

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/09/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

POTENCIAL DE TRANSDIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS EQUINAS EM CÉLULAS *SCHWANN-LIKE*

LUCAS VINÍCIUS DE OLIVEIRA FERREIRA

Botucatu – SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ‘JULIO DE MESQUITA FILHO’
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

POTENCIAL DE TRANSDIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS EQUINAS EM CÉLULAS *SCHWANN-LIKE*

LUCAS VINÍCIUS DE OLIVEIRA FERREIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus
de Botucatu, Unesp, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof.Dr. Rogério Martins
Amorim

Botucatu – SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ferreira, Lucas Vinícius de Oliveira.

Potencial de transdiferenciação *in vitro* de células tronco mesenquimais equinas em células *Schwann-Like* / Lucas Vinícius de Oliveira Ferreira. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Rogério Martins Amorim

Capes: 50501062

1. Células de *Schwann*. 2. Regeneração nervosa.
3. Traumatismos dos nervos periféricos. 4. Nervo facial.
5. Fatores de crescimento neural. 6. Transdiferenciação celular.

Palavras-chave: Células *Schwann-like*; Fatores neurotróficos; Lesão de nervo periférico; Nervo facial; Regeneração nervosa.

Título: POTENCIAL DE TRANSDIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EQUINAS EM CÉLULAS *SCHWANN-LIKE*

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro da Banca

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ – UNESP – Botucatu, São Paulo.

Dr. Diego Noé Rodríguez Sánchez

Membro da Banca

Unicamp – Campinas, São Paulo.

Data da Defesa: 20 de setembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço ao meu orientador, Professor Rogério Martins Amorim, pela orientação, apoio, incentivo, e ensinamentos fornecidos desde a época do estágio curricular, passando pela residência até aqui.

À Amanda por todo apoio, ajuda e companheirismo em todos os momentos.

Aos colegas de trabalho e amigos, Beatriz, João e Natielly pela ajuda concedida para a realização deste trabalho.

Ao Diego Noé por todo ensinamento, disponibilidade e ajuda concedida para realização deste trabalho.

À Thayná do laboratório LIAI (Unipex) por toda ajuda e auxílio para realizar o projeto.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Veterinária (FMVZ/Unesp), em especial ao Marco, funcionário da Clínica de Grandes Animais, por toda ajuda e apoio.

Aos amigos que estiveram ou não presentes neste caminho.

À minha família, por serem um exemplo de vida e por estarem sempre ao meu lado.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1 - The Primer Sets Used for Quantitative Polymerase Chain Reaction.....	27
---	----

Capítulo 3

Table 1: Primers used in qPCR reactions.....	56
---	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figure 1 – A summary of the experimental design.....	24
Figure 2 - Characterization of morphological differentiation and viability of MSCs.....	30
Figure 3 - Relative expression of the genes of the neurotrophic factors NGF, BDNF, GDNF, GFAP and S100 β in the undifferentiated and differentiated equine AT-MSCs and BM-MSCs.....	32
Figure 4 - Immunofluorescence staining of the glial markers on undifferentiated and differentiated equine AT-MSCs.....	33
Figure 5 - Immunofluorescence staining of the glial markers on undifferentiated and differentiated equine BM-MSCs.....	35

