

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
MULTIPOTENTES NA REGENERAÇÃO DE NERVO PERIFÉRICO EM
RATOS

DIEGO NOÉ RODRIGUEZ SANCHEZ

Botucatu, SP

Maio – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES NA REGENERAÇÃO DO
NERVO PERIFÉRICO EM RATOS

DIEGO NOÉ RODRIGUEZ SANCHEZ

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Rogério Martins
Amorim.

Botucatu, SP

Maio – 2016

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

Sanchez, Diego Noé Rodriguez.

Efeito do transplante de células-tronco mesenquimais multipotentes na regeneração de nervo periférico em ratos / Diego Noé Rodriguez Sanchez. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Rogério Martins Amorim

Capes: 50501062

1. Células-tronco. 2. Transplante de Células-Tronco. 3. Medicina regenerativa. 4. Nervo ciático. 5. Terapia celular.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; Medicina regenerativa; Nervo ciático; Regeneração nervosa; Terapia celular.

Nome do Autor: Diego Noé Rodriguez Sanchez

Título: EFEITO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES NA REGENERAÇÃO DO
NERVO PERIFERICO EM RATOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Adj. Luis Antonio de Lima Rezende
Membro
Departamento de Neurologia, Psicologia e Psiquiatria
FMB-UNESP-Botucatu

Profa. Ass. Dr. Elenice Deffune
Membro
Departamento Urologia/Hemocentro
FMB-UNESP-Botucatu

Data da Defesa: 12 de Maio de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família:

Aos meus pais, Luis Noé e Blanca, pelo apoio, educação e amor incondicional. Sem vocês seria impossível que meus sonhos se tornassem realidade. Embora seja difícil para vocês entenderem o caminho que eu escolhi sempre confiaram, me motivaram nos momentos difíceis, e em silêncio pediram à Deus muita força.

Aos meus irmãos, Daniel, Camilo, Edisson e Sergio, pela confiança, amizade e companheirismo.

A minha tia Zunilda e meu primo Gerson *in memoriam*. Aos anjos do céu estão em cada momento sempre me guiando e acompanhando. Obrigado pelos momentos vividos.

As minhas tias maternas e paternas, pelo apoio, amor e ajuda em todo o meu caminho.

Muito obrigado por estarem em todos os momentos e fazerem parte da minha formação, pois assim pude me tornar quem eu sou.

“Todos os seus sonhos podem se tornar realidade se você tiver coragem para persegui-los.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério Martins Amorim, pelos seus ensinamentos, dedicação, atenção, incentivo e confiança prestados, possibilitando a concretização deste trabalho.

Ao Prof Matheus Bertanha, pela ajuda e os conselhos, me abrindo as portas e oferecendo os seus conhecimentos para a culminação deste trabalho.

Ao Prof Luiz Antônio Lima de Rezende, pelos conselhos e ajuda para que o trabalho pudesse ser feito na Faculdade de Medicina de Botucatu.

À professora Elenice Deffune e a equipe do laboratório pelo apoio e disponibilidade.

A todos os funcionários da Unidade de pesquisa experimental (Unipex) da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio e suporte para a realização do experimento.

A todos os meus amigos pelo apoio, amizade, força, companheirismos principalmente pelo tempo da suas vidas dedicado pra mim. Sou eternamente agradecido.

À FMVZ – UNESP, pela oportunidade de cursar a Pós-graduação, por ceder suas instalações e serviços para que esse trabalho pudesse ser realizado.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Fatores neurotróficos que regulam as células de Schwann durante o processo de regeneração do nervo periférico.....	14
--	----

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1- Massa (g) dos músculos tibiais craniais direito e esquerdo. Media (g), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo do diâmetro do peso do musculo tibial cranial direito e esquerdo nos animais dos grupos, GD, GV, GCTMMc e GCTMMm.....58
- TABELA 2- Massa (g) do musculo gastrocnêmio direito e esquerdo. Media (g), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo do diâmetro do peso do musculo gastrocnêmio e esquerdo nos animais dos grupos, GD, GV, GCTMMc e GCTMMm.....59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Nervo normal e classificação das lesões no SNP.....	6
FIGURA 2- Delineamento experimental.....	33
FIGURA 3- Esquema do transplante de CTMM após a tubulação do nervo ciático com veia descelularizada.....	34
FIGURA 6- Gráfico representando a pegada típica obtida de um animal normal com as suas respectivas variáveis e avaliação da marcha.....	52
FIGURA 7- Gráfico representando a latência distal (A) e a amplitude (B) dos grupos experimentais nos dias 0 (M1) antes dos procedimentos experimentais e dia 35 (M4) após o reparo do nervo ciático esquerdo.....	53
FIGURA 8- Gráficos (A) representando a densidade de fibras nervosas (B) e o número total de fibras (B).....	53
FIGURA 9- Gráfico representando a área total do nervo.....	54
FIGURA 10-Gráfico representando a marcação imunohistoquímica com BDNF.....	54
FIGURA 11-Imagens panorâmicas e em zoom, do nervo ciático esquerdo dos grupos GC (A,B,C), GD (D,E,F), GV (G,H,I), GCTMMc (J,K,L), GCTMMm (M,N,O), mostrando o diâmetro total da fibra nervosa (A,D,G, J, M, magnificação, 10x), número e densidade de axônios (B, E, H, K,N, magnificação,100x) e tingimento positivo de imunohistoquímica para BDNF na porção distal do nervo ciático esquerdo.....	55
FIGURA 12-Imagens panorâmicas e em zoom, do nervo ciático esquerdo dos grupos GC (A,B), GD (C,D), GV (E,F), GCTMMc (G,H), GCTMMm (I,J), mostrando o diâmetro número e densidade de axônios.....	56

FIGURA 13- Marcação das CTMM com os nanocristais Qtracker® 655 no microscópio de fluorescência com o filtro vermelho (A) e verde (B), 35 dias após a tubulação com veia descelularizada do nervo ciático esquerdo e microencapsulação com gel de plaquetas.....57

LISTA DE ABREVIações

SNP	Sistema nervoso periférico
SNC	Sistema nervoso central
DW	Degeneração Walleriana
NMNAT2	Nicotinamida nucleotídeo adenilil transferase
NAD⁺	Nucleotídeo de nicotinamida e adenina
MAG	Glicoproteína associada a mielina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
IL	Interleucina
MMP	Metaloproteinases de matriz
LIF	Fator inibidor de leucemia (LIF)
MCP-1	Proteína quimiotática dos monócitos
MEC	Matriz extracelular
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)
TGF-α	Fator de crescimento transformante alfa
NGF	Fator de crescimento do nervo
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
NT	Neurotrofinas
Trk	Receptor tirosina quinase
P75^{NTR}	Receptor comum das neurotrofinas
GRD	Gânglio da raiz dorsal
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
STAT3	Ativador de transcrição 3
GAP-43	Glicoproteína associada a mielina
CT	Células-tronco
CTMM-MO	Células-tronco mesenquimais multipotentes de medula óssea
CTMM-TA adiposo	Células-tronco mesenquimais multipotentes de tecido adiposo
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
NK	Células natural killer
h-CTMM	Células-tronco mesenquimais multipotentes humanas
DC	Células dendríticas
mtDNA	DNA mitocondrial
VD	Veia descelularizada
QDs	Quantum dots (pontos quânticos)

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIACOES.....	xi
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO DE LITERATURA	5
1 Lesão de nervo periférico	5
2 Regeneração e reparo axonal	9
2.1 Fatores que Influenciam na Regeneração do Nervo	11
3 Células-tronco.....	17
3.1 Células Tronco Mesenquimais Multipotentes na Regeneração de Nervos Periféricos	20
3.2 Engenharia de vasos sanguíneos e marcação celular	22
CAPÍTULO 2	26
Trabalho Científico	27
CAPÍTULO 3	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	78

RODRIGUEZ, D.N. **Efeito do transplante de células tronco mesenquimais multipotentes na regeneração do nervo periférico em ratos**. Botucatu, 2016. 106 p. Exame Geral de qualificação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" .

RESUMO

As lesões de nervos periféricos por neurotmeze apresentam resultados paradoxais na recuperação pela ausência na regeneração. Assim, manter o ambiente permissivo de crescimento no coto distal após a lesão é essencial, sendo as células de Schwann chaves neste processo. A terapia celular apresenta potencial para a regeneração nervosa, baseado na substituição celular e promoção do crescimento axonal. As células tronco mesenquimais multipotentes de tecido adiposo (CTMM-TA) são uma fonte promissora pela fácil obtenção, expansão *in vitro* e por apresentarem propriedades imunomoduladoras e antiinflamatórias. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do transplante de CTMM caninas e murinas em combinação com a técnica de tubulação com veia descelularizada, na regeneração do nervo ciático em modelo experimental de neurotmeze em ratos. Ratos Wistar submetidos a neurotmeze do nervo ciático foram divididos em 5 grupos: Grupo controle (GC), Grupo denervado (GD), Grupo Transplante de Veia descelularizada (GV), Grupo Veia + células tronco mesenquimais multipotentes caninas (GCTMMc), Grupo Veia + células tronco mesenquimais multipotentes murinas (GCTMMm). Após a marcação com nanocristais fluorescentes e viabilidade celular, 1×10^6 CTMM caninas e murinas foram injetadas depois da realização da lesão experimental por neurotmeze com 10mm por tubulação com veia descelularizada nos grupos GCTMMc e GCTMMm, e solução tampão salina de Hank's (HBSS) no grupo veia (GV). Durante o período de 35 dias, o índice de funcionalidade do nervo ciático (IFNC) e a eletroneuromiografia (ENMG) foram realizadas para avaliar a recuperação funcional. Análises histológicas e imunohistoquímicas foram efetuadas para revelar a mielinização, a produção de fatores neurtróficos e a persistencia das CTMM. Observaram-se resultados positivos funcionais nos

dias 27 e 35 no grupo tratado com GCTMMm. Os resultados eletrofisiológicos de latência (m/s) e amplitude (mV) no nervo ciático foram superiores nos grupos GCTMMc e GCTMMm. Na avaliação do número e a densidade de fibras nervosas, os grupos GCTMMm e GCTMMc, mostraram melhores resultados. Foi observado uma expressão significativamente alta de BDNF no grupo GCTMMc, associado com o incremento na expressão da proteína S-100 nos grupos GCTMMc e GCTMMm, comparado com o GD. Demonstrou-se, também, que as CTMM derivadas do tecido adiposo canino e murino apresentaram efeitos positivos na regeneração do nervo ciático após neurotme em ratos.

Palavras-chave: Nervo ciático, Células-tronco mesenquimais, Regeneração nervosa ,Terapia celular, Medicina regenerativa

RODRIGUEZ D.N. **Effect of transplanting multipotent mesenchymal stem cells in rat peripheral nerve regeneration.** Botucatu, 2016. 106p. Exame Geral de qualificação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" .

ABSTRACT

The peripheral nerves injury by neurotmesis presents confusing results in the recovery by the lack of regeneration. Thus, it is essential to maintain a growth permissive microenvironment in the distal stump following injury for Schwann cells. The cell therapy has therapeutic potential for nerve regeneration, based on cell replacement and promotion of axonal growth. Adipose-derived multipotent mesenchymal stem cells (AdMSC) are a promising source for easy retrieval and expansion *in vitro* and have immunomodulatory and anti-inflammatory properties. The objective of this study was to compare the effects of canine and murine MSC transplantation in combination with the tubulization of decellularized vein in sciatic nerve regeneration. Wistar rats were divided into 5 groups: control group (CG), denervated group (DG), decellularized vein transplantation group (VG), vein + canine MSC group (cMSC) and vein + murine MSC group (mMSC). After labeling with fluorescent nanocrystals and cell viability, 1×10^6 canine and murine MSC were injected after experimental injury for neurotmesis with 10mm and tubulization with decellularized vein in the cMSC and mMSC groups. During a period of 35 days the sciatic nerve functional index (SFI) and electroneuromyography (EMG) were performed to assess functional recovery. Histological analysis and immunohistochemistry were performed to evaluate myelination, neurotrophic factor production and persistence of MSC. It was observed functional positive results at 27th and 35th days in the group treated with mMSC. The electrophysiological results of latency (m/s) and amplitude (mV) in the sciatic nerve, they were higher in groups cMSC and mMSC. In assessing the number and density of nerve fibers, mMSC and cMSC groups showed better results. It was observed a significantly higher BDNF expression than the cMSC group, associated with increased

expression of S-100 protein in the cMSC and mMSC groups compared to the GD. Also, it has been shown that MSC canine and murine derived of adipose tissue (AdMSC) showed positive effects on the sciatic nerve regeneration in the rat model neurotmesis.

Key words: Sciatic nerve, Mesenchymal stem cells, Nerve regeneration, Cellular therapy, Regenerative Medicin

CAPÍTULO 1

Introdução, Revisão de Literatura e Objetivos

INTRODUÇÃO

Após a lesão traumática do nervo periférico, os corpos celulares inflamam-se e aumentam a demanda metabólica para a regeneração. Os neurônios proximais entram em apoptose, diminuindo, assim, a quantidade de neurônios regenerantes (KERSCHENSTEINER et al., 2005). As células de Schwann, principais células da glia no sistema nervoso periférico, passam a serem fagocíticas e gerar sinais quimiotácticas e recrutam macrófagos ao local da lesão (GUERTIN et al., 2005; COLEMAN, 2005). Assim, inicia-se o processo de degeneração walleriana que objetiva eliminar os detritos axoniais e de mielina para preparar e estimular o rebrotamento axonal (NGUYEN et al., 2002). Na neurotinese ocorre a interrupção deste processo, com diminuição da regulação e função das células de Schwann, perda do suporte axonal e ausência de recuperação funcional.

