tem características mais inespecíficas. A terapêutica farmacológica usualmente adotada neste tipo de dor não envolve agentes opióides ou narcóticos. A primeira linha de tratamento é o paracetamol ou, alternativamente, AINEs, com resultados moderados. (11)

4.2.1. Dor crónica músculo-esquelética

A dor músculo-esquelética crónica surge a partir da lesão direta de ossos, articulações, músculos ou tecidos relacionados. Estas lesões podem ser caracterizadas por alterações estruturais, por exemplo degenerativas, ou pelo seu componente inflamatório, com origem autoimune, metabólica ou infecciosa. (12) Este é o grupo onde se inserem a maioria das causas de dor crónica não oncológica.

4.2.2. Dor crónica pós-cirúrgica ou pós-traumática

O diagnóstico deste subtipo de dor deve ser de exclusão, devendo primeiro procurar-se outras causas, como infeção. Considera-se útil a separação entre a dor pós-cirúrgica e a dor pós-traumática. Na dor pós-cirúrgica crónica está frequentemente presente dor neuropática, sendo esta mais grave e incapacitante que a dor nociceptiva isolada (16).

5. Terapias avançadas

5.1 Terapias celulares

Uma terapia celular consiste na administração de células ao corpo humano, visando o benefício do mesmo. No âmbito do tratamento da dor crónica, a maioria das terapias celulares visa a regeneração de tecidos lesados.

A prática de terapias celulares em distúrbios hematológicos ou na fertilização *in vitro* já está bem definida (17). Na área da dor crónica só mais recentemente começaram a ser investigadas as suas aplicações, que se têm mostrado bastante promissoras. A sua principal vantagem relativamente às abordagens conservadoras, tradicionalmente aplicadas à dor crónica, é a capacidade de modificar a progressão natural da doença, para além do alívio sintomático. Adicionalmente, em alguns casos, pelo facto da ação terapêutica ser restrita ao local do implante, está associada a vantagem de uma redução dos efeitos secundários sistémicos associados aos fármacos (por exemplo a sedação associada aos compostos GABAérgicos). (4)

Os resultados destas terapias são influenciados por vários fatores inerentes ao próprio hospedeiro ou às características das células a serem transplantadas, bem como à sua via de administração. A otimização destes fatores permitirá uma maior sobrevivência e a melhor diferenciação das células no local do transplante, o que conduzirá a resultados mais sustentados (18). A seleção da melhor fonte de células estaminais é, portanto, uma questão central nas terapias celulares.

5.1.1. Células estaminais pluripotentes

Existem dois tipos principais de células pluripotentes em estudo: as de origem embrionária (ESCs) e as não embrionárias, de pluripotência induzida (iPSCs). Ambas possuem a capacidade ilimitada de se diferenciarem em qualquer tipo celular das três camadas germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme) (19,20).

As ESCs podem ser obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto, levantando alguma controvérsia ética que tem travado a sua utilização em terapias celulares. Com a criação das iPSCs a partir de células somáticas de tecidos adultos (21,22) passou a ser possível obter células pluripotentes de mais fontes, com menor imunorreatividade e sem o dilema ético.

A reprogramação das células somáticas para um estado pluripotente foi possível pela introdução, através de vetores de DNA, de quatro genes: OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC (22). Contudo, de forma a ultrapassar os riscos associados à manipulação genética foram investigados outros fatores de reprogramação como mRNA, proteínas e outras pequenas moléculas, que se mostraram eficazes (20). As iPSCs, posteriormente, sofrem um processo de diferenciação *in vitro*, para o tipo celular pretendido, e podem ser transplantadas para o local da lesão (20,23).

Teoricamente, como as iPSCs apresentam a mesma base genética que o hospedeiro não é de esperar a sua rejeição imunológica, no entanto esta reduzida imunorreatividade ainda não está bem comprovada (20,23).

A produção mais difícil das células estaminais pluripotentes e o maior risco de génese de tumores, sobretudo teratomas, justificam a preferência atual pelas células estaminais multipotentes mesenquimais (MSCs) nas terapias celulares, apesar da sua menor capacidade proliferativa (19,24).

5.1.2. Células estaminais multipotentes

As MSCs, um tipo de células estaminais não embrionárias ou adultas, apresentam-se como alternativas promissoras na regeneração de lesões e na terapêutica da dor crónica de várias etiologias. A capacidade de serem diferencialmente diferenciadas em vários tipos celulares, incluindo sangue, tecido adiposo, cartilagem, células neurais (18), e expressarem determinados marcadores de membrana (3), tornam-nas foco de interesse na medicina regenerativa. Apesar de o seu potencial de diferenciação ser mais limitado que o das células estaminais pluripotentes, estas são atualmente as mais estudadas e aplicadas com maior segurança em terapias celulares. As MSCs podem facilmente ser obtidas a partir de múltiplas fontes como o cordão umbilical (18), placenta (25), medula óssea (26-29), sinovial (30) e tecido adiposo (31,32).

As MSCs, a nível tecidual, têm propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias, de regulação da angiogénese, da apoptose e do nível de oxidação das células (18,33) contribuindo para isso a secreção de mediadores celulares, como microvesículas e fatores com ações parácrinas. De entre as propriedades de imunomodulação destacam-se a inibição dos linfócitos T, da maturação dos monócitos e das células dendríticas (34). Assim, para além do seu potencial de diferenciação e proliferação, as MSCs podem participar na função dos tecidos e contribuir para a sua homeostasia (35,36).

A utilização de MSCs autólogas ou alogénicas continua alvo de discussão. As MSCs apresentam uma redução de vários marcadores de superfície, como o CD45, CD80, CD86 ou CD40 (37) e dos antigénios HLA, pertencentes aos Complexos Major de Histocompatibilidade tipo I e II (19,38), e desta forma, têm capacidade de escape à imunidade mediada pelos linfócitos T e NK do hospedeiro (39). Estas características tornam-nas adaptadas para um transplante alogénico sem que seja necessária medicação imunossupressora (40). No entanto continua a haver reservas na sua realização, sobretudo pelo perigo de transferência de doenças infecciosas do dador para o hospedeiro (41). A maioria dos estudos baseia-se, portanto, na utilização de células autólogas para os transplantes.

De forma a que esta terapia possa ser aplicada de forma segura e eficaz é necessário um conhecimento mais aprofundado de todos os parâmetros genéticos e epigenéticos, que regulam o ciclo celular e a secreção de moléculas pelas MSCs (19). O principal objetivo será prolongar a sobrevivência das MSC no local do implante (*in vivo*) e impedir a sua proliferação excessiva, com conseqüente desenvolvimento de tumores (42).

Há ainda algumas limitações na transposição de resultados positivos obtidos em animais para estudos a realizar em humanos, como a adaptação dos meios de cultura, do número ideal de células a serem transplantadas e do *timing* da terapia (que na maioria dos casos não poderá ser feito tão prontamente após a lesão).(18)

5.2 Terapias de indução celular

Algumas proteínas podem induzir a proliferação celular e a secreção de uma matriz extracelular propícia à regeneração do tecido ou inibir os fatores indutores de inflamação e/ou degeneração. O fornecimento destas moléculas ao tecido lesado, isoladamente ou em associação a biomateriais ou células (5), constitui também uma terapia avançada para diversas etiologias da dor crónica.