Capítulo 3

Figure 1 - Facial nerve collection and preparation of induction medium.....	54
Figure 2 - Morphological characterization of equine UC-MSCs.....	59
Figure 3 - Relative expression of BDNF and GDNF in undifferentiated and differentiated equine UC-MSCs.....	60
Figure 4 - Immunofluorescence staining of glial markers in undifferentiated and differentiated equine UC-MSCs.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTB – beta-actina, do inglês *beta-actin*
AR – ácido all-trans- retinóico
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*
bFGF – fator de crescimento de fibroblasto básico
BME – beta-mercaptoetanol
B2M – beta -2- microglobulina, do inglês *beta -2- microglobulin*
cAMP - monofosfato cíclico de adenosina intracelular
CD – agrupamento de diferenciação, do inglês *cluster of differentiation*
cDNA – DNA complementar, do inglês *complementary DNA*
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais, do inglês *Ethics Committee in the Use of Animals*
CNTF – fator neurotrófico ciliar
CS- células de Schwann, do inglês *Schwann cells* (SCs)
CSL- células *Schwann-like*, do inglês *Schwann-like cells* (SLCs)
CTM – células tronco mesenquimais, do inglês *mesenchymal stem cells* (MSCs)
CTM – MO – células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, do inglês *mesenchymal stem cells derived from bone marrow* (BM-MSCs)
CTM – TA – células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, do inglês *mesenchymal stem cells derived from adipose tissue* (AT-MSCs)
CTM– CU – células tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical, do inglês *mesenchymal stem cells derived from umbilical cord* (UC-MSCs)
DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DPBS- *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
FGF-2 – fator de crescimento dos fibroblastos -2
FSK – forskolina
GAPDH – gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase, do inglês *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GDNF – fator neurotrófico derivado da glia, do inglês *glial cell-derived neurotrophic factor*
GFAP – proteína ácida fibrilar da glia, do inglês *glial fibrillary acidic protein*
GGF2 – fator de crescimento glial -2
HGF – fator de crescimento dos hepatócitos
HPRT – hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, do inglês *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*
HRG- heregulina
IDO – indoleamina 2,3-dioxigenase
IGF – fator de crescimento semelhante a insulina
IL- interleucina
LIF – fator inibidor de leucemia
MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos – 1
MHC-II – complexo de histocompatibilidade tipo II
NGF – fator de crescimento do nervo, do inglês *nerve growth factor*
NT3- neurotrofina 3, do inglês *neurotrophin-3*
NT4- neurotrofina 4
NT5- neurotrofina 5
ON – óxido nítrico
P3-P4- passagem das CTM após o isolamento (passagem 3-4)

P75^{NTR}- receptor de baixa afinidade p75

PBS - *phosphate buffered saline*

PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE2 – prostaglandina E2

qPCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês *real-time polymerase chain reaction*

SNC- sistema nervoso central

SNP- sistema nervoso periférico, do inglês *peripheral nervous system* (PNS)

TGF- β – fator de crescimento transformador β

TNF- α – fator de necrose tumoral - α

Trks – receptores de alta afinidade tirosina quinase

VEGF-A – fator de crescimento endotelial vascular - A

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Lesão do Sistema Nervoso Periférico.....	3
2.1.1 Classificação das Lesões.....	3
2.1.2 Degeneração Nervosa.....	4
2.1.3 Envolvimento das Células de Schwann na Regeneração Nervosa.....	5
2.2 Células Tronco Mesenquimais.....	6
2.3 Potencial Mecanismo de Ação das Células Tronco Mesenquimais na Regeneração Nervosa.....	7
2.4 Células <i>Schwann-like</i>	8
3 HIPÓTESE.....	11
4 OBJETIVOS.....	11
4.1 Objetivos gerais.....	11
4.2 Objetivos específicos.....	11
5 BIBLIOGRAFIA.....	12
CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico.....	20
Abstract.....	21
Introduction.....	22
Material and methods.....	23
Results.....	29
Discussion.....	37
Conclusion.....	39
References.....	41
CAPÍTULO 3 – Trabalho Científico.....	49
Abstract.....	50
Introduction.....	51
Material and methods.....	52
Results.....	58

Discussion.....	62
Conclusion.....	63
References.....	65

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO GERAL.....	68
CONCLUSÕES GERAIS.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	71