O método padrão para o reparo do nervo periférico consiste na neurorrafia termino-terminal (LUNBORG, 2003; MATSUYAMA et al., 2000). Embora essas técnicas sejam realizadas sem tensão excessiva, podem apresentar recuperação limitada pela formação de cicatriz, perda da orientação axonal e suporte neurotrófico, levando a baixas taxas de recuperação. O enxerto de nervo autólogo é o padrão quando há impossibilidade da neurorrafia termino-terminal pela retração dos cotos, mas seu uso é limitado pela mobilidade para a coleta de um nervo dispensável (BRAGA-SILVA et al., 2006; CHEN et al., 2000).

Há anos vêm-se pesquisando o uso de condutos não nervosos com o princípio de guiar os rebrotamentos das fibras nervosas do coto proximal ao distal (LUNDBORG, 2003), tendo como objetivo a orientação do crescimento neuronal, mediado por sinais tróficos do microambiente e do coto distal, manipulando o microambiente criado entre os dois cotos nervosos (OLIVEIRA et al., 2010; WANG et al., 2010). Alguns tubos sintéticos e biológicos têm sido testados para abrigar enxertos de nervos, células, tecidos e outras substâncias, na esperança de que estes materiais possam promover a regeneração

nervosa. Desvantagens no uso de material sintético têm sido reportadas, como a ocorrência de fibrose e compressão nervosa (OLIVEIRA et al., 2010; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2000).

Contudo, nas últimas décadas, a terapia celular tem assumido o foco das atenções no tratamento das injúrias traumáticas do sistema nervoso periférico. O transplante de células de Schwann, de precursores neurais, de células-tronco mesenquimais multipotentes (CTMM) e até mesmo de fibroblastos tem mostrado efeitos benéficos na regeneração de nervos periféricos (PHINNEY E PROCKOP, 2007; HOOD et al., 2009, ZANG et al., 2011; GU et al., 2010).

A meta primordial da terapia celular para o reparo de nervos periféricos é estabelecer um ambiente favorável para os axônios regenerantes, mantendo o suporte por um período estendido de tempo. A reposição de neurônios motores e sensitivos e incremento da população de células de Schwann, tornaria a regeneração mais eficiente, pela criação de um ambiente favorável. Além disto, podem prevenir a senescência das células de Schwann e a baixa regulação durante os períodos de recuperação prolongados (OLIVEIRA et al., 2010; CHEN et al., 2007; TOMITA et al., 2012; WANG et al., 2009).

As CTMM não hematopoiéticas são facilmente isoladas a partir de diversos tecidos adultos e caracterizadas por sua extensa habilidade proliferativa em cultura e de se diferenciar *in vitro* em diversas linhagens mesenquimais (CHAMBERLAIN et al., 2007; DOMINICI et al., 2006). Devido aos mecanismos de hipoinmunogenicidade demonstrados, tais como a modulação do fenótipo das células T, imunossupressão do microambiente e baixa expressão de alguns epítomos de superfície, as CTMM podem ser transplantadas em receptores alogênicos ou xenogênicos com incompatibilidade imunológica *in vivo* e *in vitro*. Contudo, ainda não existe um consenso, uma vez que se tem demonstrado que pode ocorrer reação imunológica decorrente de transplantes alogênicos (LE BLANC et al., 2003; DI NICOLA et al., 2002).

Diversos trabalhos tem demonstrado que o uso de CTMM nas lesões de nervos periféricos objetiva a substituição e fusão com as células de Schwann lesadas com a subsequente remielinização, promoção dos efeitos parácrinos

amplificando a produção de fatores neurotróficos e proteção axonal, liberação de fatores de crescimento, efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios, fornecimento do suporte físico para o crescimento axonal e auxílio na produção de energia para o metabolismo axonal (KEILHOFF et al., 2011; ZHAO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; WANG et al., 2009; CHEN et al., 2007; DEZAWA et al., 2001).

Dentro do âmbito da medicina regenerativa existem algumas importantes questões: como e qual o melhor tipo de célula-tronco, quantidade, dose, frequência e forma de transplante, por quanto tempo podem gerar efeito e a sua capacidade de disponibilidade no local da lesão (migração). Poucas pesquisas tem explorado possibilidade do enxerto de veia cava descelularizada associada ao transplante de CTMM em lesões de nervos periféricos e não existem trabalhos testando as CTMM caninas na regeneração das lesões de nervos periféricos.

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do transplante de CTMM caninas e murinas, em combinação com a técnica de tubulação com veia descelularizada, na regeneração do nervo periférico, em modelo experimental de neurotmesa do nervo ciático de ratos. Formulou-se a hipótese suplementação das CTMM após a técnica de tubulação estimula a regeneração axonal para melhorar função motora, eletrofisiológica, morfológica e estimular a produção de fatores neurotróficos.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Lesão de nervo periférico

No sistema nervoso periférico (SNP), as fibras nervosas são constituídas pelo axônio, pela bainha de mielina e pelas células de Schwann. O citoplasma das células de Schwann se enrola em torno ao axônio, formando a bainha de mielina, estruturas de tecido conjuntivo revestem o nervo. O epineuro é composto por fibras de colágeno tipo 1. Os fibroblastos e os capilares, compõem a camada mais externa revestindo o nervo e os espaços entre os feixes. Alguns fibroblastos dispõem-se em camadas concêntricas formando o perineuro e a barreira hemato-neural. Já os axônios individuais e as células de Schwann associadas são revestidos por uma camada de fibroblastos, colágeno tipo III e capilares endoneurais formando o endoneuro (GREENSTEIN, B; GREENSTEIN, A, 2000; SUNDERLAND, 1990).

Os nervos possuem um limite de distensibilidade. Caso este limite seja ultrapassado haverá dano, perda da sensibilidade e/ou motricidade do território por ele inervado. Segundo Seddon (1942), as lesões traumáticas de nervos periféricos podem ser classificadas em: neuropraxia, distúrbio funcional na condução do nervo, axonotmese, interrupção física dos axônios sem alteração estromal e neurotmese, completa separação do tronco nervoso periférico.

Sunderland (1951) (1990), definiu cinco graus de lesão nervosa na qual incluiu a lesão do tecido conjuntivo, os graus I e II são idênticos à neuropraxia e axonotmese, mas a neurotmese é dividida no grau III que representa a injúria da bainha da mielina, axônio e endoneuro, o grau IV indica lesão de todo o tronco nervoso com o epineuro intacto, e o grau V implica na transeção completa do nervo e tecido conectivo Figura 1.

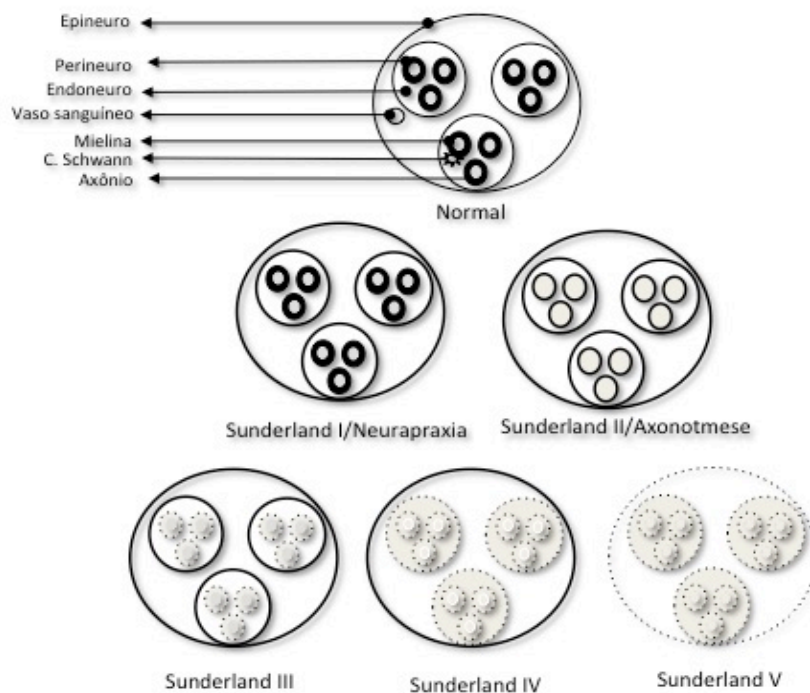


FIGURA 1. **Nervo normal e classificação das lesões no SNP.** Lesão de Sunderland tipo I ou Neuropraxia (Seddon), os fascículos ainda se mantêm intactos e apenas desaparece a bainha de mielina. C. Lesão de Sunderland tipo II ou Axonotmesa (Seddon), em que apenas são preservados os tubos do endoneuro, desaparecem os axônios e a bainha de mielina. D. Lesão de Sunderland tipo III, desaparece o endoneuro e é preservado o perineuro. Lesão de Sunderland tipo IV, desaparece o perineuro e é preservado o epineuro. Lesão de Sunderland tipo V ou Neurotmesa (Seddon), em que há secção completa de todo o nervo (Adaptado de LUNDBORG, 2000).

Após a lesão do nervo periférico ocorre um processo de degeneração, conhecido como degeneração Walleriana (DW), que visa melhorar do microambiente para posterior regeneração, se for possível. Devido a ampla distribuição do SNP as lesões dos nervos periféricos são relativamente frequentes, decorrentes de esmagamento, isquemia, inflamação, ou ainda por secção completa com o sem perda da substância. Os neurônios não sofrem mitoses, portanto, a destruição gera perda significativa. Porém, sob certas condições, os seus prolongamentos citoplasmáticos têm capacidade de regenerar, apresentando uma propriedade de recuperação desde que lhe sejam mantidas ou adicionadas condições favoráveis (COLEMAN, 2005).

A DW foi estudada morfológicamente na secção do nervo glossofaríngeo e hipoglosso por Augustus Volney Waller entre 1816-1870. Caracteriza-se pela degeneração distal do axônio seccionado, que desencadeia uma reposta celular com eliminação dos detritos celulares inibitórios, induzindo a produção de um ambiente que suporta o rebrotamento dos axônios, durante vários

meses após a lesão (GRIFFIN et al., 1995). Em mamíferos, a DW permanece entre 7-14 dias (GEORGE; GRIFFIN, 1994), menos tempo comparado com o Sistema nervoso central (SNC) que persiste por meses ou anos (GEORGE; GLASS, 1995), resultando no acúmulo prolongado de inibidores de mielina, que levam a falha dos axônios para regenerar (GEORGE; GRIFFIN, 1994).

Diversos estudos têm demonstrado a sequência de eventos moleculares em axônios seccionados. A fase de degeneração aguda altera os segmentos proximal e distal (KERSCHENSTEINER et al., 2005), já a fase de latência não apresenta alterações morfológicas (TSAO et al., 1994) e a fase final de degeneração granular é abrupta, ocorrendo no período entre 24-48 horas após a lesão *in vivo* (GEORGE E GRIFFIN, 1994) e 12-24 horas em axônios de roedores *in vitro* (GLASS et al., 1993). Imediatamente após a axonotomia, desencadeia-se a degeneração axonal aguda proximal e distal no período entre 5-60 min, mediado pelo influxo de Ca^{+2} intracelular, ativação das vias apoptóticas, principalmente a via da serina-treonina protease calpaina, e posterior degradação dos neurofilamentos e microtúbulos (30 minutos após a lesão) de forma retrógrada e anterógrada (MOLDOVAN et al., 2009; KAMPFL et al., 1996).

Potenciais gatilhos para a degradação axonal são conhecidos. O aumento do Ca^{+2} intraxonal e a ativação do sistema protease calpaina são necessários para a DW no axônio distal. O aumento do Ca^{+2} intracelular é mediado pela liberação de reservatórios intracelulares de cálcio e o influxo mediado por canais de Ca^{+2} tipo-L. Além disso, pode haver diminuição da atividade da bomba de Na^{+}/K^{+} ATPase, tanto por falta de energia como por lesão da membrana, levando ao influxo de Na^{+} , com a consequente despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{+2} fechados por voltagem. Por outro lado, nervos sob isquemia podem liberar Ca^{+2} das reservas do retículo (GEORGE et al., 1995; MOLDOVAN et al., 2009).

Evidências sugerem que além do programa de degeneração Ca^{+2} -dependente, a lesão do nervo pode alterar o transporte ou a expressão de fatores tróficos para o axônio (COLEMAN, 2005). Gilley e Coleman (2010) observaram que a inibição da produção de proteínas do citoesqueleto leva a

degeneração espontânea dos axônio *in vitro*. Ainda demonstraram que a proteína axonal nicotinamida nucleotídeo adenilil transferase 2 (NMNAt2) está envolvida com a síntese de nucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺), que aporta energia para sobrevivência neuronal. A depleção da NMNAt2 usando siRNA induz experimentalmente a degeneração de axônios não lesados, indicando que esta proteína contribui na sobrevivência axonal, relacionado a manutenção do transporte axonal desde o soma.