O conhecimento cada vez mais aprofundado das diferentes causas de dor permitiu isolar as principais moléculas envolvidas na sua patogénese. A partir dessa informação foi possível o desenvolvimento de terapêuticas biológicas que promovam a regeneração (6). De salientar, o plasma rico em plaquetas (PRP) que é atualmente estudado para a abordagem de várias etiologias da dor (32,43-46) pela elevada concentração destes elementos figurados, que armazenam fatores de crescimento, promotores da reparação tecidual. Esta substância pode ser injetada diretamente no local da lesão e atua sobretudo pela indução da migração celular e da produção da matriz extracelular. Este produto é obtido a partir do plasma do próprio doente, não induzindo imunorreatividade e sendo biocompatível. É por isso uma terapêutica promissora para diferentes lesões e alvo de extensa investigação (43).

5.3. Engenharia de tecidos

5.3.1. Suporte para as terapias celulares

O desenvolvimento da engenharia de tecidos torna-se essencial para as terapias celulares ao permitir a criação de biomateriais e condições que repliquem as condições nativas do local lesado (7), o que conduzirá a uma melhor adaptação dos implantes e a melhores desfechos clínicos. O desenvolvimento de hidrogéis ou suportes bioativos que proporcionem um ambiente propício à proliferação e diferenciação específica das MSCs, é por isso alvo de investigação (8). O biomaterial ideal é não imunogénico, não tóxico, permite a difusão de nutrientes ou metabolitos e é adaptado ao tecido a ser implantado (5).

A engenharia genética aplicada às MSCs também poderá contribuir para melhores resultados ao permitir a entrega diferenciada de moléculas terapêuticas, em resposta às necessidades do tecido a ser transplantado. A produção aumentada de péptidos antinociceptivos pelas MSCs transplantadas, por exemplo, pode ser muito vantajosa na abordagem da dor crónica neuropática (47). Os riscos associados são ainda uma limitação importante à aplicação de terapias genéticas. Entre eles destacam-se os relacionados com a utilização de vetores virais ou de plasmídeos, havendo a possibilidade de induzir imunorreatividade no hospedeiro, oncogénese por mutações ou ocorrer a reativação do vírus após administração (42). Os vetores não virais apesar de mais seguros têm menor capacidade de transfecção. Estudos no sentido de ultrapassar estas limitações e aumentar a segurança das terapias genéticas estão atualmente a ser realizados (44).

5.3.2. Exossomas

A partir da engenharia de tecidos tem sido possível a produção de exossomas derivados de células estaminais, que poderão oferecer um método promissor de medicina regenerativa sem células. Os exossomas são vesículas que contêm proteínas específicas, lípidos, fatores ou material genético (miRNA por exemplo) com funções importantes na comunicação e regulação celular (48). A sua produção pode ser feita a partir da recolha de MSCs do paciente (23), que são expostas a um *stress*, semelhante ao que induziu a lesão e que é proporcionado, por exemplo, por citocinas ou miRNAs. Como resposta essas células irão secretar exossomas, cujo conteúdo auxiliará no combate da inflamação e degradação dos tecidos. Estes exossomas isolados e purificados poderão então ser transfundidos para o local da lesão tecidual (9). A sua produção em massa poderá significar uma nova abordagem destas doenças.

Do conteúdo dos exossomas, os miRNAs assumem particular importância. Esta classe de RNA não codificante regula a expressão pós-transcricional dos genes e, conseqüentemente, a diferenciação das MSCs (19). Os trabalhos atuais focam-se em compreender que vias são ativadas ou silenciadas pelos miRNAs, existindo já numerosos miRNAs reconhecidos como vitais na progressão ou prevenção de doenças (9,23).

6. Aplicações das terapias avançadas na dor neuropática

O tratamento da dor neuropática é complexo. Apesar das inúmeras opções farmacológicas existentes os resultados são decepcionantes. As melhores terapias disponíveis são unicamente conservadoras e são eficazes em menos de 50% dos doentes e, mesmo nesses, a diminuição da dor não atinge os 50%.(49,50) Para que haja cura de uma dor neuropática é necessário que a área danificada seja reparada ou que as vias de redução da dor sejam amplificadas. Atualmente o tratamento a longo prazo da dor neuropática crónica apresenta desafios significativos pelas dificuldades na manutenção da eficácia farmacológica na minimização de efeitos secundários adversos durante longos períodos de tempo.(42) Assim sendo, tem sido feita investigação no sentido de recuperar ou substituir as conexões nervosas sujeitas a lesão, através de terapias genéticas ou celulares, que podem superar as limitações da farmacoterapia tradicional e podem ser particularmente indicadas para pacientes que sofrem de dor crónica incapacitante (4,18,42,47,51,52).

Células estaminais de várias origens têm surgido como candidatas promissoras para a intervenção terapêutica e estão atualmente a ser avaliadas em ensaios clínicos de fase inicial (47).

6.1. Lesão Medular

Após a lesão da medula espinhal (LM) a maioria dos pacientes sofre de dor crónica moderada a grave (53). A LM é caracterizada por duas fases de inflamação: uma fase primária ou aguda, que ocorre no momento da lesão com compressão direta e diminuição no fluxo sanguíneo, e uma segunda fase, em que é feito o principal dano, por vários mecanismos, nomeadamente indução da apoptose; início da formação de cicatriz astrogliar; cromatólise central; degradação da mielina nos axónios remanescentes; invasão das células imunitárias com secreção de citocinas inflamatórias e danos endoteliais devido a fenómenos de isquemia/reperfusão (54). Em modelos animais, após a lesão do nervo periférico ou LM, existem alterações no processamento de sinais nociceptivos e não nociceptivos devido à hiperexcitabilidade induzida por lesão dos neurónios do corno dorsal. Este processo de sensibilização central está associado a vários fatores, entre eles a diminuição da sinalização GABA, a maior e mais prolongada atividade do receptor NMDA e o rearranjo dos circuitos neuronais por apoptose. O fenómeno de “*wind up*” ocorre nos neurónios *wide dynamic range* (WDR), presentes no corno dorsal da medula, e tem também um papel central na dor neuropática crónica. Este fenómeno permite que haja um progressivo aumento da atividade dos neurónios em resposta à excitação constante dos nociceptores. (11,47)

6.1.1. Terapias celulares

As MSCs têm características imunomoduladoras e anti-inflamatórias, podendo assim minimizar o dano induzido pelo sistema imunitário se transplantadas no momento certo (55,56). O transplante de células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea (BM-MSCs) ou de células estaminais mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano (UC-MSCs) tem sido visto como uma terapia promissora pela capacidade de diferenciarem em várias células neurais com benefícios na recuperação funcional após LM. A diferença nas propriedades destas células pode ter impacto na sua eficácia na melhoria de LMs. Recentemente um estudo *in vivo* comparou a eficácia de MSCs derivadas de diferentes fontes, concluindo que os transplantes BM-MSCs e UC-MSCs são igualmente eficazes na recuperação motora e alívio dos sintomas de dor neuropática após LM. Estas células sobreviveram no tecido da medula espinhal pelo menos 8 semanas e impediram a formação de cavidades devido a LM. No entanto, a taxa de sobrevivência de UC-MSCs foi significativamente mais elevada do que BM-MSCs. As avaliações eletrofisiológicas mostraram que o transplante de UC-MSCs traz melhores resultados do que BM-MSCs no “*wind up*” de neurónios WDR, provavelmente devido à maior taxa de sobrevivência destas células. (18)

A LM leva a um aumento nas estimulações das fibras A β , A δ e C para os neurónios WDR a níveis abaixo da lesão. O transplante com MSCs recuperou essas alterações ao nível dos grupos intactos (18).