FERREIRA, L.V.O. **Potencial de transdiferenciação *in vitro* de células tronco mesenquimais equinas em células *schwann-like***. Botucatu, 2022. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As lesões do sistema nervo periférico (SNP) são condições clínicas comuns que podem desencadear déficits funcionais, afetando a qualidade de vida de humanos e equinos. As lesões do nervo facial são comumente observadas nestas espécies. Para o processo de regeneração, as células de Schwann (CS) são fundamentais, pois proliferam e produzem fatores neurotróficos. Contudo, a sua utilização como terapia celular é limitada devido à disponibilidade destas células e do tempo de cultivo. Neste contexto, busca-se desenvolver tecnologias ou métodos alternativos para a geração de CS. Diversos estudos demonstram a capacidade das células tronco mesenquimais (CTM) se transdiferenciarem em células de *Schwann-like* (CSL) utilizando a co-cultura com CS ou protocolos químicos. Entretanto, são métodos de difícil execução e com custos elevados. Uma abordagem mais prática para induzir a transdiferenciação *in vitro* das CTM foi descrita com sucesso utilizando meio de cultura condicionado com fatores neurotróficos secretados do nervo isquiático de ratos. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de transdiferenciação *in vitro* de CTM equinas derivadas do tecido adiposo (TA), medula óssea (MO) e cordão umbilical (CU) em CSL. Neste estudo, o nervo facial de um equino adulto foi coletado após o procedimento de eutanásia. O nervo foi seccionado em fragmentos e incubado em meio de cultura completo por 48 horas. Este meio foi filtrado e utilizado como meio de indução para transdiferenciação das CTM em CSL. As CTM foram previamente caracterizadas imunofenotipicamente pela expressão dos marcadores CD44, CD90, CD105 e ausência da expressão dos marcadores CD34 e MHC-II; e pela capacidade de diferenciação em linhagem mesenquimal osteogênica, condrogênica e adipogênica. As CTM-TA, CTM-MO, CTM-CU equinas foram incubadas com o meio de indução por cinco dias. Após este período foi avaliado a morfologia, a expressão gênica dos marcadores gliais S100 β e GFAP (proteína ácida fibrilar da glia), do fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e realizado a imunofluorescência de S100 e GFAP. As CTM-TA e CTM-MO incubadas com o meio de indução exibiram morfologia bipolar e/ou tripolar com grandes núcleos, processos citoplasmáticos alongados, semelhantes à morfologia SC. Já nas CTM-CU não foram observadas alterações morfológicas. Houve aumento significativo na expressão gênica de BDNF, GDNF, GFAP e S100 β nas CTM-TA, de GDNF, GFAP e S100 β nas CTM-MO e de GDNF nas CTM-CU pós-diferenciação. Não verificamos a expressão gênica de GFAP em nenhuma das amostras, mas a expressão de S100 β foi observada em todas as amostras após o processo de transdiferenciação das CTM-CU. A imunofluorescência revelou a expressão proteica de GFAP nas CTM-TA, CTM-MO e CTM-CU equinas indiferenciadas e diferenciadas. Entretanto, S100 foi expresso apenas em CTM-TA e CTM-MO equinas diferenciadas. Nossos resultados indicam a transdiferenciação das CTM-TA e CTM-MO equinas em CSL. Portanto, o protocolo de transdiferenciação de CTM-TA e CTM-MO equinas proposto neste estudo mostrou-se eficiente. Contudo, nossos dados não foram consistentes em relação as CTM-CU equinas e não verificamos a capacidade de transdiferenciação dessas células em CSL.

Palavras-chave: Células *Schwann-like*, fatores neurotróficos, lesão de nervo periférico, nervo facial, regeneração nervosa.

FERREIRA, L.V.O. ***In vitro* transdifferentiation potential of equine mesenchymal stem cells into schwann-like cells.** Botucatu, 2022. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Peripheral nerve system (PNS) injuries are common clinical conditions that can trigger functional deficits, affecting the quality of life of humans and horses. Facial nerve injuries are commonly seen in these species. For the regeneration process, Schwann cells (SCs) are essential, as they proliferate and produce neurotrophic factors. However, its use as cell therapy is limited due to the availability of these cells and the time of cultivation. In this context, we seek to develop alternative technologies or methods for the generation of SCs. Several studies demonstrate the ability of mesenchymal stem cells (MSCs) to transdifferentiate into Schwann-like cells (SLCs) using co-culture with SCs or chemical protocols. However, these are complicated and expensive methods. A more practical approach to induce MSCs transdifferentiation *in vitro* was successfully described using culture medium conditioned with neurotrophic factors secreted from the sciatic nerve of rats. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* transdifferentiation potential of equine MSCs derived from adipose tissue (AT), bone marrow (BM) and umbilical cord (UC) into SLCs. In this study, the facial nerve of an adult horse was collected after the euthanasia procedure. The nerve was cut into fragments and incubated in complete culture medium for 48 hours. This medium was filtered and used as an induction medium to transdifferentiate MSCs into SLCs. MSCs were previously immunophenotypically characterized by the expression of markers CD44, CD90, CD105 and absence of expression of markers CD34 and MHC-II; and by the ability to differentiate into osteogenic, chondrogenic and adipogenic mesenchymal lineages. The equine AT-MSCs, BM-MSCs, UC-MSCs were incubated with the induction medium for five days. After this period, the morphology, gene expression of glial markers S100 β and GFAP (glial fibrillary acidic protein), and nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF) and immunofluorescence of S100 and GFAP was performed. AT-MSCs and BM-MSCs incubated with the induction medium exhibited bipolar and/or tripolar morphology with large nuclei, elongated cytoplasmic processes, similar to SCs morphology. In the UC-MSCs, no morphological changes were observed. There was a significant increase in the gene expression of BDNF, GDNF, GFAP and S100 β in AT-MSCs, of GDNF, GFAP and S100 in BM-MSCs and of GDNF in UC-MSCs post-differentiation. We did not verify the gene expression in any of the GFAP samples, but the expression of S100 β was observed in all samples after the UC-MSCs transdifferentiation process. Immunofluorescence revealed GFAP protein expression in undifferentiated and differentiated equine AT-MSCs, BM-MSCs and UC-MSCs. However, S100 was expressed only in differentiated equine AT-MSCs and BM-MSCs. Our results indicate the transdifferentiation of equine AT-MSCs and BM-MSCs into SLCs. Therefore, the equine TA-MSCs and BM-MSCs transdifferentiation protocol proposed in this study proved to be efficient. However, our data were not consistent in relation to equine UC-MSCs and we did not verify the ability of these cells to transdifferentiate into SLCs.