Logo após a fase latente de DW, desencadeia-se a fragmentação e desintegração assíncrona do citoesqueleto e dos neurofilamentos, sendo mediada pela ativação da calpaína protease, no período de 1-2 horas após o início. A velocidade de DW foi calculada em cerca de 45,6 mm/24h para as fibras mais grossas e 252mm/24h para as fibras mais finas (KOEPPEN, 2004).

No SNP, as células de Schwann mielinizantes respondem rapidamente a lesão, antes da degeneração do axônio. Alguns receptores que permanecem nas microvilosidades das células de Schwann são ativados após a axonotomia, resultando na posterior ativação das proteínquinases por mitógenos regulando a expressão gênica, mitose e diferenciação das células de Schwann. No processo de DW, a separação e fragmentação da bainha de mielina é rápida, separando-se do soma e encurtando-se, formando assim pequenos ovóides e, posteriormente, as células de Schwann degradam, fagocitam e apresentam a mielina para os macrófagos, evitando-se a presença de moléculas inibitórias por parte das células danificadas, como a glicoproteína associada a mielina (MAG) (GUERTIN et al., 2005; LIU et al., 1995).

Sabe-se que as células de Schwann contribuem na ativação da cascata inflamatória. A degradação da mielina depende da ativação da família de enzimas da fosfolipasa-A2 com ativação da cascata inflamatória (MONACO et al., 1992). Estudos em camundongos observaram que as células de Schwann no coto distal sintetizam citocinas inflamatórias necessárias para a quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as interleucinas (IL-1a,IL-1B,IL-6), as metaloproteinases de matriz (MMP-9), o fator inibidor de leucemia (LIF) e a proteína quimiotática dos monócitos (MCP-1) entre 3 até 24 horas após a lesão. Portanto, os neutrófilos ativados em 24

horas fagocitam detritos celulares e posteriormente os macrófagos residentes endoneurais e do sangue atuam entre 2 até 4 dias, finalmente os linfócitos infiltram o nervo entre 3-28 dias, para posteriormente promover a regeneração do nervo (LIU et al., 1995; GRIFFIN et al., 1992).

2 Regeneração e reparo axonal

A organização do citoesqueleto do axônio é essencial para manter a estrutura e a integridade do axônio, sendo composto de microtúbulos, filamentos de actina e neurofilamentos. Os microtúbulos e os filamentos de actina são estruturas dinâmicas que afetam o crescimento do axônio e influem no transporte axonal ativo. Os filamentos de actina organizam a membrana plasmática e proporcionam flexibilidade, mantendo a plasticidade sináptica e axonal (GANGULY et al., 2015).

Dentre as importantes funções do citoesqueleto destaca-se o transporte ativo de proteínas, vesículas e organelas através do axônio, mediado pelas proteínas quinesinas, dineinas e miosinas, sendo as quinesinas as responsáveis pelo transporte anterógrado enquanto as dineinas pelo transporte retrógrado (KETSCHKEK et al., 2015; GENTIL; COOPER, 2012).

Ao mesmo tempo em que ocorre a degeneração axonal, inicia-se o processo de regeneração. Algumas horas após a lesão, filamentos (brotamentos) do citoesqueleto do axônio penetram as colunas das células de Schwann. Ao mesmo tempo, proteínas da matriz extracelular (MEC) e fatores tróficos são produzidos pelas células de Schwann. As proteínas lamininas são expressadas e ativam receptores específicos das células de Schwann (receptores de integrinas e distroglicanos), aumentando a sua adesão e, fornecendo uma ligação molecular entre as MEC ao citoesqueleto de actina, contribuindo no crescimento de neurites e na mielinização (COLOGNATO et al., 2005; CHEN; STRICKLAD, 2003).

No segmento proximal as células de Schwann proliferam-se sob a forma de cordões orientados longitudinalmente (bandas de Büngner) na tentativa de

estabelecer um contato entre os cotos (NGUYEN et al., 2002). Os macrófagos preparam o espaço para a futura regeneração pela produção de moléculas da matriz envolvente, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) (VAREJÃO, 2003). Neste nível há presença de um aumento na síntese de neurotrofinas mediado pela expressão de mRNA nas células Schwann, macrófagos e fibroblastos dos fatores de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofinas 3, 4 e 5 (NT-3/4/5), que estimulam os receptores de tirosina quinase (TrkA, TrkB, TrkC) e o receptor comum das neurotrofinas (P75^{NTR}), que influenciam na orientação, o crescimento e a polimerização axonal (NAVEILHAN et al., 1997; HOKE et al., 2000; CHEN et al., 2007).

O coto proximal do nervo lesado contém axônios e bainha de mielina sem alterações, entretanto os axônios maduros e sensoriais falham em suportar a regeneração. Assim sendo, mudanças moleculares no coto distal são necessárias para a regeneração do nervo. A lâmina basal pode permanecer no coto distal, fornecendo a base para o crescimento dos cordões de células de Schwann que serão atravessados pelos axônios em regeneração (MILLES I et al., 1972). Cajal (1928), propôs que as células de Schwann no coto distal têm efeitos quimiotrópicos, estimulando o crescimento de axônios.

A reinervação motora preferencial é uma tendência dos axônios motores dos nervos mistos reinervarem seletivamente o músculo (BRUSHART et al 1998; MADISON et al., 1996;). Após a DW os brotos dos axônios proximais entram aleatoriamente nos tubos endoneurais do coto distal no entanto, os axônios motores são misturados com os sensitivos, alterando as rotas normais e falha na recuperação funcional. Portanto, os brotos das vias aferentes sensitivas, que estão misturados com as vias motoras ocupando os tubos endoneurais nos nervos em regeneração são podados mantendo as vias motoras de forma preferencial, incrementando a quantidade de neurônios motores no músculo. Acredita-se que esse mecanismo é mediado pela especificidade dos axônios regenerantes e por sinais de crescimento do órgão alvo (ROBINSON; MADISON, 2004; BRUSHART et al., 1998; MADISON et al., 1996).

2.1 Fatores que Influenciam na Regeneração do Nervo

A insuficiente ou prolongada recuperação funcional das lesões de nervos periféricos tem sido investigada ao longo dos últimos anos a nível molecular, requerendo-se um bom conhecimento para entender o processo de regeneração e sua posterior aplicabilidade clínica.

Sabe-se que o efeito na regeneração dos órgãos alvo pode ser insatisfatório ou lento dependendo do tipo de lesão, como no caso da neurotmeose. Entende-se que os processos moleculares envolvidos nessa falha estão relacionados às alterações no corpo celular, no coto distal lesado e à atrofia após denervação (MADISON et al., 1996).

Entre os fatores musculares envolvidos após a lesão, estão perda de mionúcleos, das fibras musculares, da densidade capilar e a fibrose muscular, resultando em atrofia e perda da sua função (CARLSON; MACKINNON, 2002; FU; GORDON, 1995). Esse processo é relacionado às alterações no coto distal com falha regeneração axonal, devido as células de Schwann sofrerem apoptose, perderem a lâmina basal e a capacidade de suporte. A deposição de colágeno nos tubos endoneurais no coto distal também gera um microambiente pouco favorável (BAIN et al., 2001).

A sobrevivência do corpo celular e a sua capacidade de regulação e expressão de genes no corpo celular, é um fator importante no sucesso na alongação dos axônios (CONFORTI et al., 2014). Sabe-se que na axonotomia ocorre morte dos neurônios sensitivos e motores de forma retrógrada e anterógrada, sendo influenciado pela idade, pelo tempo e pela distancia entre os cotos e a proximidade ao corpo (MAERS et al., 2003; MADISON et al., 1996). Embora, os axônios regenerantes possam crescer dentro do coto do nervo distal, é possível que falhem em se prolongar para alcançar o músculo desnervado e/ou estabelecerem conexões nervo-músculo funcionais (MILLES, 2006; FU; GORDON, 1995). O tempo de reparo e a distância são críticos, sendo assim é essencial uma intervenção rápida antes de que ocorram alterações irreversíveis (PEKER et al., 2005). Sabe-se que uma quantidade

significativa de brotamentos não atinge o segmento distal e são destruídos precocemente por falta de sinais quimiotáticas (FU; GORDON, 1995).

A eficiência funcional da regeneração depende, também, do alinhamento das fibras nervosas. Como acontece na neurapraxia e no enxerto de nervo para o reparo da lesão, preserva-se o alinhamento das fibras, podendo ocorrer recuperação (MADISON et al., 1996)

Moléculas que modulam a capacidade de regeneração podem ser classificadas como fatores endógenos, que são produzidos pelo mesmo organismo, no entanto, podem ser suplementados, e fatores exógenos, que só podem ser suplementados a partir do fornecimento de um microambiente favorável. Baseado no conhecimento da proliferação e reestruturação das células de Schwann, sem dúvida existe uma sincronia biológica que gera vários sinais ambientais locais que são responsáveis pela regeneração, embora não sejam compreendidos completamente (GRAVVANIS et al., 2005)

O SNP tem capacidade intrínseca de regeneração, sendo amplamente estudado no neurônio sensitivo do gânglio da raiz dorsal (GRD). Demonstrou-se, *in vitro*, que o crescimento de neuritos é inibido pela presença de mielina ou da MAG. Trabalhos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que esses mecanismos são superados pelo próprio organismo para promover a regeneração. Neumann et al. (1999) encontraram aumento da transcrição do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) após lesão do nervo periférico, contribuindo com o aumento da capacidade de crescimento intrínseco do axônio e organização do citoesqueleto.

Como se considerou anteriormente no processo de regeneração, as células de Schwann também atuam no processo de regeneração (HARI et al., 2004, DUBODY, 2004). A resposta das células de Schwann de diferenciação, proliferação e remielinização, depende de três componentes reguladores importantes (a) proteínas da matriz extracelular, (b) fatores neurotróficos e (c) hormônios. Durante o desenvolvimento e a regeneração, os cones de crescimento são influenciados pelo microambiente.

Recentes estudos têm demonstrado que os fatores neurotróficos são

importantes na regulação da diferenciação das células de Schwann e na remielinização e sobrevivência axonal. A família das neurotrofinas inclui o NGF, BDNF, NT-3, 4 e 5 e os seus receptores P75^{NPR} e Trk. Os fatores NGF, NT-3 e o BDNF, induzem o crescimento axonal, pela ativação da via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase no cone de crescimento, estimulando a síntese de proteínas do citoesqueleto (CHEN et al., 2007; YOSHIMURA et al., 2005; ZHOU et al., 2004)

Alguns trabalhos mostram níveis aumentados de mRNA dos receptores P75^{NPR}, TrkC e NT-3 nas células de Schwann na região distal a lesão (GORDON, 2009; CHEN, et al., 2007). Estes níveis têm correlação com a remielinização.

Song et al. (2006) utilizando ratos P75^{NPR} *knockout* no modelo de axotomia, observaram atraso na remielinização e baixos níveis de mRNA e proteínas da mielina nos ratos mutantes, comparados com os ratos selvagens. Os autores concluíram que as células de Schwann requerem a interação das neurotrofinas e seus receptores para promoverem o crescimento axonal e a mielinização.

O FGF-2 e as neuroregulinas têm sido estudados pelos seus efeitos no processo de regeneração. O FGF-2 estimula o crescimento de neurites e a manutenção da sobrevivência dos neurônios sensoriais (GROTHER et al., 2006). Já a neuroregulina 1 atua na proliferação das células de Schwann e posterior formação da bainha de mielina (JESSEN; MIRSKY, 2005). *In vitro*, o FGF-2 estimula a mitose das células de Schwann e diminui a produção de proteínas inibitórias (Quadro 1) (MORGAN et al., 1994).

As proteínas da MEC são reguladoras importantes na remielinização e regeneração dos nervos após lesão do SNP. Dentro do grupo de proteínas agrupam-se, o ativador do plasminogênio, o colágeno, as glicoproteínas (fibronectina, lamininas, tenascinas, trombosponinas), os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos (HUGHES et al., 2002).

O endoneuro em regeneração expressa intrinsecamente laminina 2 e 8 (DOYU et al., 1993). Liga-se aos receptores de integrinas, desencadeando a

fosforilação e ativação da via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase e a posterior síntese das proteínas de ligação ao citoesqueleto permitindo o seu alongamento, além da formação da lâmina basal para a orientação dos axônios no processo de regeneração (CHEN et al., 2007; DUBOVY et al., 2004).

Sabe-se que as células de Schwann no coto distal perdem contato com axônio degenerado, levando a um estado de diferenciação, contudo quando fazem contato com o axônio em regeneração induz-se um estado de re-diferenciação (MASAKI et al., 2000).

QUADRO 1. Fatores neurotróficos que regulam as células de Schwann durante o processo de regeneração do nervo periférico.

Fatores Neurotróficos e receptores	Efeitos nas células de Schwann	Referências
BDNF e o receptor P75 NTR	Promotor da remielinização	SONG et al., 2006
FGF-2	Promotor da proliferação das células de Schwann, mas inibe a remielinização durante a regeneração	GROTHER et al., 2006
TGF- β	Aumenta o efeito trófico das células de Schwann sobre o crescimento dos axônios	CHEN, et al., 2007
Laminina	Efeito positivo durante a remielinização	MASAKI et al., 2000; CHEN et al., 2007
Distroglicano	Manutenção das bainhas de mielina e regulação da espessura de mielina	MASAKI et al., 2000

Fonte: Modificado de CHEN et al., 2007.