6.1.2. Terapias de indução celular

Em associação com as terapias celulares ou isoladamente, podem ser utilizadas terapêuticas com funções importantes na regeneração do tecido lesado: imunomodulação, indução do crescimento neuronal e inibição da apoptose ou necrose, da isquemia e hipoxia, da acumulação excessiva de ferro ou do *stress* oxidativo. São conhecidos fármacos com estas ações pela sua utilidade noutras áreas, por exemplo a atorvastatina, o imatinib, a eritropoietina, quelantes de ferro, suplementos de vitamina C e E ou os glicocorticóides. Citocinas como a IL-10, proteínas como neurotrofinas ou inibidores da capsaína (uma protease com função pró-apoptótica) estão atualmente em estudo por também possuírem estas funções. As aplicações destes fármacos, citocinas ou proteínas em LM parecem promissoras. (57)

6.1.3. Engenharia de tecidos como suporte às terapias celulares

É atualmente aceite que a diminuição do papel inibitório do ácido gama-aminobutírico (GABA) ao nível do corno dorsal da medula espinhal conduz à sensibilização central dos circuitos de transmissão da dor e hipersensibilidade, contribuindo assim para a dor crónica neuropática (4,47,51,52). Deste modo, o transplante de células progenitoras neuronais GABAérgicas (NPCs) tem sido investigado como alternativa no controlo da dor neuropática demonstrando resultados positivos em modelos animais (51,52).

De forma a ultrapassar as limitações associadas às células transplantadas não permanecerem mais do que um mês no local do transplante, também têm sido desenvolvidas abordagens que aumentem a capacidade antinociceptiva das células que sobrevivem, melhorando assim os resultados benéficos dos enxertos. Assim, a partir de métodos de engenharia genética foram produzidas NPCs produtoras de serino-histogranina (SHG), um péptido com atividade antagonista de NMDA (cuja atividade parece estar aumentada na dor neuropática) e com prováveis efeitos a longo prazo na sobrevivência do enxerto e/ou na integração hospedeiro-enxerto. Estas células foram posteriormente transplantadas para o espaço subaracnoídeo de modelos com LM, obtendo-se resultados positivos a nível da sobrevivência celular, bem como no alívio dos sintomas (47).

Num outro estudo foram geneticamente modificadas MSCs para co-expressarem o fator neurotrófico derivado da linhagem celular glial (GDNF), como fator analgésico segregado, uma vez que possui propriedades analgésicas bem estabelecidas e potentes. Os animais injetados com estas MSCs no gânglio da raiz dorsal (DRG) mostraram uma redução mais significativa na alodínia mecânica e hiperalgesia em comparação com os controlos. (42)

A aplicação de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AD-MSCs) geneticamente modificadas para sobre-expressarem o gene Neurogenina 2, um gene que promove a diferenciação neuronal de células progenitoras durante o desenvolvimento, foi investigada em modelos de ratos com LM. Os animais transplantados com estas células demonstraram uma maior recuperação funcional comparativamente com os animais transplantados com AD-MSCs sem modificação genética. Adicionalmente, revelou-se por imuno-histoquímica um aumento dos fatores tróficos (fator neurotrófico derivado do cérebro e fator de crescimento endotelial vascular) e uma menor tendência à formação de cicatrizes gliais. (58)

Há, portanto, um elevado potencial na engenharia genética para o tratamento da dor neuropática resultante de LM. No entanto continua a existir alguma apreensão relativamente ao transplante de células para o sistema nervoso central devido às dificuldades em garantir uma tradução segura dos resultados obtidos em modelos animais para uso em humanos (59). A formação ocasional de massas celulares proliferantes após os transplantes e a sobrevivência limitada das MSCs nos DRGs dos recetores (3 a 4 semanas) são limitações a serem ultrapassadas antes da implementação destas terapias (42).

7. Aplicações das terapias avançadas na dor nociceptiva

7.1. Osteoartrose

A osteoartrose (OA) assume particular importância entre as causas músculo-esqueléticas de dor crónica nociceptiva. Esta é uma doença crónica e degenerativa da cartilagem articular que é muito prevalente na população e cuja frequência aumenta com a idade. É causa de dor, edema da articulação e diminuição da sua mobilidade, prejudicando a qualidade de vida dos doentes. A fisiopatologia da OA é bastante complexa, resultando de um aumento de citocinas pró-inflamatórias e catabólicas e da incapacidade dos condrócitos para responder adequadamente às lesões e perda de matriz (23). As terapêuticas atuais de OA (exercício, medicação anti-inflamatória e cirurgia) são dirigidas para o tratamento sintomático, principalmente para a dor (23).

A terapia celular oferece solução a longo prazo para reparar e regenerar a cartilagem, aliviar os sintomas e, finalmente, atrasar a progressão da OA. Neste âmbito, a terapia celular é aplicável tanto com células maduras (condrócitos) como com células estaminais (6). A capacidade das células estaminais se diferenciarem em vários tipos celulares e inibirem a resposta inflamatória justifica o elevado foco de investigação nestas células com o objetivo de regenerar cartilagem em pacientes com OA. O contributo das citocinas e proteínas secretadas pelas células estaminais tem um papel importante no combate da dor neurogénica (abordado acima) que poderá ter benefícios no tratamento da dor OA (23).

7.1.1. Implante Autólogo de Condrócitos (ACI)

Esta terapia implica a obtenção, através de uma biópsia artroscópica, de uma pequena porção de tecido cartilaginoso autólogo de uma área não portadora de peso da articulação afetada. A matriz extracelular é enzimaticamente removida, via colagenase, e os condrócitos são isolados. Pelo facto de a cartilagem apresentar baixa densidade celular, os condrócitos devem ser posteriormente expandidos *in vitro* e só depois implantados no perióstio da articulação afetada, com um enxerto para manter as células no local pretendido (6,23).

O avanço na engenharia de tecidos tem contribuído para o desenvolvimento desta terapia, tornando-a mais eficaz e com menos efeitos adversos (como hipertrofia do perióstio ou adesões intra-articulares). Por exemplo, atualmente os condrócitos cultivados são pré-implantados num suporte tridimensional e adaptado, para que o transplante se ajuste melhor ao tamanho da lesão. Estas alterações ao ACI clássico permitem uma redução do tempo

cirúrgico, minimizam a invasão da fixação e garantem a manutenção de células a longo prazo (6).

Apesar do elevado sucesso desta técnica há algumas reservas na sua utilização devido a relatos de desdiferenciação dos condrócitos, com produção excessiva de colagénio tipo I e consequente formação de fibrocartilagem, que não possui a resistência da cartilagem hialina e prejudica a adaptação ao enxerto (23). Outra limitação deste método relaciona-se com a produção limitada de matriz extracelular após a expansão celular *in vitro* (7).

Estudos clínicos randomizados, no entanto, não revelaram melhores desfechos clínicos com o ACI relativamente à técnica cirúrgica de osteocondroplastia (60).

7.1.2. Células estaminais mesenquimais (MSCs)

O uso de MSCs apresenta como principais vantagens, relativamente ao ACI, uma menor morbidade no procedimento da recolha celular, a capacidade das MSCs de imunomodulação (18,33) e de, após expansão, manterem a capacidade de produzirem matriz extracelular (61).

Comparativamente com as fontes celulares pluripotentes (ESCs e iPSCs) as MSCs apresentam uma menor expressão de genes condrogénico ou cartilaginosos (COL2A1, AGC, SOX9) e uma maior expressão dos indutores da osteogénese e de hipertrofia (COL10A1, COL1A1, RUNX2) (62). Contudo o potencial de formação tumoral associado às ESCs e iPSCs (63) e as dificuldades de estas serem produzidas de forma rentável à sua aplicação em larga escala (64) tornam-nas preteridas em relação às MSCs.