Keywords: Schwann-like cells, neurotrophic factors, peripheral nerve injury, facial nerve, nerve regeneration.

1 INTRODUÇÃO

A lesão do sistema nervoso periférico (SNP) é uma condição clínica comum em humanos e animais que representa um grande problema econômico para a sociedade (WOJTKIEWICZ et al., 2015; RHODE et al., 2021). As causas são múltiplas e distintas, mas são comumente atribuídas à eventos traumáticos (CAILLAUD et al., 2019; PIOVESANA et al., 2021). A disfunção motora, sensorial ou autonômica é a principal consequência associada à este tipo de lesão e geralmente desencadeia déficits funcionais, afetando a qualidade de vida do paciente (RICCIO et al., 2019; ZHANG et al., 2021).

Embora o SNP apresente um potencial regenerativo, atribuído predominantemente à plasticidade das células de Schwann (CS), a reparação espontânea é na maioria das vezes insatisfatória (XIE et al., 2017; PIOVESANA et al., 2021). Assim o desenvolvimento de novos tratamentos que auxiliem na regeneração de nervos periféricos lesionados apresenta grande relevância clínica (FARONI et al., 2015).

A terapia celular tem sido proposta como uma estratégia promissora para a regeneração de nervos periféricos (YU et al., 2021). As CS são responsáveis pela síntese e expressão de fatores neurotróficos, por orientar a regeneração nervosa e promover a re mielinação (LOPATINA et al., 2011). Estudos tem demonstrados que o transplante dessas células apresenta efeitos benéficos em lesões do SNP (LEVI et al., 2016; HAN et al., 2019), contudo, sua aplicação clínica apresenta limitações relacionadas à necessidade de sacrifício de um nervo funcional para realizar o cultivo e o tempo necessário para expandir as CS pode retardar o tratamento (LIU et al., 2020; PIOVESANA et al., 2021).

Devido à estas limitações, as células tronco mesenquimais (CTM) se tornaram o foco de investigações pela sua capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares (RAMLI et al., 2019). Diversos estudos demonstraram a capacidade das CTM provenientes de diferentes fontes e espécies em se transdiferenciarem *in vitro* em células *Schwann-like* (CSL), geralmente por meio da co-cultura com CS ou utilizando protocolos químicos (LI et al., 2009; WAKAO et al., 2010; WANG et al., 2011; VILLAGRÁN et al., 2016; FU et al., 2019; JUAN et al., 2020; HOPF et al., 2020). Além disso, foi observado que o transplante de CSL *in vivo* pode auxiliar na regeneração de nervos periféricos (GEORGIOU et al., 2015; HEI et al., 2016).

Uma abordagem mais prática foi descrita com sucesso utilizando meio de cultura condicionado com fatores neurotróficos secretados do nervo isquiático de ratos para induzir a transdiferenciação *in vitro* das CTM derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) e

BIBLIOGRAFIA

ALLODI, I.; UDINA, E.; NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. *Progress in Neurobiology*, v.98, n. 1, p. 16–37, 2012.

BOORMAN, S. et al. Facial nerve paralysis in 64 equids: Clinical variables, diagnosis, and outcome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.34, n.3, p.1308-1320, 2020.

CAILLAUD, M. et al. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. *Neural Regeneration Research*, v.14, n.1, p.24-33, 2019.