Na prática clínica, o reparo envolve a sutura exata do nervo ou dos fascículos sem tensão excessiva. Existem importantes problemas envolvidos

no processo de regeneração do nervo: (i) suporte do crescimento axonal; (ii) reparo de fendas maiores entre os cotos nervosos e (iii) navegação correta dos axônios em crescimento em direção ao seu alvo (MILLESSE et al., 1972).

Desde o início do reparo do nervo periférico e durante alguns anos as técnicas cirúrgicas de reparação do nervo seccionado foram feitas através da sutura direta de ambos cotos (anastomose primária ou sutura coto-a-coto). Se houvesse perda da substância entre eles realizava-se uma sutura sob tensão, podendo ser a responsável pelos baixos resultados (NAFF; ECKLUND, 2001). Posteriormente, foi demonstrado resultados positivos quando se utilizava um fragmento de nervo autólogo entre os dois cotos, resultando numa sutura livre de tensão (MILLESSE, 1970). O reparo do nervo seccionado pode ser possível pela coaptação direta entre os cotos e, caso que não seja possível, pela interposição de autoenxertos ou através de tubos condutores tanto biológicos como sintéticos. O objetivo desta técnica é estabelecer novas conexões entre os axônios sensitivos, motores e autonômicos, provendo a recuperação funcional e evitando a formação do neurinoma, formação exagerada de cicatriz e fibrose em ambos os cotos pela regeneração axonal aleatória (MATSUYAMA et al., 2000). A neurografia termino-terminal é realizada suturando-se os cotos tanto proximal com distal, através de suturas epineurais, perineurais ou epiperineurais. A perineural é facilmente realizada, proporcionando menos trauma tanto no nervo como na vasculatura. Porém, a perineural proporciona um melhor alinhamento entre os fascículos quando comparada a perineural, mas pela manipulação de tecidos pode lesar a vasculatura (MILLESSE, 2006).

Em alguns casos, como em avulsões de nervos, o coto distal realiza retração, impossibilitando a neurografia termino-terminal. Entretanto, pode-se “sacrificar” um nervo com menos comprometimento funcional (sensitivo ou motor) para a neurografia termino-terminal. A neurografia latero-terminal ou termino lateral, baseia-se no neurotrofismo que o coto distal, exerce no nervo doador, permitindo que os brotos do nervo normal, colonizem o coto do nervo lesão e reinervação da região desnervada (LUNDBORG, 2003) Diversos trabalhos promissores avaliaram esta técnica, entretanto apresentam resultados controversos (LUNDBORG, 2000).

Quando o reparo primário não pode ser realizado, os enxertos de nervos são, na maioria dos estudos, uma opção sem a utilização de tensão excessiva (BRAGA-SILVA et al., 2006; CHEN et al., 2000). Os enxertos podem ser bioartificiais, aloenxertos ou autoenxertos (MACKINNON, 1996; MILLESI et al., 1990). Os resultados apresentam desvantagens como o sacrifício de um nervo funcional, reinervação e vascularização insatisfatória, e formação de neurinomas e cicatrizes importantes (VAREJÃO, 2003; MADISON, 1992; MILLESI et al., 1990).

Há vários anos vêm-se pesquisando o uso de condutos não nervosos, com o princípio de guiar os rebrotamentos das fibras nervosas desde o coto proximal ao distal (LUNDBORG, 2003). A técnica consiste na interposição de um tubo entre os dois cotos, que é fixado normalmente com 1 ou 2 pontos, atravessando o epineuro através do tubo guia, usando um fio não absorvível monofilamentar 7-0 a 9-0. Portanto, possui como objetivo a orientação do crescimento neuronal, mediado por sinais tróficos do microambiente e do coto distal, isolando-o do meio externo, evitando-se, assim, a invasão de tecido fibroso focal, a formação de neurinoma e incremento na concentração de fatores neurotróficos, criando um ambiente favorável (WANG et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2004).

Considera-se que o tubo ideal é aquele com características inertes, biocompatíveis, flexíveis, transparentes, e que possa inibir o processos negativos a regeneração do nervo (fibrose, neurinoma, edema, isquemia e aderências (TYNER et al., 2007).

Vários experimentos têm sido realizados através da utilização de enxertos artificiais, bioartificiais, ou tubos guia como: silicone (LUNDBORG, 1982), colágeno (TYNER et al., 2007), quitina, ácido polilactico (NGO et al., 2003), fibronectina (WHIWORTH et al. 1995) e laminina (KAUPPILA et al., 1993), assim como combinações de nervo e músculo (*sandwich* nervo-músculo) (WHITWORTH et al., 1995). No entanto, grande parte desses materiais não são utilizados na prática clínica, por falta de estudos.

Lundborg (1982), estudando a interposição de tubos condutores de silicone em defeitos de 6 a 15 mm, encontraram bons resultados para os

defeitos de 6 mm, mas não observaram regeneração para defeitos de 15 mm. A idéia era favorecer o acúmulo de fatores neurotróficos dentro de um espaço limitado contendo os cotos seccionados. Os melhores resultados são proporcionais ao defeito, com bons resultados quanto o defeito era menor. Para defeitos de 10 a 15 mm a regeneração era normalmente nenhuma ou muito pobre. De forma geral, o tubo é usado como alternativa a sutura e ao uso de um enxerto de nervo, para defeitos menores que 5 mm.

Com a técnica de tubulação e o aparecimento de tubos-guia também pode-se modificar ou manipular o microambiente criado entre os dois cotos de nervos. Alguns tubos sintéticos e biológicos têm sido testados para abrigar enxertos de nervos, células, tecidos e outras substâncias, na esperança de que estes materiais possam promover a regeneração nervosa. Desvantagens no uso de material sintético têm sido reportadas, como a ocorrência de fibrose e compressão nervosa (OLIVEIRA et al., 2010; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2000).

3 Células-tronco

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas com capacidade de se multiplicar indefinidamente, originando células semelhantes não especializadas, mas também de se diferenciar em células especializadas de múltiplas linhagens. Possuem uma divisão simétrica (uma divisão por proliferação originando duas células-tronco ou uma divisão com diferenciação criando duas células diferenciadas) e assimétrica (originando uma célula diferenciada e uma célula-tronco) (BYDLOWSKI et al., 2009). Essas células podem apresentar características totipotentes (capacidade de criar um organismo inteiro), pluripotentes (capacidade de se diferenciar em células das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma), multipotentes (capacidade de diferenciação em um número limitado de linhagens) e unipotentes (originam um tipo específico de célula) (CHAMBERLAIN et al., 2007).

As células CT podem ser embrionárias (encontradas nos embriões), adultas (derivadas de diversos tecidos, tais como medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, tecido nervoso, entre outros) (SCHWINDT et al., 2005;). As células-tronco adultas, são responsáveis pela manutenção tecidual normal, com capacidade limitada de diferenciação (GATTEGNO-HO et al., 2012; LEUNG et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais (CTMs), também denominadas células estromais mesenquimais multipotentes (CTMM) são células progenitoras multipotentes, não hematopoiéticas, facilmente isoladas a partir de diversos tecidos adultos, e caracterizadas por sua extensa habilidade proliferativa e de se diferenciar *in vitro* em diversas linhagens mesenquimais em resposta a um estímulo apropriado, incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos, tenócitos e miócitos (CHAMBERLAIN et al., 2007)

Sabe-se que as CTMM residem no tecido conectivo de todos os órgãos, incluindo o tecido adiposo, placenta (fetal e materna), sangue do cordão umbilical, cordão umbilical/*Wharton's jelly*, fluido amniótico e vários tecidos fetais incluindo o sangue, fígado, medula óssea, baço e pulmão (MOSNA et al., 2010; DA SILVA et al., 2006).

Em humanos, há critérios mínimos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) para a caracterização das CTMM. Elas devem ser aderentes ao plástico, expressarem ou não marcadores de superfície específicos (*Clusters Designation – CD*), e ainda, se diferenciarem *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob estímulos específicos (DOMINICI et al., 2006). Quanto a fenotipagem celular ainda não há um único marcador ou uma combinação de marcadores que se mostram específicos e exclusivos das CTMM, sendo que estes são encontrados também em outros tipos celulares (MONTEIRO et al, 2010).

Na última década a terapia celular tem assumido o foco das atenções em muitas estratégias na medicina translacional e engenharia de tecidos. As CTMM da medula óssea (CTMM-MO) têm sido bem estudadas, porém existem outras fontes, incluindo o tecido adiposo, placenta, cordão umbilical, sangue do cordão umbilical e polpa dentária (STRIOGA et al., 2010; ERICES et al., 2000).

Recentemente uma fonte predominantemente usada para aplicações clínicas são as CTMM derivadas do tecido adiposo (CTMM-TA), tendo

confirmada a sua capacidade multipotente (DOMINICI et al., 2006; ZUK et al., 2001). Estas células apresentam vantagens, como alta disponibilidade e fácil acessibilidade por excisões diretas minimamente invasivas, mostrando que o seu potencial terapêutico é equivalente ao das CTMM-MO, em termos de proliferação potencial diferenciação e viabilidade para o transplante (STRIOGA et al., 2012; DOMINICI et al., 2006).

Recentemente, as CTMM murinas e humanas têm sido descritas como imunotolerantes em modelos de transplante *in vivo* e *in vitro*. Estes trabalhos têm demonstrado baixa imunogenicidade das CTMM, o que permite sua eficácia terapêutica em doadores ou receptores não compatíveis tanto alogênicos como xenogênicos. Contudo, existem relatos de resultados contraditórios quanto as propriedades imunotolerantes destas células (ARINZEH et al., 2003; MAHMOOD et al., 2003).

Neste contexto, atualmente prefere-se ainda o uso de CTMM autólogas para evitar a rejeição em transplantes alogênico ou xenogênicos. Contudo a coleta de células autólogas também tem aspectos negativos, pois exige uma logística mais complexa, maior custo e restrições temporárias, além disso, muitos desses pacientes apresentam co-morbidades médicas ou idade avançada que prejudicam a qualidade das células obtidas para o transplante.

Uma série de observações indicam que as CTMM são imunoprivilegiadas, com capacidade de sobreviver em receptores alogênicos ou xenogênicos com incompatibilidade imunológica. As CTMM parecem evitar a rejeição imunológica por três mecanismos, (a) hipoimunogenicidade, (b) modulação das células T, (c) imunossupressão do ambiente local. *In vitro*, em culturas xenogênicas e alogênicas com linfócitos T as CTMM evitam a resposta alogênica e proliferativa dos linfócitos T (LE BLANC; RINGDEN, 2007; LE BLANC et al., 2003; DI NICOLA et al., 2002). Embora controverso, diversos trabalhos mostram as propriedades imunossupressoras das CTMM, pela baixa expressão de mRNA para as citocinas IL-1, -6, -7, -11, -12, -14, -15, -27, LIF, fator estimulante de colônias de macrófagos e fator de célula tronco (RAMUSSON, 2006; AGGARWAL; PITTENGER, 2005).

Embora os dados *in vitro* suportem essas propriedades, *in vivo* existem poucas evidências do imunoprivilégio das CTMM. O trabalho de Bartholomew et al (2002) mostrou que a administração sistêmica de CTMM alogênicas prolonga a sobrevivência do enxerto de pele alogênico em animais imunocompetentes. Outros estudos mostraram implantação, diferenciação e ausência de rejeição, após o transplante de CTMM alogênicas suínas, após a ligação coronária sem uso de imunossupressores (MAKKAR et al., 2005). Por outro lado, Liechty, et al. (2000) realizaram um transplante de hCTMM xenogênicas em fetos de ovelhas aos 65 e 85 dias de gestação pela via intraperitoneal (término 145 dias) avaliando a distribuição das hCTMM (2 semanas, 2 meses, 5 meses e 13 meses depois do transplante). As CTMM tiveram a capacidade de se implantar, sobreviver não seletivamente e crescer exponencialmente em múltiplos tecidos. Interessantemente, as células transplantadas aos 85 dias não foram reconhecidas pelo sistema imune pela supressão imune local e deleção clonal do timo.

3.1 Células Tronco Mesenquimais Multipotentes na Regeneração de Nervos Periféricos

A utilização de células-tronco nas lesões traumáticas de nervos objetiva substituir ou regenerar um tipo de célula ou tecido que foi lesado ou perdido, ou ainda usar uma linhagem específica de células-tronco indiferenciada que produza fatores neurotróficos (WANG et al., 2010; DEZAWA et al., 2001).

Referente a substituição celular tem-se enfatizado um efeito positivo no incremento do número e atividade das células de Schwann. Evidências tanto *in vitro* (SCHLOSSHAUR et al., 2003), quanto *in vivo* (KEILHOFF et al., 2006), tem demonstrado que o transplante das células de Schwann pode contribuir na regeneração do SNP, mas tem limitações, tais como a baixa atividade mitótica e de proliferação em condições de cultivo. Além disso, o comprometimento do doador é uma questão relevante, porque outro nervo deve ser biopsiado para a obtenção do material para o isolamento das células de Schwann (OLIVEIRA, 2010).

Embora apresentem características de baixa imunogenicidade, os principais mecanismos de ação baseiam-se na sua capacidade parácrina, sua habilidade de migração, integração e sobrevivência em tecidos lesados e capacidade de transferência ativa de mitocôndrias (KEILHOFF; FANSA, 2011; OLIVEIRA et al., 2010; DEZAWA et al., 2001). Embora controverso, vários estudos indicam que as CTMM também podem sofrer, sob estímulos específicos, processo de transdiferenciação em tipos celulares ectodermiais, como células neurais, incluindo as células de Schwann (ODA et al., 2013; CHUNG et al., 2013; DEZAWA et al., 2004; WOODBURY et al., 2000; SANCHEZ-RAMOS et al., 2002).