Derivadas do tecido adiposo (AD-MSCs)

As AD-MSCs autólogas são uma fonte de MSCs proposta para o tratamento da OA. Estas células são obtidas a partir do próprio tecido adiposo do doente, por resseção cirúrgica ou lipoaspiração. Há dados que indicam que o tecido adiposo infrapatelar contém células com maior potencial condrogénico comparativamente com outras fontes (65) e, portanto, esta é a fonte mais frequentemente utilizada nos estudos clínicos analisados.

O implante destas células já foi testado em humanos com resultados satisfatórios. Com a injeção intra-articular de AD-MSCs foi possível obter a reparação de áreas de cartilagem degenerada, evidenciada em ressonâncias magnéticas e uma consequente melhoria sintomática e funcional, avaliadas por escalas da dor e índices, como a amplitude de movimento da articulação (ROM) (31,32). A combinação destas células com PRP e ácido hialurónico demonstrou ser benéfica para a indução e manutenção dos resultados, respetivamente (32).

Derivadas da medula óssea (BM-MSCs)

As BM-MSCs são as MSCs com aplicação na OA mais vastamente estudadas (27). Estas células apresentam capacidades de autorrenovação e de diferenciação em condrócitos, adipócitos ou osteócitos (66,67) mediadas por fatores de crescimento transformantes (TGF), como o TGF- β 3, bem como as proteínas ósseas morfogénicas (68). As BM-MSCs têm uma migração preferencial para o local de lesão e inflamação, mediada pela via SDF1/CXCR (69), característica que é desejável para um tratamento minimamente invasivo da OA (doença degenerativa e inflamatória).

As MSCs desta fonte são relatadas como tendo maior capacidade de diferenciação condrogénica comparativamente com as AD-MSCs (70) e, comparativamente com o ACI, foram relatados melhores resultados na recuperação funcional da articulação recorrendo a BM-MSCs (71).

Dois estudos realizados em humanos já confirmaram a eficácia das BM-MSCs autólogas na redução da progressão da OA do joelho, anca ou tornozelo (28,29). Em ambos os estudos, os pacientes foram seguidos por mais de um ano, concluindo-se que esta terapia contribui para o alívio da dor, sem serem necessárias cirurgias ou internamentos. Foi também evidenciado, recorrendo a ressonância magnética, a regeneração da cartilagem. A recuperação funcional não é tão evidente quanto a diminuição da dor (28), mas também é significativa e foi comprovada pela melhoria do score de WOMAC (29). Não foram relatados efeitos adversos severos, como formações tumorais pós-implante.

Apesar de menos estudadas, já há estudos em modelos animais que evidenciam o potencial terapêutico das BM-MSCs alogénicas, em combinação com ácido hialurónico, na redução da progressão da OA (72).

Derivadas de tecido sinovial (S-MSCs)

Embora alvo de menos estudos, há evidência de que as S-MSCs aumentam a expressão genética de proteínas condroprotetoras como BMPs, PRG-4 e um gene anti-inflamatório, TSG-6 (30). Estas são as MSCs descritas como tendo o maior potencial condrogénico, seguidas das BM-MSCs (73). Ensaio em modelos de ratos comprovaram que injeções periódicas de S-MSCs na articulação resulta na sua migração para a sinovial e impedem a progressão da OA. No entanto estas células não sobrevivem a longo prazo no local da lesão e uma única administração não é eficaz no tratamento da OA (30).

7.1.3. Terapias de indução celular

As terapias de indução celular podem ser categorizadas segundo a sua função em indutoras da condrogênese, inibidoras da osteogênese, inibidoras da degradação da matriz, anti-apoptóticas e anti-inflamatórias. Estas podem ser usadas isoladamente ou como apoio às terapias celulares. A proteína morfogénica óssea 7 (BMP-7), os inibidores da interleucina-1 β e o fator de crescimento de fibroblastos foram propostos para o tratamento da OA com resultados na redução da dor.

A utilização de PRP isoladamente, injetado intra-articularmente, está vastamente estudada para o tratamento da OA. Esta terapia, para além de segura, confere melhorias sintomáticas e funcionais relevantes, sendo por isso bastante promissora. (6)

7.1.4. Engenharia de tecidos

As abordagens da engenharia de tecidos no tratamento da OA focam-se sobretudo na criação de biomateriais que mimetizem as funções e o ambiente nativo da cartilagem. O desenvolvimento destas condições permite uma melhor e mais prolongada integração das células no tecido a ser implantado e contribui para a diferenciação das MSCs em células com fenótipo mais semelhante aos condrócitos (74,75). Por exemplo, a criação de biorreatores hidrostáticos que permitam a aplicação de pressões controladas (76) e a recriação de um ambiente hipóxico (77) resultou no aumento da diferenciação das MSCs, com maior expressão dos genes da cartilagem normal, maior produção de glicoaminoglicanos e colagénio tipo II (76) e diminuição da displasia hipertrófica associada (77).

Outras técnicas de engenharia de tecidos como a impressão 3D (78) ou o *Bioprinting* (79) têm surgido com o potencial para replicar estruturas como cartilagem e outros componentes ósseos (80,81) permitindo uma correção adaptada ao defeito osteoarticular.

O conhecimento mais aprofundado do papel de algumas moléculas na evolução da doença pode conduzir ao desenvolvimento novas terapias. Por exemplo, miRNAs envolvidos no desenvolvimento da cartilagem (miRNA-140 e o miRNA-455) (82) podem ser embalados em exossomas para uso terapêutico. Ou podem ser desenvolvidos hidrogéis injetáveis com fatores de crescimento transformantes (como o TGF- β 3), que possuem um papel importante na reparação da cartilagem articular e que poderão significar uma opção de tratamento minimamente invasiva para a OA (8). Advoga-se que se as MSCs forem cultivadas em condições semelhantes às de um condrócito que sofre alterações osteoartríticas libertarão exossomas condroprotetores. Do conhecimento desses produtos exossomais poderá resultar outra abordagem terapêutica que resulte na regeneração da cartilagem (9).

7.2. Lesões tendinosas

As lesões tendinosas são particularmente prevalentes na população idosa e em atletas, sujeitos a maior sobrecarga mecânica e associam-se a uma elevada morbidade. Os tendões são constituídos por fibras de colagénio tipo I (mais abundantemente), III e IV, fibras elásticas, matriz extracelular e tenócitos. Este tecido conjuntivo e músculo-elástico une os músculos aos ossos e deve ter a capacidade de resistir a grandes forças de tensão, absorver choques e prevenir a lesão muscular (83). Quando o limiar de resistência dos tendões é ultrapassado, ocorre a lesão e inicia-se um processo de cicatrização. Este processo caracteriza-se pela proliferação de fibroblastos com conseqüente estimulação da migração celular para o local da lesão e produção de uma nova matriz extra celular (84). Esta remodelação do tendão é muito prolongada e resulta num tecido com características diferentes do tecido nativo. O tendão cicatrizado é caracterizado pela disposição desorganizada das fibras de colagénio, aumento do colagénio tipo III e uma matriz extracelular com qualidades distintas das do tendão saudável (83). Conseqüentemente o tendão é menos resistente, há limitação da mobilidade do membro e dor crónica associada (5).

7.2.1. Terapias Celulares

Várias fontes celulares têm sido estudadas para o tratamento de tendinopatias. O transplante autólogo de BM-MSCs em modelos animais resultou em recuperação histológica e biomecânica do tendão lesionado, com melhoria sintomática e diminuição de recidivas (85). A combinação de AD-MSC com PRP, de forma a fornecer células e proteínas com ações regenerativas simultaneamente também se mostrou benéfica. Foram obtidos tendões com características semelhantes às do tecido saudável, resultando na melhoria funcional significativa (46). Há, no entanto, alguma preocupação relativamente à formação ectópica de outros tipos celulares, sobretudo de tecido ósseo. A recriação das condições ambientais nativas do tecido e a identificação de marcadores específicos dos tenócitos poderá resultar na maior segurança e eficácia desta terapia. Já se demonstrou o efeito potenciador de um pré-condicionamento hipóxico para a proliferação e diferenciação de AD-MSCs em linhagens de tenócitos (86).