DE LA ROSA, M.B.; KOZIK, E.M.; SAKAGUCHI, D.S. Adult stem cell-based strategies for peripheral nerve regeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.4, p.41-71, 2018.

FARONI, A. et al. Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.82, p.160-167, 2015.

FARONI, A. et al. Human Schwann-like cells derived from adipose-derived mesenchymal stem cells rapidly differentiate in the absence of stimulating medium. *European Journal of Neuroscience*, v.43, n.3, p.417–430, 2016.

FOURMESTRAUX, C.; TESSIER, C.; TOUZOT-JOURDE, G. Multimodal therapy including electroacupuncture for the treatment of facial nerve paralysis in a horse. *Equine Veterinary Education*, v.26, n.1, p.18-23, 2014.

FU, X.M.; TONG, Z.; LI, Q.; NIU, Q.; ZHANG, Z.; TONG, X.; TONG, L.; ZHANG, X. Induction of adipose-derived stem cells into Schwann-like cells and observation of Schwann-like cell proliferation. *Molecular Medicine Reports*, v.14, n.2, p.1187-1193, 2016.

FU, X.M. et al. The combination of adipose-derived schwann-like cells and acellular nerve allografts promotes sciatic nerve regeneration and repair through the JAK2/STAT3 signaling pathway in rats. *Neuroscience*, v.422, p.134-145, 2019.

GALHOM, R.A.; ABD EL RAOUF, H.H.H.; ALI, M.H.M. Role of bone marrow derived mesenchymal stromal cells and Schwann-like cells transplantation on spinal cord injury in adult male albino rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.108, p.1365-1375, 2018.

GONÇALVES, N.P. et al. Peripheral nerve regeneration is independent from Schwann cell p75(NTR) expression. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v.13, p.235, 2019.

HOPF, A. et al. Schwann cell-like cells: origin and usability for repair and regeneration of the peripheral and central nervous system. *Cells*, v.9, n.9, p.1990, 2020.

JEONG, H.S.; KIM, N.S.; KIM, M.S. Use of electroacupuncture treatment on traumatic facial nerve paralysis in a horse. *Journal of Veterinary Clinics*, v.32, n.1, p.105-107, 2015.

JUAN, C.H. et al. In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into Schwann-like cells. *Biomolecules*, v.10, n.12, p.1657, 2020.

KINGHAM, P.J.; KOLAR, M.K.; NOVIKOVA, L.N.; NOVIKOV, L.N.; WIBERG, M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells and Development*, v.23, n.7, p.741-754, 2014.

LIU, Y. et al. A new method for Schwann-like cell differentiation of adipose derived stem cells. *Neuroscience Letters*, v.551, p.79-83, 2013.

PAN, Y.; CAI, S. Current state of the development of mesenchymal stem cells into clinically applicable Schwann cell transplants. *Molecular and cellular biochemistry*, v.368, n.1, p.127-135, 2012.

RAZAVI, S.; AHMADI, N.; KAZEMI, M.; MARDANI, M.; ESFANDIARI, E. Efficient transdifferentiation of human adipose-derived stem cells into Schwann-like cells: A promise for treatment of demyelinating diseases. *Advanced Biomedical Research*, v.1, n.1, p.1-6, 2012.

SCHWARZ, B.C.; SALLMUTTER, T.; NELL, B. Keratoconjunctivitis sicca attributable to parasympathetic facial nerve dysfunction associated with hypothyroidism in

a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.233, n.11, p.1761-1766, 2008.

TAWAB, S. et al. Role of Adipose Tissue-Derived Stem Cells versus Differentiated Schwann-like cells Transplantation on the Regeneration of Crushed Sciatic Nerve in Rats. A Histological Study. *International Journal of Stem Cell Research and Therapeutics*, v.1, p.1-10, 2018.

VILLAGRÁN, C.C. et al. Differentiation of equine mesenchymal stromal cells into cells of neural lineage: potential for clinical applications. *Stem Cells International*, v.2014, ID:891518, 2014.

VILLAGRÁN, C.C. et al. A novel model for acute peripheral nerve injury in the horse and evaluation of the effect of mesenchymal stromal cells applied in situ on nerve regeneration: A preliminary study. *Frontiers in Veterinary Science*, v.3, p. 80, 2016.

YU, J. et al. Schwann-like cell conditioned medium promotes angiogenesis and nerve regeneration. *Cell and Tissue Banking*, v.23, n.1, p.101-118, 2021.