Uma série de estudos experimentais têm mostrado o potencial das CTMM para melhorar a regeneração nervosa com recuperação morfológica e funcional, após lesões traumáticas de nervos periféricos usando o nervo ciático, facial, mediano, ulnar e peroneal em algumas espécies, como roedores (WANG et al., 2012; SATAR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010; PAN et al., 2006; CHEN et al., 2007; PEREIRA LOPES et al., 2006) e primatas (HU et al., 2013).

Zhao et al. (2011) avaliaram o uso de CTMM em modelo de lesão de nervo periférico em camundongos. As CTMM produziram citocinas e fatores de crescimento, amplificando a função neurotrófica das células de Schwann. Resultados similares foram obtidos por Wang et al. (2009) avaliando o comportamento das CTMM em um modelo *in vitro* de co-cultura de CTMM com células de Schwann, com posterior transplante no nervo ciático do rato. Na avaliação *in vitro* as CTMM melhoraram a sobrevivência e proliferação das células de Schwann e estimularam a expressão de receptores e dos fatores neurotróficos NGF, BDNF, entre outros.

Adicionalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que CTMM submetidas a protocolos de diferenciação neural ou pela sua capacidade intrínseca de transdiferenciação, apresentaram fenótipos de linhagens neurais incluindo neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células de Schwann (CHUNG et al., 2013; KINGHAM et al., 2007; WOODBURY et al., 2000). Todavia, ainda é discutido na literatura se estas células possuem a

mesma capacidade funcional de uma célula neural (BARBANÉ et al., 2009), levando também em consideração que os axônios em regeneração crescem em direção ao coto distal em íntimo contato com células de Schwann.

Outros autores defendem a hipótese que a fusão espontânea das CTMM transplantadas com as células hospedeiras e a produção de citocinas e fatores neurotróficos impactam positivamente a sobrevivência neural e estimulam a neurogênese local no nervo, ao invés de transdiferenciação real (SATAR et al., 2012; WANG et al., 2009).

Esses dados sugerem que as CTMM podem construir um microambiente favorável para estimular e suportar o crescimento, maturação e diferenciação das células de Schwann para a posterior formação das bandas de Bungner e inervação precisa do alvo.

3.2 Engenharia de vasos sanguíneos e marcação celular

Alguns trabalhos têm usado a veia descelularizada (VD) como arcabouço (*scaffold*) pra implantar células e desenvolver vasos sanguíneos a partir da diferenciação em endotélio (DIMUZIO et al. 2006; PAWLOWSKI et al., 2004). A utilização de tecidos descelularizados, alogênicos ou xenogênicos, como *scaffold* para o transplante de células tem como objetivo mimetizar o tecido ou estrutura original (DAHL et al., 2003) A descelularização de estruturas homólogas ou heterólogas pode evitar a rejeição do enxerto pela resposta imunológica. Embora heteroenxertos descelularizados induzam uma resposta inflamatória por parte do receptor, podem ser repovoadas por células autólogas, melhorando a sobrevida tardia dos enxertos (LOPES, 2009).

Na remoção do material celular e nuclear preserva-se a estrutura tridimensional, atividade biológica e a integridade mecânica da matriz extracelular restante (GILBERT et al., 2006).

O sucesso na terapia celular e potencial regenerativo das CT, não só depende do tipo, da quantidade e dos métodos de fornecimento das células,

mas também do aporte definitivo no local desejado (FOX et al., 2007). Para alcançar o completo potencial terapêutico, o processo de sobrevivência, diferenciação e enxerto das CTMM pós-transplante deve ser claramente conhecido. Para direcionar esta necessidade, imagens baseadas em nanopartículas têm sido desenvolvidas para pesquisar as células tronco transplantadas, tendo vantagens por ser um método pouco invasivo, de fácil acesso e de produção de fluorescência (JONES; MCGONAGLE, 2007).

O marcador Qtracker® permite carregar intracelularmente com nanocristais fluorescentes Quantum dots (QD) (pontos quânticos). Os QD são nanopartículas com fluoróforos inorgânicos. Têm sido usados *in vitro*, para a marcação de células e posterior pesquisa *in vivo* (LARSON et al., 2004; JAISWAL et al., 2003). A meia vida longa e a mínima deposição não específica faz que o Qtracker® seja importante para o estudo da movimentação celular, migração, diferenciação, morfologia e função celular.

Estudos recentes, principalmente no miocárdio, têm usado os pontos quânticos para a obtenção de imagens *in vivo* como um método não invasivo de análise molecular (BRUCHEZ et al., 2005) Oliveira et al (2009), utilizando o modelo de infarto do miocárdio, transplantaram hCTMM marcadas com QDs. Observou-se ausência de alteração na sua capacidade de diferenciação e proliferação 6 dias após o transplante.

Após a lesão de nervo periférico por axonotomia, os corpos celulares dos neurônios devem sobreviver e sintetizar material para a regeneração axonal. O coto distal e as células não neuronais devem proporcionar um ambiente trófico adequado e substratos de suporte para os axônios que estão regenerando façam conexões funcionais com o órgão alvo, para finalmente recuperar o processo de atrofia por denervação (FU; GORDON, 1994)

Segundo Mackinnon (1996), é improvável que haja melhores resultados clínicos através de refinamentos de apenas as técnicas microcirúrgicas. Como relatado por Piskins et al. (2008), embora seja contínua a introdução de novas técnicas microcirúrgicas baseadas em estudos científicos, o reparo de nervos periféricos é ainda uma das tarefas mais desafiadoras na microcirurgia, dado que a resposta funcional é raramente satisfatória. Desde então se têm visto

inúmeros estudos associando fatores externos na complementação do tratamento cirúrgico.

Dos fatores indutores ou promotores da regeneração nervosa periférica, as células-tronco são provavelmente, atualmente, o fator de interferência mais estudado.

Das fontes de células-tronco estudadas, não se encontram relatos que usem CTMM-TA xenogênicas caninas na regeneração do nervo periférico em modelos experimentais.

Segundo Walsh et al. (2009), embora muitas pesquisas tenham se preocupado em comprovar o potencial de regeneração em nervos periféricos de diversas células-tronco de diferentes fontes, poucos estudos têm se interessado em compará-las. Outros questionamentos sobre a utilização da terapia celular para a regeneração de nervos periféricos são: o número de células-tronco ideal a ser ofertado no local da lesão; se realmente estas células-tronco precisam adotar completamente o fenótipo das células de Schwann para exercer função na reparação de nervos periféricos; qual o melhor método de transplante estas células no local da lesão e o tempo de sobrevivência das células necessário para evocar efeito terapêutico.

Dentro do âmbito da pesquisa e rastreamento da migração das células tronco sob marcação, não há suficientes trabalhos verificando a localização e migração das células marcadas após o transplante na regeneração de nervos periféricos.

São escassos os trabalhos testando o efeito de veia submetida aos processos de descelularização como suporte biológico ou arcabouço na regeneração de nervos periféricos lesados.

Existem muitas perguntas acerca do potencial regenerativo dos diferentes tipos de células-tronco e suas fontes, seja dos métodos de oferecimento, integração e sobrevivência destas células no local da injúria do nervo ou mesmo das formas de avaliação dos resultados. Assim, muitos estudos ainda são necessários para elucidar cada uma das questões apresentadas.

O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos do transplante de CTMM-TA canino e murino na regeneração do nervo periférico em modelo experimental murino de neurotmesa do nervo ciático.

CAPÍTULO 2

Trabalho Científico

TRABALHO CIENTÍFICO

O artigo a seguir foi redirigido em conformidade com as normas do periódico
International Journal of Stem Cells

Efeito do transplante de células tronco mesenquimais multipotentes na regeneração do nervo periférico de ratos.

Diego Rodriguez Sanchez¹, Matheus Bertanha², Thiago Dias Fernandes³, Renee Laufer Amorim⁴, Luiz Antônio de Lima Resende³, Elenice Deffune⁵, Rogério Martins Amorim^{1*}.

¹Departamento de Clínica Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP, Brasil

²Departamento de Cirurgia e Ortopedia-Faculdade de Medicina- Unesp - Botucatu- SP, Brasil.

³Departamento de Neurologia e Psiquiatria - Faculdade de Medicina - Unesp - Botucatu - SP, Brasil.

⁴Departamento de Patologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP, Brasil

⁵Hemocentro de Botucatu– Faculdade de Medicina de Botucatu — UNESP – SP, Brasil

*Autor para correspondência: Rogério Martins Amorim, Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. Distrito de Rubião Junior, caixa postal 560, Telefone: (14) 3811-6000, Fax: (14) 3815-2343. E-mail: rmamorim@fmvz.unesp.br

Palavras Chave: Nervo ciático, Células-tronco mesenquimais, Regeneração nervosa, Terapia celular, Medicina regenerativa

Resumo

Justificativa e Objetivos

O trauma de nervos periféricos por neurotmeze apresenta recuperação insatisfatória devido à falha de regeneração. É essencial manter um microambiente permissivo para as células de Schwann no segmento distal do nervo lesado, assim sendo, a terapia celular apresenta potencial terapêutico baseado na substituição celular e promoção do crescimento axonal. As células-tronco mesenquimas multipotentes de tecido adiposo (CTMM-TA) são uma fonte promissora pela fácil cultura e expansão *in vitro* e por apresentarem propriedades regenerativas e antiinflamatórias. Comparou-se os efeitos do transplante de CTMM-TA caninas e murinas, em combinação com a técnica de tubulação com veia descelularizada na regeneração do nervo ciático.

Métodos

Ratos Wistar foram divididos em 5 grupos: controle (GC), denervado (GD), transplante de veia descelularizada (GV), veia descelularizada + células CTMM caninas (GCTMMc), veia descelularizada + células CTMM murinas (GCTMMm). Após a marcação *in vitro* com nanocristais fluorescentes, 1×10^6 de CTMM foram injetadas após neurotmeze de 10mm e tubulação. Durante o período de 35 dias avaliou-se a recuperação motora funcional e eletrofisiológica. Análises morfométricas e imunohistoquímicas avaliaram o processo de remielinização, a produção de fatores neurotróficos e a persistência das CTMM-TA.

Resultados

Os resultados do IFNC foram superiores no GCTMMc e GCTMMm no dia 27 ($p < 0.020$) e 35 ($p < 0.011$). A análise de ENMG revelou melhores resultados no GCTMMm. A densidade, o número e a área total das fibras demonstraram aumento no GCTMMc e GCTMMm. A imunoreatividade positiva ao BDNF e S-100 foi mais expressada nos nervos dos GCTMMc e GCTMMm. A presença de CTMM marcadas com pontos quânticos foram detetados no dia 35, indicando sobrevivência a longo prazo.

Conclusões

Demonstrou-se que as CTMM-TA caninas e murinas associadas ao *Scaffold* de veia descelularizada apresentaram efeitos positivos na regeneração do nervo ciático em ratos. Porém, as CTMM murinas mostraram melhores resultados funcionais, eletrofisiológicos e morfológicos do que as CTMM caninas.

Introdução

A recuperação funcional após a transecção nervosa é pobre e incompleta, ocorrendo degeneração dos axônios caracterizada pela fragmentação e separação da mielina (1,2). Embora o sistema nervosa periférico (SNP) apresente capacidade de regeneração, lesões extensas impedem a reconexão direta dos cotos nervosos. O enxerto de nervo é a técnica padrão, mas, com desvantagens, como a lesão funcional no nervo doador, reinervação e vascularização insatisfatória (3). É prescindível a manutenção do ambiente permissivo de crescimento no coto distal após o reparo. Nesta situação os condutos para a tubulação dos cotos proximal e distal permitem guiar os rebrotamentos das fibras, suplementar moléculas da matriz extracelular, fatores neurotróficos e células proporcionar um microambiente trófico (4,5). Se conhecem inúmeras alternativas usadas como enxertos artificiais, bioartificiais ou tubos guia, como silicone, colágeno, ácido poliglicólico, laminina, ácido polilático (4, 6, 7, 8).

O transplante células tronco mesenquimais multipotentes (CTMM), tem assumido o foco de atenção para o tratamento de lesões nervosas, devido aos efeitos positivos no processo de regeneração (8, 9,10,11,12,13). Diversos trabalhos têm demonstrado que o uso de CTMM nas lesões de nervos periféricos objetiva a substituição e fusão com as células de Schwann lesadas com a subsequente remielinização, a promoção dos efeitos parácrinos amplificando a produção de fatores neurotróficos e proteção axonal, a liberação de fatores de crescimento, efeitos imunomoduladores e antiinflamatórios, o fornecimento do suporte físico para o crescimento axonal, e o auxílio na produção de energia para o metabolismo axonal (7, 10, 11, 14, 15, 16, 17).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos do transplante de CTMM caninas e murinas em combinação com a técnica de tubulação com veia

descelularizada contendo células-tronco mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo (CTMM-TA), em modelo experimental de neurotmeose do nervo ciático de 10mm em ratos.

Foi hipotetizado que a suplementação das CTMM, após a técnica de tubulação, estimula a regeneração axonal para implementar os parâmetros funcionais, morfológicos e eletrofisiológicos.