O transplante autólogo de tenócitos já foi testado em pacientes com lesão do tendão extensor comum, com resultados favoráveis na recuperação de função. No entanto, como nem todos apresentaram melhoria a nível imagiológico e por o estudo ter uma amostra de pequenas dimensões, o nível de evidência do benefício deste tratamento foi baixo (87). Outra limitação destas células é a sua restrita taxa de proliferação, que prejudica a sua preparação *in vitro* antes do transplante (5).

Outro tipo celular que tem sido alvo de investigação para o tratamento de lesões tendinosas são os fibroblastos dérmicos humanos. Estas células após diferenciação *in vitro* são transplantadas para o local da lesão. A recuperação estrutural e funcional dos tendões, a curto prazo, foi comprovada com esta terapia, realizada em humanos. A diminuição da dor nestes pacientes foi consistente com essa recuperação (88).

7.2.2. Terapias de indução celular

As aplicações de várias citocinas e fatores de crescimento no tratamento de lesões tendinosas estão, atualmente, a ser estudadas. Entre eles, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), o fator de crescimento fibroblástico básico (BFGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e BMPs. No entanto, como estes fatores podem induzir fibrose ou deposição desorganizada do colagénio, mais estudos são necessários para definir as suas concentrações e métodos de aplicação ideais (5).

O PRP também se revelou promissor no tratamento destas lesões. Um grande obstáculo que se opõe à realização desta terapia é a falta de padronização da composição do PRP entre os estudos. Um estudo recente comparou o efeito de PRPs com composições diferentes: L-PRP (com leucócitos) e o P-PRP (puro sem leucócitos). Concluiu-se que o L-PRP induziu respostas catabólicas e inflamatórias nos tenócitos diferenciados, enquanto que o P-PRP induziu principalmente as respostas anabólicas. Portanto, o L-PRP não deve ser utilizado no tratamento de lesões crónicas quando a inflamação e a degeneração estão envolvidas, mas é benéfico na fase inicial da cicatrização. O P-PRP deve ser evitado em lesões agudas em adultos jovens, sob o risco de induzir a formação excessiva de tecido cicatricial. Os seus efeitos anabólicos podem ser úteis em fases tardias da cicatrização, em lesões crónicas (43).

7.2.3. Engenharia de tecidos

De forma a criar um ambiente favorável à cicatrização do tendão, têm sido desenvolvidos biomateriais que atuam como suporte às terapias celulares e de indução celular. O material de suporte ideal deve ser biocompatível, fornecer substâncias que promovam a cicatrização e recriar a matriz extracelular do tecido saudável. A aplicação de hidrogéis com polímeros naturais ou sintéticos, como o colagénio, o ácido hialurónico ou polietilenoglicol poderá resultar na cicatrização completa e mais rápida do tecido (89).

Um outro biomaterial que se tem mostrado promissor são os tendões descelularizados. A semelhança estrutural ao tecido saudável permite que as células estaminais, aí suportadas, proliferem de forma a recriar o tendão nativo. Estudos em modelos animais demonstraram a formação de neo-tendões com fenótipo comparável ao do tecido saudável, usando este biomaterial de suporte. A combinação do suporte descelularizado com a terapia celular parece ser vantajosa relativamente à terapia celular isolada (90).

7.3. Degeneração do disco intervertebral

A degeneração do disco intervertebral (DDIV) é a causa mais comum de lombalgias crónicas. Afeta aproximadamente 632 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo um significativo impacto social e económico (3,12).

O núcleo pulposo constitui a parte central do disco e é composto por células condrócitos-*like*, água e uma matriz extracelular contendo principalmente colagénio tipo II e agreganos (proteoglicanos que contribuem para a hidratação e elasticidade do disco) (91). A hidratação dos discos é essencial para a sua elasticidade e, portanto, para a mobilidade do tronco. Quando há um desequilíbrio entre síntese e degradação desta matriz, dá-se a degeneração do disco. Este desequilíbrio pode ser causado por sobrecarga mecânica ou influenciada por fatores genéticos ou inflamatórios (92).

Cuidados como fisioterapia e injeções epidurais de corticosteroides podem resultar num controlo sintomático inicialmente, mas não alteram a história natural da doença. As opções cirúrgicas, em particular, a fusão espinhal lombar que não garantem o alívio total da dor, podem apresentar complicações e morbidade significativas e não promovem a regeneração do disco (93).

As terapias celulares ou de indução celular para esta lesão visam a regeneração tecidual, o controlo da resposta inflamatória e a produção de uma matriz extracelular favorável à função fisiológica dos discos intervertebrais (3).

7.3.1. Terapias celulares

Em estados mais tardios da DDIV, quando o número de células do disco está bastante diminuído, torna-se preferível a opção por terapias celulares. É essencial que as células transplantadas tenham a capacidade de produzir uma matriz extracelular semelhante às dos discos saudáveis e que possuam uma elevada sobrevida após o transplante.

Tal como para as restantes lesões nociceptivas abordadas, um ambiente hipóxico parece ter efeitos benéficos que podem afetar a eficácia destas terapias no disco. A cultura hipóxica aumenta a expressão de genes e fatores específicos resultando num aumento da capacidade anti-apoptótica, de autorrenovação e de proliferação das MSCs em comparação com culturas sob condições normóxicas (86,94).

Implante Autólogo de Condrócitos articulares ou do disco intervertebral

Condrócitos de disco recolhidos a partir de discos herniados podem ser cultivados *in vitro* e reimplantados no espaço intervertebral. Estas células têm a capacidade de produzir uma matriz semelhante à do tecido saudável. Ensaios clínicos em pacientes com indicação cirúrgica demonstraram que com esta terapia celular foi possível recuperar a altura do disco e diminuir a dor a longo prazo (95). As principais limitações associadas a esta terapia relacionam-se com a morbilidade associada à obtenção das células e com a dificuldade na manutenção do fenótipo celular após expansão *in vitro* (44).

Foi sugerido que os condrocitos articulares autólogos, também usados para o tratamento da OA, também fossem úteis para o tratamento da DDIV, devido à sua capacidade de produzirem agregado e colagénio tipo II. No entanto, como a proporção entre proteoglicanos e colagénio não é semelhante à do tecido saudável, há algumas reservas na sua aplicação (96).

Células estaminais mesenquimais (MSCs)

A principal vantagem do uso das MSCs comparativamente com as restantes terapias celulares é a sua acessibilidade. A sua eficácia na regeneração do disco foi comprovada em modelos animais (44). Atualmente estão a ser realizados ensaios clínicos com resultados entusiasmantes. Um estudo com cinco pacientes revelou que as BM-MSCs autólogas são adequadas para o tratamento da DDIV, com melhoria sintomática e funcional relatada pelos pacientes e sem efeitos adversos. Após o tratamento, os doentes foram acompanhados durante 6 anos com RM que mostrou redução da protusão do disco e manutenção da altura do disco (3). Outros dois ensaios clínicos em doze pacientes no total revelaram resultados semelhantes (44). Apesar dos resultados serem encorajadores, um estudo clínico duplamente cego, randomizado e controlado com número significativo de pacientes e a implementação de medidas standardizadas validadas devem ser os próximos passos a fim de demonstrar a eficácia desta terapia celular.