Materiais e Métodos

Animais experimentais

Foram utilizados 40 ratos, sendo 20 machos e 20 fêmeas da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 300 gramas, com 90 dias de vida (biotério central da Unesp-Campus Botucatu - SP). Os animais passaram por um período de 10 dias de quarentena e receberam água e ração "*ad libitum*", sem restrições na movimentação, respeitando o ciclo de 12 horas de luz, com uma temperatura média de 24°C. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética de animais de experimentação da faculdade de Medicina de Botucatu: com o protocolo FMB-PE-2/2015 (CEP/CEUA).

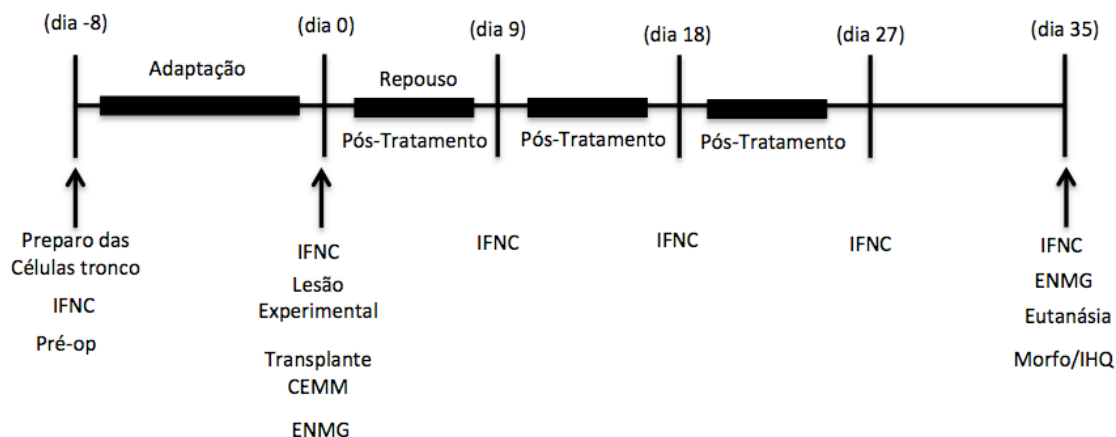
Delineamento experimental

Para observar o sinergismo da técnica de tubulação com o transplante de CTMM depois da neurotmeose, ratos Wistar (n=40), foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos. **Grupo 1 - controle de normalidade (GC) (n=8)**; foram submetidos a uma abordagem posterior do nervo ciático **Grupo 2 - Controle de desnervação (GD) (N=8)** foram submetidos a uma abordagem posterior do nervo ciático e o nervo foi denervado **Grupo 3 - Veia descclularizada (GV) (n=8)**; os animais passaram pelo procedimento

cirúrgico da técnica de tubulação e o conduto foi preenchido com solução HBSS.

Grupo 4 - Veia + Células tronco mesenquimais caninas (GCTMMc) (n=8); os animais passaram pelo procedimento cirúrgico da técnica de tubulação e o conduto foi preenchido com uma suspensão contendo CTMM caninas. **Grupo 5 - Veia + Células tronco mesenquimais murinas (GCTMMm) (n=8);** os animais passaram pelo procedimento cirúrgico da técnica de tubulação e o conduto foi preenchido com uma suspensão contendo CTMM murinas.

Dentre os parâmetros avaliados, incluiu-se a medição do índice de funcionalidade do nervo ciático (IFNC) antes da cirurgia (pré-op) e após a cirurgia, nos momentos 9, 18, 27 e 35 dias. Adicionalmente, foram realizadas avaliações por eletroneuromiografia (ENMG) nos momento pré-cirúrgico, no dia 0, e 35 dias pós-cirurgia. Os ratos foram eutanasiados aos 35 dias pós-cirúrgicos para coleta dos nervos ciáticos para realização de estudos morfométricos e de imunohistoquímica, assim como colheita e pesagem dos músculos tibial cranial (MTC) e gastrocnêmio de ambos os membros. O delineamento experimental é mostrado na Figura 2.



Eletroneuromiografia (ENMG); Células tronco mesenquimais (CTMM) Índice de funcionalidade do nervo ciático (IFNC), Morfometria e Imunoistoquímica (Morfo/IHQ).

Figura 2. Delineamento experimental.

Técnica de tubulação e transplante de CTMM

Os ratos dos grupos GV, GD, GCTMMc e GCTMMm foram submetidos a anestesia inalatória com isoflurano e realizada a aproximação posterior do nervo ciático esquerdo, seguido da neurotome (sunderland 5) removendo 10 mm da longitude do nervo sob microscópio cirúrgico (10,18).

O nervo ciático do GD foi seccionado, direccionado 90° e suturado na musculatura adjacente para evitar a reinervação. Os grupos GV, GCTMMc e GCTMMm foram submetidos a técnica de tubulação usando o enxerto de veia descelularizada, confeccionadas segundo os protocolos descritos (19). A veia foi fixada com pontos de sutura perineural, passando o fio 7/0 de polipropileno (Ethicon, Someville, USA) entre os cotos proximal e distal, inserindo 2 mm do nervo dentro da veia.

Os lumens das veias do GV foram preenchidos com 13µl de solução tampão

HBSS (Hank's balanced salt solution, GIBCO®), usando a microseringa Hamilton. Os lumens das veias dos GCTMMc e GCTMMm foram preenchidos com 13µl de solução contendo 10^6 células, previamente incubadas e marcadas com o nanocristal Qtracker® 655 (Life technologies corporation, Carlsbad, USA), de acordo com os protocolos do fabricante e microencapsuladas em gel de plaquetas canino e murino ativado com gluconato de cálcio (40mM, 1µl) e trombina (50U/cc, 2µl). Para a preparação do gel de plaquetas, amostras de sangue foram coletadas em tubos com anticoagulante citrato em proporção 1:10, de acordo aos protocolos especificados (20) (Figura 3). No período pós-operatório, os animais foram tratados com antiinflamatório, analgésico opióide e antibiótico.

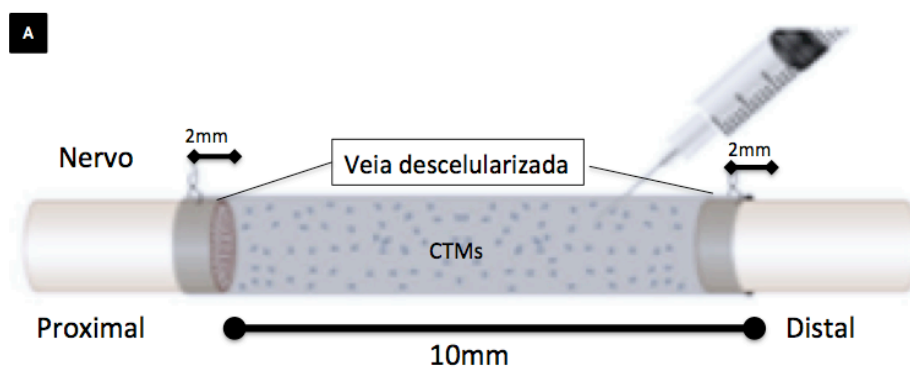


Figura 3. Esquema do transplante de CTMM após a tubulação do nervo ciático com veia descelularizada.

Isolamento e caracterização das CTMM-TA

As CTMM caninas e murinas foram extraídas de tecido adiposo subcutâneo obtidas no laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina (FMB/Botucatu, Brasil). As células foram dissociadas enzimaticamente, sendo digeridas com colagenase tipo 1 a 0,04% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), separadas por

centrifugação, filtradas e plaqueadas em garrafas de cultura, com 90% de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alta glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina (10000 U/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,005% de amicacina (250 mg/mL) (Novafarma, Anápolis, Brasil) e 1,2% de anfotericina B (3 µg/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As células foram tripsinizadas (tripsina, 0,25%, invitrogen, São Paulo, Brasil), quando atingiram 80% de confluência, seguindo os protocolos descritos por (19, 21).

As CTMM caninas e murinas mostraram aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, diferenciação para as linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica e expressão dos marcadores CD34-, CD45-, CD44+, CD90+ and CD105+ por citometria de fluxo (12, 13, 19, 21).

Viabilidade Celular

As CTMM caninas e murinas foram transplantadas com viabilidade entre 70 e 80%. A viabilidade celular foi realizada pelo teste de exclusão com azul de tripan a 0,3% imediatamente antes do transplante de CTMM nos grupos tratados. O resultado foi expresso em porcentagem de células viáveis, segundo a fórmula: Viabilidade (%) = $\frac{\text{Células coradas (viáveis)}}{\text{total de células (coradas + não coradas)}} \times 100$.

Teste da avaliação da marcha – “Walking Track”

Foi realizado nos 9º, 28º, 27º, 35º dias nos animais dos grupos GC, GV, GD GCTMMc e GCTMMm. Os membros pélvicos de cada animal foram umedecidos em tinta nanquim preta e os animais andaram por um corredor de 78 X 9 cm, sobre uma

folha de papel branco onde ficaram impressas as marcas dos membros. Estas marcas ou pegadas foram pelo índice funcional do nervo ciático (IFNC) usando a fórmula = $-38.3 \frac{[EPL - NPL]}{NPL} + 109.5 \frac{[ETS - NTS]}{NTS} + 13.3 \frac{[EIT - NIT]}{NIT} - 8.8$ (22). NPL (“Normal print length”): tamanho da pegada, do calcanhar aos dedos do pé normal. EPL (“Experimental print length”): tamanho da pegada do pé experimental. NTS (“Normal toe spread”): abertura total do pé normal ou a distância entre o primeiro e o quinto dedos. ETS (“Experimental toe spread”): abertura total do pé experimental. NIT - (Normal intermediary toe spread): abertura entre os dedos intermediários do pé normal ou distância entre o segundo e o quarto dedos. EIT (“Experimental intermediary toe spread”): abertura entre os dedos intermediários do pé experimental. O IFNC equivalente a -100, indica lesão total, como pode resultar da transecção do nervo ciático, enquanto ao redor de 0 reflete uma função normal.

Estudo eletrofisiológico

A latência (m/s) e a amplitude (mV) foram realizadas no GC, GD, GV, GCTMMc, GCTMMm antes da lesão experimental e 35 dias sob anestesia geral. No centro do músculo tibial cranial esquerdo foi colocado o eletrodo de superfície ativo (preto). O eletrodo de referência (vermelho) foi colocado próximo ao tendão de inserção do músculo e o eletrodo dispersivo (verde) posicionado na região abdominal ventral. O eletrodo de estimulação bipolar foi posicionado diretamente sobre o nervo ciático 5mm proximal a tubulação. O eletromiógrafo usado foi o Sapphire II 4ME e as gamas de intensidade de estimulação e filtro foram 10-20 mA e 20-2000 Hz, respectivamente.

Estudo morfológico

O estudo morfológico, incluindo o número de fibras nervosas, densidade das fibras nervosas e o diâmetro total do nervo foi realizado no dia 35 no GC, GD, GV e GCTMMc, GCTMMm. Para isso os animais foram humanamente eutanasiados para coletar as amostras dos nervos ciáticos. Adicionalmente, foram coletadas amostras dos músculos (tibial cranial e gastrocnêmio) do membro pélvico esquerdo (atrofiado) e direito (normal) para comparar a pesagem. As amostras da porção distal dos nervos ciáticos foram fixadas em formol tamponado 10% para posterior avaliação morfométrica, incluídas em parafina e obtidos cortes semifinos de 0,5 μm , corados em solução de tetróxido de ósmio 1%. As imagens foram obtidas usando o microscópio (Leica DM 4000 B-F).

O número de fibras nervosas (N), a densidade das fibras nervosas (N/mm^2) e o diâmetro total do nervo (μm^2) foram aferidos, obtendo-se quatro campos em cada lâmina com aumento de 1000x, usando o software Image J (National Institute of Health, USA) (23,24).

Fragmentos da porção central do nervo no GCTMMc e GCTMMm foram coletados para o rastreamento das células marcadas. As amostras foram processadas com o meio de inclusão O.C.T (optimal critical temperature), seguidos de cortes histológicos de 10 μm de espessura em criostato Leica-Modelo CM 1850 e analisadas no microscópio de fluorescência Leica DM LB, com comprimento de onda de 655 nm em aumentos de 10x e 40x.

Imunoistoquímica (IHC)

A expressão do BDNF e S-100 no nervo ciático foram realizadas aos 35 dias nos GC, GD, GV e GCTMMc, GCTMMm. Realizou-se marcação com o sistema biotina polímero HiDef™ HRP (Cell Marque®) com diaminobenzidina como cromógeno, usando os respectivos controles positivos e negativos. Os anticorpos usados foram Anti-S100 (Sigma-Aldrich; diluição 1:1000) e Anti-BDNF (Abcam; diluição 1:500). A intensidade de reação imunohistoquímica foi quantificada usando o software Image J (National Institute of Health, USA), como foi descrito por (25).

Análise Estatística

Se analisaram as variáveis do estudo de maneira independente, avaliando-se a normalidade, obtendo-se a mediana, o valor mínimo e o valor máximo. Posteriormente, comparou-se as medianas de cada variável entre grupos e entre momentos. Para as medidas pareadas ou repetidas foram utilizados os testes Wilcoxon e de Friedman, respectivamente. Para medidas não repetidas ou não pareadas foram utilizados os testes de Mann Whitney e de Kruskal Wallis (GraphPad Prism versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA)).

Resultados

Avaliação da Marcha - IFNC

Observou-se, no dia 9, as medianas dos valores de IFNC dos grupos GV (-86,54), GCTMMc (-89,58) e GCTMMm (-68,84), sendo o GV e o GCTMMm inferiores

ao GD (-87,32). Notou-se que a mediana foi GCTMMc>GD>GV>GCTMMm. ($P > 0.05$).

No dia 18, observou-se a as medianas dos valores de IFNC dos grupos GCTMMm (-73,86) e GCTMMc (-79,08), sendo inferiores ao GD (-87,32), GV (-91,00). Observou-se que a mediana foi GD>GV>GCTMMc>GCTMMm ($P > 0.05$).

No dia 27, observou-se as medianas dos valores do IFNC dos grupos GD (-81,91), GV (-88,57), GCTMMc (-89,52) e GCTMMm (-64,84). Houve diferença significativa entre os grupos GCTMMc e GCTMMm ($p < 0.020$). GCTMMc>GV>GD>GCTMMm (Figura 6).

No dia 35, observou-se a as medianas dos valores de IFNC dos grupos GD (-90,00), GV (-86,73), GCTMMc (-86,60) e GCTMMm (-53,58) (Figura 6).

Análise Eletrofisiológica

Latência

Verificou-se que as mediadas da latência no dia 0 do grupo GV (1,73m/s) e GD (1,73m/s) comparada com o dia 35 GV (0,00m/s) GD (0,00m/s). Os dados dos GV e GD não puderam ser obtidos pela ausência total de fibras. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0.05$).

Constatou-se que as mediadas da latência do grupo GCTMMc no dia 0 (1,75m/s) comparada com o dia 35 (3,1 m/s) apresentaram diferença significativa ($p < 0.0078$), entre a latência inicial e final.

Observou-se que as medíadas da latência do grupo GCTMMm no dia 0 (1,61 m/s) comparada com o dia 35 (1,73m/s) não observou-se diferença significativa ($p>0.05$), apresentando-se valores próximos ao normal antes da lesão experimental, indicando que a latência não foi prolongada neste grupo, por tanto teve melhores resultados.

No dia 35, notou-se as medianas dos valores da latência dos grupos GCTMMm (3,1m/s) e GCTMMc (1,73m/s), sendo superiores ao grupo GD (0,0m/s). Não foi possível obter os dados da latência dos grupos GD e GV pela ausência total de fibras para gerar o potencial de ação (Figura 7).

Amplitude

Constatou-se que as medíadas da amplitude no dia 0 do grupo GD (15,03mV) e GV (16,95mV) em comparação com o dia 35 do GD (0,00mV) e GV (0,00mV). Apresentou-se diferença significativa ($p<0.0078$). Indicando que não houve uma presença de fibras mielinizadas atingindo o órgão alvo, confirmando a denervação do grupo experimental (Figura 7)

O valor medio da amplitude do grupo GCTMMc e GCTMMm no dia 0 e 35 foram 16,95mV; 3,23mV e 17,45mV; 9,76mV, respectivamente ($p<0.0078$).

No dia 35, notou-se as medianas dos valores da amplitude dos grupos GD (0,00mV), GV (0,00mV), GCTMMc (3,23mV) e GCTMMm (9,76mV). Observou-se diferença significativa entre o GD e GCTMMm ($p<0.0005$) e entre GV e GCTMMm ($p<0.0005$). Observou-se que o GCTMMm>GCTMMc>GV>GD (Figura 7).

Morfometria da Área, Densidade e Diâmetro das Fibras Nervosas

No dia 35, observou-se as medianas da densidade e número de fibras nervosas dos grupos GCTMMc ($4,8 \pm 1,97/\text{mm}^2$, 2081 fibras); GCTMMm ($2,43 \pm 0,29/\text{mm}^2$, 1499 fibras); GV ($3,65 \pm 2,65/\text{mm}^2$, 1353 fibras) sendo superiores o grupo GD ($2,2 \pm 0,71/\text{mm}^2$, 431,5 fibras). Apresentou-se diferença significativa no número total de fibras entre os grupos GD e GCTMMc ($p < 0,0424$). Observou-se que os grupos $\text{GCTMMc} > \text{GCTMMm} > \text{GV} > \text{GD}$ (Figura 8).

No dia 35, verificou-se as médias da área total das fibras dos grupos GV ($437706 \pm 164532 \mu\text{m}^2$); GCTMMm ($600477 \pm 53063 \mu\text{m}^2$); GCTMMc ($629692 \pm 105336 \mu\text{m}^2$), sendo superior ao GD ($270322 \pm 184781 \mu\text{m}^2$). Observou-se diferença significativa entre o GD e GCTMMc ($p < 0,0242$). Apresentou-se diferença significativa entre o GD e GCTMMm ($p < 0,0242$) (Figura 9).

Os achados morfológicos dos nervos ciáticos mostraram degeneração axonal em todos os grupos experimentais, caracterizados pela presença de quebra e desintegração da mielina, câmaras de digestão, proliferação de células de Schwann, compartimentalização, minifascículos de degeneração rodeados por perineuro e grande invasão de tecido conectivo com perda da arquitetura normal. Porém, uma melhora dos aspectos morfológicos, incluindo rebrotamentos axonais e presença de fibras mielinizadas, foram observados na porção distal do nervo ciático lesado nos grupos GV, GCTMMm e GCTMMc, quando comparado com o grupo GD (Figura 11).

Foi observada a persistência das CTMM-TA marcadas na porção proximal do nervo ciático lesado nos grupos GCTMMc e GCTMMm, indicando o enxerto das CTMM-TA nos nervos (Figura 13).

Imunoistoquímica

No dia 35, analisou-se a as medianas dos valores da expressão do BDNF dos grupos GV (0,17), GCTMMc (0,32) e GCTMMm (0,29), sendo superiores ao grupo GD (0,14). Observo-se que a mediana foi GCTMMc>GCTMMm>GV>GD (figura 10). Observou-se diferença significativa entre os grupos GCTMMc e GD ($p<0.0034$). GCTMMc > GD (Figura 10) (Figura 11).

A expressão de S-100, localizado maiormente na bainha de mielina, foi alta nos grupos GCTMMc e GCTMMm, quando comparado com o GD e GV (figura 12).

Percebeu-se que uma porcentagem baixa de CTMM marcadas com QDs, mostraram um comportamento de migração desde o lugar de maior concentração celular, até as regiões tanto proximais como distais dos nervos reparados com o *Scaffold* de veia descelularizada.

As passagens dos musculos tibial cranial e gastronemio esquerdo no dia 35, mostraram diferenças estatísticas em todos os grupos experimentais ($p<0,0002$), quando comparados com o lado direito (Tabela 1). Porém, na comparação dos grupos, não houve diferença estatística tanto no musculo gastrônemio ($p=0.139$), como no musculo tibial cranial ($p=0,075$).

Discussão

Para a regeneração de nervos periféricos o "ambiente" tecidual deve ser favorável. As três maiores falhas que prejudicam a regeneração são: os constituintes celulares, a organização geométrica dos componentes e os fatores neurotróficos. Neste contexto, buscou-se com este estudo influenciar os constituintes celulares responsáveis pela regeneração do nervo periférico e a síntese de fatores neurotróficos através do

transplante de CTMM e a organização geométrica do nervo através da tubulação com a veia descelularizada.

Estudos tem demonstrado a regeneração de nervos periféricos através do transplante de células de Schwann, mas com limitações clínicas pela falta de obtenção de uma quantidade suficiente (4,9). As CTMM são uma fonte promissora pela capacidade de auto-renovação, alta taxa de crescimento e por apresentarem propriedades multipotentes (10,11,12,13). Diversas fontes de CTMM, incluindo CTMM-TA, têm sido usadas na regeneração de nervos periféricos. Usando se em combinação com tubos em alguns trabalhos, foram diferenciadas a células de Schwann-like (10). Em outros trabalhos foram injetadas diretamente dentro dos conduites (4,5,6,7), com a expectativa de secretar fatores parácrinos que possam estimular a regeneração nervosa (5,11)

Diversos trabalhos confirmaram os efeitos positivos das CTMM-TA na recuperação funcional do nervo periférico. Para lesões de 10mm, as CTMM diferenciadas e não diferenciadas transplantadas em conduites, tiveram efeitos similares como quando usou-se células de Schwann (9,26). Similarmente, as CTMM-TA estimularam a regeneração do nervo ciático com neurotme de 10mm, depois de 6 a 10 semanas (27).

O IFNC é um método de atividade motora, que avalia a musculatura intrínseca dos membros pélvicos, innervada pelos nervos tibial cranial e peroneal comum (18, 28). No nosso estudo o GCTMMc mostrou efeitos positivos no IFNC aos 35 dias, de acordo com os resultados positivos obtidos na análise eletrofisiológica e no número e densidade das fibras nervosas. Neste sentido os resultados sugerem que a recuperação funcional de neurotme é neste curto período de tempo é substancial, com o uso de terapia celular.

Contrario ao descrito, alguns trabalhos tem mostrado poucos efeitos na melhora da função muscular intrínseca em estudos de neurotmeese e transplante de CTMM (29), ou ausência de efeitos sinérgicos entre CTMM e o exercício após neurotmeese de nervo periférico (30).

As alterações na ENMG após a neurotmeese do nervo ciático foram caracterizadas por um pico negativo inicial com marcada diminuição da amplitude e um inicio de latência prolongado nos grupos GD, GV, porém com melhores resultados no GCTMMc e GCTMMm. Os estudos eletrofisiológicos são eficientes e tem mostrado boa correlação com a severidade da lesão de nervos periféricos em modelos experimentais (18, 22).

Os grupos tratados com CTMM-TA revelaram melhores resultados na amplitude do que os GV e GD, indicando que tiveram mais crescimento de fibras mielinizadas gerando o registro eletrofisiologico. Alem disso, os GCTMMc e GCTMMm mantiveram a latencia proximo aos valores normais, indicando que o tratamento pode ter contribuido na remielinização do nervo danificado. Esta afirmação é reforçada pelos achados no IFNC e pelo incremento no número, área e densidade de fibras nervosas na porção distal do nervo ciático, nos grupos GCTMMc e GCTMMm, indicando a presença de rebrotamentos axonais mielinizados como foi descrito em outros estudos (18,22). Provavelmete esses efeitos foram associados com a melhora do microambiente, mediado pelos fatores neurotróficos tais como o BDNF, secretado pelas CTMM. Por outro lado, a presença de CTMM marcadas com nanocristal Qtracker® 655 nos grupos GCTMMc e GCTMMm, suportam esses achados.

Há evidencia *in vitro* e *in vivo* que fatores neurotróficos exógenos estimulam a regeneração de axônios no coto distal dos nervos lesados por axonotemese ou

neurotmeze. A família das neurotrofinas envolvidas no processo de regeneração, estimulando a síntese de proteínas do citoesqueleto, inclui o NGF, BDNF, NT-3, 4 e 5 e os seus receptores P75^{NPR} e Trk (17,12,31,32,33) . Os receptores do BDNF e NGF são expressados poucos dias após a lesão do nervo, seguido de uma diminuição da expressão em aproximadamente em 4 semanas. Neste contexto, a alta expressão do BDNF observado no nosso estudo em 35 dias nos grupos GCTMMc e GCTMMm sugere que as CTMM-TA transplantadas secretaram essas neurotrofinas, de acordo com outros estudos (17,32,,33,34).

Estudos tem relatado que com estímulos apropriados e condições do microambiente as CTMM podem se diferenciar em células Schwann-like (8,10,17). Por outro lado, em um estudo in vivo demonstrou-se incremento da proteína S-100 e o receptor p75^{NTR} no nervo ciático após neurotmeze em ratos (35). Portanto, o aumento na expressão de S-100 no grupo GCTMMc e GCTMMm em comparação com GD e GV no nosso trabalho, pode ser relacionado com a possível diferenciação a células Schwann-like das CTMM-TA transplantadas, assim com ao aumento da proliferação endógena das células de Schwann mediada pelos efeitos paracrinos das CTMM-TA como foi supracitado.

No modelo de neurotmeze a recuperação funcional começa ao redor de 30 dias, com a formação de axônios maduros e bainha de mielina atingindo o limiar de 120 dias (36). Portanto, a ausência de recuperação muscular nos grupos tratados com CTMM pode ser justificada pelo tempo insuficiente para uma completa reinervação muscular.

Em geral a neurotmeze de 10 mm de intervalo produz mínima ou ausente recuperação funcional em ratos (4,37). Contudo, diversos estudos usando terapia baseada em CTMM mostraram efeitos positivos na regeneração do nervo ciático 6 a 12

semanas depois da neurotmeze, variando de 3 a 10mm de intervalo da lesão (29,38,39,40). Nossos resultados estão de acordo com esses achados, indicando que após a neurotmeze de 10mm, a regeneração do nervo é aumentada pelo transplante de CTMM, ainda em um curto período de 35 dias.

A regeneração de nervos pode depender do gradiente e disponibilidade das neurotrofinas, por tanto diâmetro do *scaffold* pode influenciar. Diâmetros acima de 2 mm foram observados nas veias descelularizadas. Diversos estudos demonstraram que o reparo usando-se tubos de menor diâmetro apresentam melhores resultados no processo de regeneração do nervo periférico em modelos murinos de neurotmeze (41,42). Neste sentido as CTMM suportaram a regeneração e recuperação funcional pelo aumento da produção de fatores neurotróficos e a capacidade de *homing*.