7.3.2. Terapias de indução celular

As biomoléculas usadas no tratamento da DDIV caracterizam-se pelas seguintes ações: indução da síntese de matriz ou inibição da sua degradação e inibição da inflamação. Destacam-se as BMPs, o fator de crescimento e diferenciação 5 (GDF-5) e os TGF- β , pela sua capacidade, bem estudada, de induzir a formação de uma matriz rica em proteoglicanos e colagénio tipo I e II (44,97). O IGF-1 e o IDGF são conhecidos pela capacidade de reduzir a percentagem de células apoptóticas e podem também ser úteis no tratamento da DDIV (98). A limitação associada à curta duração do efeito terapêutico destes fatores poderá ser superada recorrendo-se a biomateriais desenvolvidos por engenharia de tecidos, de libertação lenta, ou induzindo-se alterações na expressão génica das células do disco (44).

As aplicações do PRP também se têm mostrado promissoras no tratamento da DDIV. A elevada concentração de fatores de crescimento, como os mencionados acima, tornaram-no alvo de interesse. Foi comprovada, em modelos animais, a sua capacidade de induzir a reparação do disco, com restauração da altura e hidratação semelhantes às do disco saudável (44,45).

7.3.3. Engenharia de tecidos

Vários materiais foram estudados para recriar a propriedades mecânicas e bioquímicas dos discos intervertebrais saudáveis, entre eles destacam-se os compostos de ácido hialurónico e os polímeros sintéticos, como o ácido poliglicólico. Estes compostos podem ser utilizados como substrato para o transplante das células estaminais, recriando um ambiente mais favorável à regeneração do disco (44).

A criação de um disco intervertebral inteiramente desenvolvido *in vitro*, a partir da engenharia de tecidos, já é possível. Estes discos são constituídos por substâncias que simulam a matriz nativa do disco (ácido poliglicólico e poliláctico) e células do núcleo pulposo (alteradas geneticamente ou não). O implante total destes discos já foi testado em modelos animais, que foram acompanhados por 6 meses, com bons resultados na manutenção de altura do disco. No entanto, são necessários mais estudos antes da transposição para ensaios clínicos em humanos (44).

8. Conclusão

Devido ao desenvolvimento da medicina regenerativa e ao mais aprofundado conhecimento da fisiopatologia da dor crónica, há agora uma maior oferta de soluções para a redução da dor e aumento da capacidade funcional destes doentes.

As terapias avançadas para o tratamento da dor crónica não oncológica são bastante promissoras, possuindo como principal vantagem a capacidade de alterar o curso natural da doença. Destacam-se as terapias celulares autólogas adjuvadas por produtos produzidos por engenharia de tecidos, que correspondem às técnicas mais vastamente estudadas e com maior aplicabilidade nas causas de dor descritas nesta revisão. O potencial terapêutico destes tratamentos está comprovado e, de uma forma geral, supera as terapias tradicionais no controlo da dor crónica não oncológica a longo prazo e na recuperação da funcionalidade.

Na dor neuropática por lesão medular a aplicação das terapias avançadas a humanos ainda não está bem estudada. Contudo, os estudos em animais com MSCs de diferentes origens mostraram-se promissores, sobretudo se geneticamente modificadas para expressarem fatores antinociceptivos ou neurotróficos.

Na osteoartrose destacam-se as terapias celulares com BM-MSCs autólogas por já terem sido testadas em humanos e se revelarem eficazes na redução da dor e na recuperação da mobilidade articular.

Obtiveram-se bons resultados na recuperação de lesões tendinosas com a injeção de fibroblastos dérmicos humanos diferenciados em células tenócitos-*like*. Para esta etiologia de dor crónica há alguma expectativa relativamente ao desenvolvimento de tendões descelularizados e à sua aplicação juntamente com as terapias celulares em desenvolvimento.

Na degeneração do disco intervertebral várias terapias celulares foram já alvo de ensaios clínicos com resultados favoráveis, entre eles, o implante de condrócitos autólogos do disco ou de BM-MSCs autólogas.

A maioria das terapias avançadas para o controlo da dor, porém, não está ainda aprovada ou disponível para ser prontamente aplicada. A principal limitação à aprovação destas terapias é a inexistência de um procedimento estandardizado, eficaz, eficiente e seguro para a recolha da células, cultura e aplicação do tratamento. A dilação na criação destes procedimentos poderá também estar relacionada com o elevado investimento de recursos (médicos e biotecnológicos) que é necessário para a aplicação destas terapias tão complexas e específicas. Desta forma e atendendo aos perigos que podem estar associados a estas terapias, é prioritária a criação de um rigoroso sistema de controlo de qualidade e viabilidade que torne os procedimentos mais eficientes e seguros.

Referências Bibliográficas

1. Brookoff D. Chronic pain: 1. A new disease? *Hosp Pract* (1995). 2000 Jul;35(7):45-52,59.
2. Turk DC, Wilson HD, Cahana A. Treatment of chronic non-cancer pain. *Lancet*. 2011;377(9784):2226-35.
3. Elabd C, Centeno CJ, Schultz JR, Lutz G, Ichim T, Silva FJ. Intra-discal injection of autologous, hypoxic cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in five patients with chronic lower back pain: a long-term safety and feasibility study. *J Transl Med* [Internet]. 2016;14:253. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27585696>
4. Basbaum AI, Braz JM. Cell transplants to treat the “disease” of neuropathic pain and itch. *Pain*. 2016;157 Suppl:S42-7.
5. Correia SI, Pereira H, Silva-Correia J, Van Dijk CN, Espregueira-Mendes J, Oliveira JM, et al. Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint. *J R Soc Interface*. 2013;11(92):20130784.
6. Zhang W, Ouyang H, Dass CR, Xu J. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Res* [Internet]. 2016;4(October 2015):15040. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26962464>
7. Bernhard JC, Vunjak-Novakovic G. Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration? *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2016;7(1):56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0314-3>
8. Almeida H V., Eswaramoorthy R, Cunniffe GM, Buckley CT, O'Brien FJ, Kelly DJ. Fibrin hydrogels functionalized with cartilage extracellular matrix and incorporating freshly isolated stromal cells as an injectable for cartilage regeneration. *Acta Biomater* [Internet]. 2016;36:55-62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.008>
9. Burke J, Kolhe R, Hunter M, Isales C, Hamrick M, Fulzele S. Stem cell-derived exosomes: A potential alternative therapeutic agent in orthopaedics. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5-8.
10. Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain. Seattle IASP Press. 1994;
11. Stein C, Kopf A. Chapter 64 - Anesthesia and Treatment of Chronic Pain [Internet]. Eighth Edi. *Miller's Anesthesia*. Elsevier Inc.; 2015. 1898-1918.e5 p. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702052835000643>

12. Treede R, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, et al. A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain*. 2015;156(6):1003-7.
13. Azevedo LF, Costa-Pereira A, Mendonça L, Dias CC, Castro-Lopes JM. Epidemiology of Chronic Pain: A Population-Based Nationwide Study on Its Prevalence, Characteristics and Associated Disability in Portugal. *J Pain [Internet]*. 2012 Apr 8;13(8):773-83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2012.05.012>
14. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2015;14(2):162-73.
15. Gilron I, Baron R, Jensen T. Neuropathic pain: Principles of diagnosis and treatment. In: *Mayo Clinic Proceedings*. 2015. p. 532-45.
16. Haroutiunian S, Nikolajsen L, Finnerup NB, Jensen TS. The neuropathic component in persistent postsurgical pain: A systematic literature review. *Pain [Internet]*. 2013;154(1):95-102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2012.09.010>
17. Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, et al. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy - a review. *BMC Musculoskelet Disord [Internet]*. 2016;17(1):230. Available from: <http://bmcmsculoskeletdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12891-016-1085-9>
18. Yousefifard M, Nasirinezhad F, Shardi Manaheji H, Janzadeh A, Hosseini M, Keshavarz M. Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model. *Stem Cell Res Ther [Internet]*. 2016;7(1):36. Available from: <http://stemcellres.com/content/7/1/36>
19. Wang S, Qu X, Zhao RC. Mesenchymal stem cells hold promise for regenerative medicine. *Front Med China*. 2011;5(4):372-8.
20. Zhang D, Jiang W. From one-cell to tissue: Reprogramming, cell differentiation and tissue engineering. *Bioscience*. 2015;65(5):468-75.
21. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov;131(5):861-72.
22. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic

- and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug;126(4):663-76.
23. Burke J, Hunter M, Kolhe R, Isales C, Hamrick M, Fulzele S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. *Clin Transl Med*. 2016 Dec 10;5(1):27.
 24. Augustyniak E, Trzeciak T, Richter M, Kaczmarczyk J, Suchorska W. The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration. *Int Orthop* [Internet]. 2015;39(5):995-1003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00264-014-2619-0>
 25. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*. 2006 Sep;30(9):681-7.
 26. Hosseini M, Yousefifard M, Aziznejad H, Nasirinezhad F. The Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Allodynia and Hyperalgesia in Neuropathic Animals: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(9):1537-44.
 27. Nazempour A, Van Wie BJ. Chondrocytes, Mesenchymal Stem Cells, and Their Combination in Articular Cartilage Regenerative Medicine. Vol. 44, *Annals of Biomedical Engineering*. 2016. p. 1325-54.
 28. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M. Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells: Two-Year Follow-up Results. *Transplantation* [Internet]. 2014;97(11):e66-7. Available from: http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKP_TLP:landingpage&an=00007890-201406150-00021
 29. Emadedin M, Ghorbani Liastani M, Fazeli R, Mohseni F, Moghadasali R, Mardpour S, et al. Long-Term Follow-up of Intra-articular Injection of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Patients with Knee, Ankle, or Hip Osteoarthritis. *Arch Iran Med*. 2015 Jun;18(6):336-44.
 30. Ozeki N, Muneta T, Koga H, Nakagawa Y, Mizuno M, Tsuji K, et al. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2016;24(6):1061-70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.12.018>
 31. Koh YG, Choi YJ. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. *Knee*. 2012;19(6):902-7.

32. Pak J, Lee JH, Park KS, Jeong BC, Lee SH. Regeneration of Cartilage in Human Knee Osteoarthritis with Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Autologous Extracellular Matrix. *Biores Open Access* [Internet]. 2016;5(1):192-200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27588219>
33. Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse HF, Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: Current status and perspectives. *Cell Transplant* [Internet]. 2014;23(9):1045-59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23676629>
34. Veeravalli KK, Dasari VR, Tsung AJ, Dinh DH, Gujrati M, Fassett D, et al. Human umbilical cord blood stem cells upregulate matrix metalloproteinase-2 in rats after spinal cord injury. *Neurobiol Dis*. 2009;36(1):200-12.
35. Caplan AI, Correa D. The MSC: An injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):11-5.
36. Vonk LA, de Windt TS, Slaper-Cortenbach IC, Saris DB. Autologous, allogeneic, induced pluripotent stem cell or a combination stem cell therapy? Where are we headed in cartilage repair and why: a concise review. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:94.
37. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. Vol. 28, *Stem Cells*. 2010. p. 585-96.
38. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31(10):890-6.
39. Sordi V, Piemonti L. Therapeutic plasticity of stem cells and allograft tolerance. *Cytotherapy* [Internet]. 2011;13(6):647-60. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14653249.2011.583476%5Cnpapers3:/publication/doi/10.3109/14653249.2011.583476>
40. Pawan K Gupta, Anjan K Das² AC and ASM. Mesenchymal stromal cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2012;24(8):1307-16.
41. Alsuhaibani O, Pereira WC, Tareeqanwar M, Khizzi NE, Bakheswain S, Shaker A, et al. Infectious disease screening among stem cell transplant donors: An Institutional experience in Saudi Arabia. *Ann Neurosci*. 2015;22(0972-7531 (Print)):81-6.
42. Yu H, Fischer G, Ebert AD, Wu H-E, Bai X, Hogan QH. Analgesia for neuropathic pain by dorsal root ganglion transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells: initial results. *Mol Pain* [Internet]. 2015;11(1):5. Available from: <http://molecularpain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12990-015-0002-9>

43. Zhou Y, Zhang J, Wu H, Hogan M V, Wang JH-C. The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015;6:173. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4572462&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
44. Moriguchi Y, Alimi M, Khair T, Manolarakis G, Berlin C, Bonassar LJ, et al. Biological Treatment Approaches for Degenerative Disk Disease: A Literature Review of In Vivo Animal and Clinical Data. *Glob Spine J*. 27.01.2016. 2016;6(5):497-518.
45. Obata S, Akeda K, Imanishi T, Masuda K, Bae W, Morimoto R, et al. Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: a preclinical study. *Arthritis Res Ther*. 2012 Nov;14(6):R241.
46. Guercio A, Di Marco P, Casella S, Russotto L, Puglisi F, Majolino C, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived From Subcutaneous Fat and Platelet-Rich Plasma Used in Athletic Horses With Lameness of the Superficial Digital Flexor Tendon. *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2015 Jan 24;35(1):19-26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2014.10.006>
47. Jergova S, Gajavelli S, Pathak N, Sagen J. Recombinant neural progenitor transplants in the spinal dorsal horn alleviate chronic central neuropathic pain. *Pain* [Internet]. 2016;157(4):977-89. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84973401304&partnerID=40&md5=982d35c9c043b8e5148c11f59e5e09d7>
48. Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009;11 VN-r(9):1143-9. Available from: [/Users/yurikoharigaya/Documents/ReadCubeMedia/gibbings2009.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/ncb1929](http://Users/yurikoharigaya/Documents/ReadCubeMedia/gibbings2009.pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/ncb1929)
49. Moore a., Derry S, Eccleston C, Kalso E. Expect analgesic failure; pursue analgesic success. *Br Med J* [Internet]. 2013;346(may03 1):f2690-f2690. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.f2690>
50. Moore RA, Derry S, Wiffen PJ. Challenges in design and interpretation of chronic pain trials. *Br J Anaesth* [Internet]. 2013;111(1):38-45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23794643>
51. Lee JW, Jergova S, Furmanski O, Gajavelli S, Sagen J. Predifferentiated GABAergic

neural precursor transplants for alleviation of dysesthetic central pain following excitotoxic spinal cord injury. *Front Physiol.* 2012;3 MAY(May):1-12.

52. Stanislava Jergova, Ian D. Hentall, Shyam Gajavelli, Mathew S. Varghesea and JS. Intraspinal transplantation of GABAergic neural progenitors attenuates neuropathic pain in rats: a pharmacologic and neurophysiological evaluation. *Computer (Long Beach Calif).* 2011;144(5):724-32.
53. Finnerup NB. Pain in patients with spinal cord injury. In: *Pain.* 2013.
54. Oyibo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: A nugget of this multiply cascade. Vol. 71, *Acta Neurobiologiae Experimentalis.* 2011. p. 281-99.
55. Kuchroo P, Dave V, Vijayan A, Viswanathan C, Ghosh D. Paracrine Factors Secreted by Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Angiogenesis In Vitro by a VEGF-Independent Pathway. *Stem Cells Dev.* 2015;24(4):437-50.
56. Hua J, He Z-G, Qian D-H, Lin S-P, Gong J, Meng H-B, et al. Angiopoietin-1 gene-modified human mesenchymal stem cells promote angiogenesis and reduce acute pancreatitis in rats. *Int J Clin Exp Pathol [Internet].* 2014;7(7):3580-95. Available from: www.ijcep.com
57. Kabu S, Gao Y, Kwon BK, Labhasetwar V. Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. *J Control Release [Internet].* 2015;219:141-54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.060>
58. Tang L, Lu X, Zhu R, Qian T, Tao Y. Adipose-Derived Stem Cells Expressing the Neurogenin-2 Promote Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Rat. *Cell Mol Neurobiol.* 2015;
59. Xu Q, Zhang M, Liu J, Li W. Intrathecal transplantation of neural stem cells appears to alleviate neuropathic pain in rats through release of GDNF. *Ann Clin Lab Sci.* 2013;43(2):154-62.
60. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grøntvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am [Internet].* 2007;89(10):2105-12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17908884>
61. Mardones R, Jofré CM, Minguell JJ. Cell therapy and tissue engineering approaches for cartilage repair and/or regeneration. *Int J Stem Cells.* 2015;8(1):48-53.
62. Ko J-Y, Kim K-I, Park S, Im G-I. In vitro chondrogenesis and in vivo repair of

- osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 2014 Apr;35(11):3571-81.
63. Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, et al. Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells. *Biomed Res*. 2015;36(3):179-86.
64. Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*. 2013 Oct;502(7469):65-70.
65. Toghraie FS, Chenari N, Gholipour M a, Faghieh Z, Torabinejad S, Dehghani S, et al. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. *Knee* [Internet]. 2011;18(2):71-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20591677>
66. Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* (80-) [Internet]. 1999;284(5411):143-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814><http://science.sciencemag.org.gate1.inist.fr/content/284/5411/143.abstract>
67. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;4;276(5309):71-4.
68. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res*. 2001;268(2):189-200.
69. Dar A, Goichberg P, Shinder V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N, et al. Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2005 Oct;6(10):1038-46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni1251>
70. Afizah H, Yang Z, Hui JHP, Ouyang H-W, Lee E-H. A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue Eng*. 2007 Apr;13(4):659-66.
71. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai B-C, Lee EH. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med* [Internet]. 2010;38(6):1110-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392971>
72. Chiang E-R, Ma H-L, Wang J-P, Liu C-L, Chen T-H, Hung S-C. Allogeneic Mesenchymal

- Stem Cells in Combination with Hyaluronic Acid for the Treatment of Osteoarthritis in Rabbits. PLoS One [Internet]. 2016;11(2):e0149835. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26915044><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4767225>
73. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005 Aug;52(8):2521-9.
 74. Hayes AJ, MacPherson S, Morrison H, Dowthwaite G, Archer CW. The development of articular cartilage: evidence for an appositional growth mechanism. *Anat Embryol (Berl)* [Internet]. 2001;203(6):469-79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s004290100178>
 75. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* [Internet]. 2006;97(1):33-44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20652>
 76. Ogawa R, Mizuno S, Murphy GF, Orgill DP. The effect of hydrostatic pressure on three-dimensional chondroinduction of human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009 Oct;15(10):2937-45.
 77. Gawlitta D, van Rijen MHP, Schrijver EJM, Alblas J, Dhert WJA. Hypoxia impedes hypertrophic chondrogenesis of human multipotent stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2012 Oct;18(19-20):1957-66.
 78. Garg T, Goyal AK. Biomaterial-based scaffolds - current status and future directions. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2014;11(5):767-89. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/17425247.2014.891014>
 79. Cui X, Breitenkamp K, Finn MG, Lotz M, D'Lima DD. Direct Human Cartilage Repair Using Three-Dimensional Bioprinting Technology. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2012;18(11-12):1304-12. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2011.0543>
 80. Cohen DL, Lipton JI, Bonassar LJ, Lipson H. Additive manufacturing for in situ repair of osteochondral defects. *Biofabrication* [Internet]. 2010;2(3):35004. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79952108287&partnerID=tZOtx3y1>
 81. Fedorovich NE, Schuurman W, Wijnberg HM, Prins H-J, van Weeren PR, Malda J, et al. Biofabrication of osteochondral tissue equivalents by printing topologically defined, cell-laden hydrogel scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2012;18(1):33-44. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3245674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

82. Min Z, Zhang R, Yao J, Jiang C, Guo Y, Cong F, et al. Micrnas associated with osteoarthritis differently expressed in bone matrix gelatin (BMG) rat model. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(1):1009-17.
83. Sharma P, Maffulli N. Biology of tendon injury: Healing, modeling and remodeling. Vol. 6, *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*. 2006. p. 181-90.
84. Liu C-F, Aschbacher-Smith L, Barthelery NJ, Dymment N, Butler D, Wylie C. What we should know before using tissue engineering techniques to repair injured tendons: a developmental biology perspective. *Tissue Eng Part B Rev [Internet]*. 2011;17(3):165-76. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314435>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3098959>
85. Smith RKW, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. Beneficial Effects of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Naturally Occurring Tendinopathy. *PLoS One*. 2013;8(9).
86. Yu Y, Zhou Y, Cheng T, Lu X, Yu K, Zhou Y, et al. Hypoxia enhances tenocyte differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells by inducing hypoxia-inducible factor-1 α in a co-culture system. *Cell Prolif*. 2016;49(2):173-84.
87. Wang A, Breidahl W, Mackie KE, Lin Z, Qin A, Chen J, et al. Autologous tenocyte injection for the treatment of severe, chronic resistant lateral epicondylitis: a pilot study. *Am J Sports Med [Internet]*. 2013;41(12):2925-32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068695>
88. Clarke AW, Alyas F, Morris T, Robertson CJ, Bell J, Connell DA. Skin-derived tenocyte-like cells for the treatment of patellar tendinopathy. *Am J Sports Med*. 2011 Mar;39(3):614-23.
89. Qiu Y, Lim JJ, Scott L, Adams RC, Bui HT, Temenoff JS. PEG-based hydrogels with tunable degradation characteristics to control delivery of marrow stromal cells for tendon overuse injuries. *Acta Biomater*. 2011;7(3):959-66.
90. Ning LJ, Zhang YJ, Zhang Y, Qing Q, Jiang YL, Yang JL, et al. The utilization of decellularized tendon slices to provide an inductive microenvironment for the proliferation and tenogenic differentiation of stem cells. *Biomaterials*. 2015;52(1):539-50.

91. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J, ., ., et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2006;88 Suppl 2(suppl 2):10-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595436>
92. Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA, Eyre DR, et al. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2007;35(Pt 4):652-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635113>
93. Baliga S, Treon K, Craig NJA. Low Back Pain: Current Surgical Approaches. *Asian Spine J*. 2015 Aug;9(4):645-57.
94. Tsai C-C, Yew T-L, Yang D-C, Huang W-H, Hung S-C. Benefits of hypoxic culture on bone marrow multipotent stromal cells. *Am J Blood Res* [Internet]. 2012;2(3):148-59. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3484415&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
95. Hohaus C, Ganey TM, Minkus Y, Meisel HJ. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease. Vol. 17, *European Spine Journal*. Berlin/Heidelberg; 2008. p. 492-503.
96. Mwale F, Roughley P, Antoniou J. Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc. *Eur Cell Mater*. 2004 Dec;8:54-8.
97. Park JY, Yoon YS, Park HS, Kuh SU. Molecular response of human cervical and lumbar nucleus pulposus cells from degenerated discs following cytokine treatment. *Genet Mol Res*. 2013 Mar;12(1):838-51.
98. Gruber HE, Norton HJ, Hanley ENJ. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000 Sep;25(17):2153-7.