Conclusões

Com a metodologia empregada demonstrou-se que as CTMM derivadas do tecido adiposo canino e murino apresentaram efeitos positivos para o processo de regeneração do nervo ciático no modelo experimental de neurotmeze em ratos. Adicionalmente observamos que as CTMM murinas apresentaram melhores resultados, funcionais, eletrofisiológicos e morfológicos do que as CTMM caninas.

Interesses conflitantes

Os autores declaram não terem interesses conflitantes.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Julho de Mesquita Filho" (FMVZ-UNESP), campus Botucatu e Unidade de pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-Unesp). Os autores agradecemos aos Médicos Veterinários Diego Generoso e Diana Leocata, pela assistência técnica. Ao Prof. Dr Matheus Bertanha pelo apoio na obtenção dos materiais biológicos. À Médica Veterinária Juliana Mira pela ajuda nas análises estatísticas. À Médica Veterinária Giovanna Boff pela contribuição na correção do manuscrito.

Referências

1. Kerschensteiner ME, Schwab JW, Lichtman T, Misge LD. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat. Med* 2005; 11: 572–577
2. Lubińska L. Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. *Brain Res* 1982; 233: 227–240
3. Millesi H. Factors of affecting the outcome of peripheral nerve surgery, *Microsurgery* 2006; 26: 295-302
4. Lundborg G, Sweden M. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: involving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg* 2000; 25:391-431
5. Wang G, Guangyuan L, Qiang Ao, Yandao G, Xiufang Z. Preparation of cross-linked carboxymethyl chitosan for repairing sciatic nerve injury in rats. *Biotechnol Lett* 2010; 32: 59-66
6. Tyner TR, Parks N, Fariab S, Simonsb M, Stappb B, Curtis B, Sian K, Yamaguchi KT. "Effects of collagen nerve guide on neuroma formation and neuropathic pain in a rat model." *The American Journal of Surgery* 2007; 193: 1-6
7. Oliveira JT, Almeida FM, Biancalana A, Baptista AF, Tomaz MA, Melo PA, Martinez AM. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit enhance median-nerve regeneration, prevent decrease of creatine phosphokinase levels in muscle, and improve functional recovery in mice. *Neuroscience* 2010; 170:1295–1303
8. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair - current views. *Stem Cells* 2007; 25: 2896 - 2902
9. Hood B, Levenne HB, Levi AD. Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects. *Neurosurgery focus* 2009; 26 (2)
10. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 2001;14: 1771-1776
11. Keilhoff G, Fansa H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration—A real hope or just an empty promise? *Experimental Neurology* 2011; 232(2): 110–113

12. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25: 2739-2749
13. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause A, Deans R, Keating A, Prochop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317
14. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499 -3506
15. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 2003; 31: 890-896
16. Spees JL, Olson SD, Whitbey JM, Prockop JD. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 1283-1288
17. Wang J, Ding F, Gu Y, Liu J, Gu X. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. *Brain Res* 2009;1262: 7-15
18. Varejão AS, Cabrita AM, Meek MF, Bulas-Cruz J, Melo-Pinto P, Raimondo S, Geuna S, Giacobini-Robecchi MG. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *J Neurotrauma* 2004; 21:1652-1670
19. Bertanha M, Moroz A, Lameida R, Alves FV, Acorci MJ, Moura R, Custódio MA, Lima M, Deffune E. Tissue - engineered blood vessel substitute by reconstruction of endothelium using mesenchymal stem cells induced by platelet growth factors. *Journal of vascular surgery* 2014; 59:1677-1685.
20. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 2003;74(6): 849-57
21. Garcia, H. Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato sob ação da luz continua e pulsátil de 630 nm utilizando LED. 2015. 134f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu.

22. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989; 83(1): 129-136
23. Dahlhoff M, Emrich D, Eckhard W, Schneider MR. Increased activation of the epidermal growth factor receptor in transgenic mice overexpressing epigen causes peripheral neuropathy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Basis of Disease* 2013; 1832: 2068-2076
24. Gundersen HJ. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of Microscopy* 1977; 111: 219-223
25. Carriel VS, Aneiros-Fernandez J, Arias-Santiago S, Garzon IJ, Alaminos M, Campos A. A novel histochemical method for a simultaneous staining of melanin and collagen fibers. *J. Histochem. Cytochem* 2011; 59: 270-7
26. Orbay, H, Uysak AC, Hyakusoku H, Mizuno H. Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg* 2012; 65: 657-664.
27. Liu G, Cheng Y, Guo S, Feng Y, Li Q, Jia H, Wang Y, Tong L, Tong X. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. *Int, J Mol. Med.* 2011; 28: 565-572.
28. Dinh P, Hazel A, Palispis W, Suryadevara S, Gupta R. Functional assessment after sciatic nerve injury in a rat model. *Microsurgery* 2009; 29: 644-649
29. Alexanian AR, Maiman DJ, Kurpad SN, Gennarelli TA. In vitro and in vivo characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 1123-1130.
30. Wang J, Chen-Chia Y, Shyh-Chang C, Yueh-Ling H. No synergistic effect of mesenchymal stem cells and exercise on functional recovery following sciatic nerve transection, *Functional Neurology* 2010; 25: 33-43
31. Lewin SL, Utley DS, Cheng ET, Verity AN, Terris DJ. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope* 1997; 107: 992-999
32. Hoke A, Gordon T, Zochodne DW, Sulaiman OA. A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Exp Neurol* 2002; 173: 77-85
33. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve

regeneration. *Mol Neurobiol* 1997; 14:67–116

34. Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 2002; 15:613-626

35. Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira Jr RS, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, Góes AM, Oliveira ALR. Mesenchymal stem cell engrafted in a fibrin dvaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization 2015; 112: 14-24.

36. Tos P, Ronchi G, Papalia IZ, Sallen YV, Legagneux J, Geuna ZS, Giacobini-robecchiz MG. Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I experimental models international review of 47 neurobiology 2009; (87):47-79

37. Campbell, W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology* 2008;119:1951–1965

38. Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Kazuki K, Tabata Y, Ikada Y, Nakamura H. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102: 1370-1378

39. Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Kazuki K, Ikada Y, Nakamura H. Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 419: 130-135

40. Sun F, Zhou K, Mi WJ, Qiu JH. Repair of facial nerve defects with decellularized artery allografts containing autologous adipose-derived stem cells in a rat model. *Neurosci Lett* 2011; 499:104-8.

41. Waitayawinyu T, Parisi DM, Miller B, et al. A comparison of polyglycolic acid versus type 1 collagen bioabsorbable nerve conduits in a rat model: an alternative to autografting. *J Hand Surg Am* 2007; 32(10):1521–9

FIGURAS

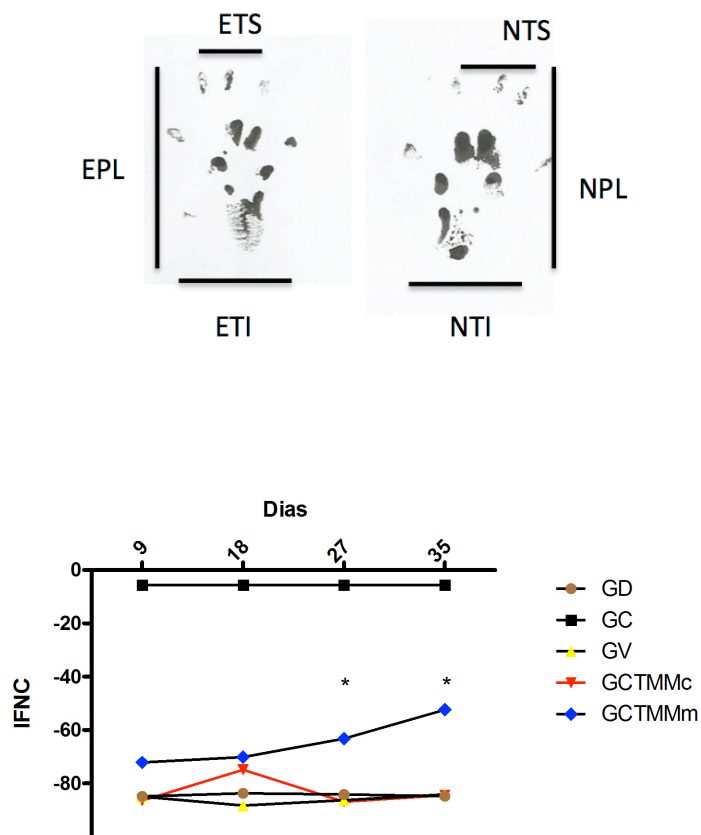


Figura 6. Gráfico representando a pegada típica obtida de um animal normal com as suas respectivas variáveis e avaliação da marcha. O efeito do transplante de CTTMM na função do nervo ciático foi determinado nos GC (n=7) GD (n=7), GV(n=7), GCTMMc (n=7), GCTMMm (n=7), aos dias 9, 18, 27, 35 após os procedimentos cirúrgicos (1-4 semanas). * diferença entre os grupos ($p < 0,020$).

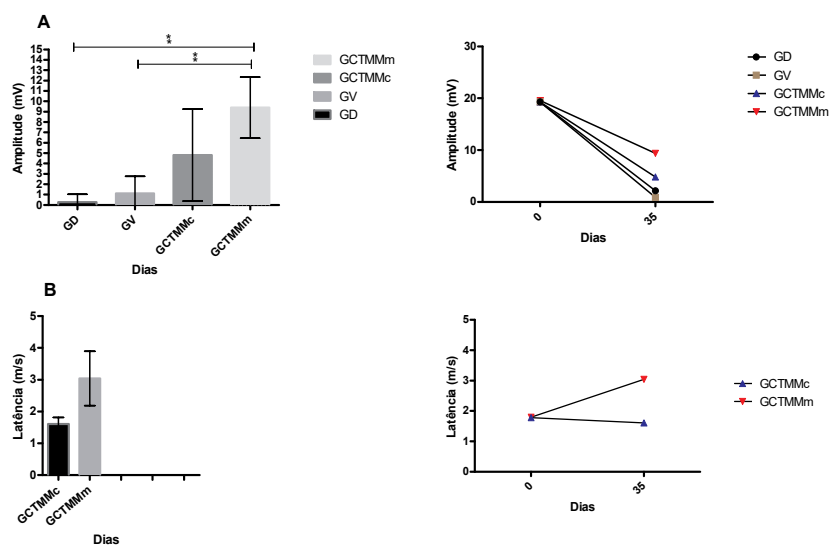


Figura 7. Gráfico representando a amplitude (A) e a latência (B) dos grupos experimentais nos dias 0 antes dos procedimentos experimentais e 35 após o reparo do nervo ciático esquerdo. O efeito do transplante de CTMM na ENMG do nervo ciático foi determinada nos GD (G1, n=7) GC (G2, n=7), GV (G3, n=7), GCTMMc (G4, n=7), GCTMMm (G5, n=7). ** diferença entre os grupos ($p < 0.0005$).

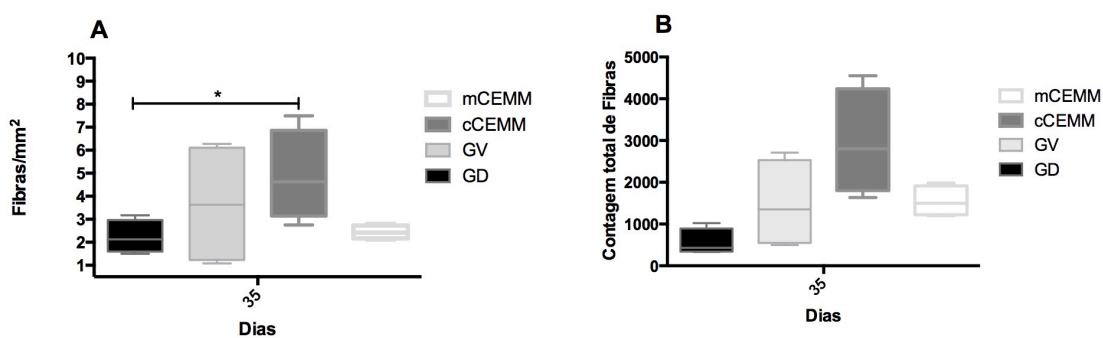


Figura 8. Gráficos representando a densidade de fibras nervosas (A) e o número total de fibras (B). Grupos experimentais GD, (n=7), GV(n=7), GCTMMc (n=7), GCTMMm (n=7), no momento final do experimento (35 dias). * diferença entre os grupos ($p < 0.0424$)

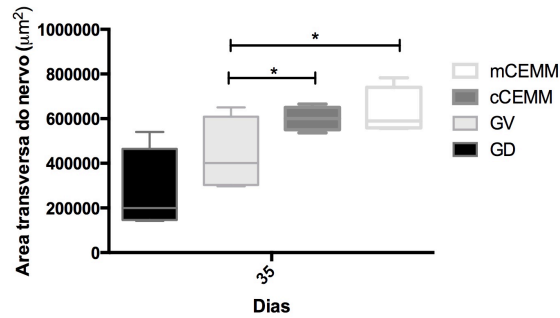


Figura 9. Gráfico representando a área total do nervo. Grupos experimentais GD, (n=7), GV(n=7), GCTMMc (n=7), GCTMMm (n=7), no dia 35 após o reparo do nervo ciático esquerdo. * diferença entre os grupos ($p < 0.0242$).

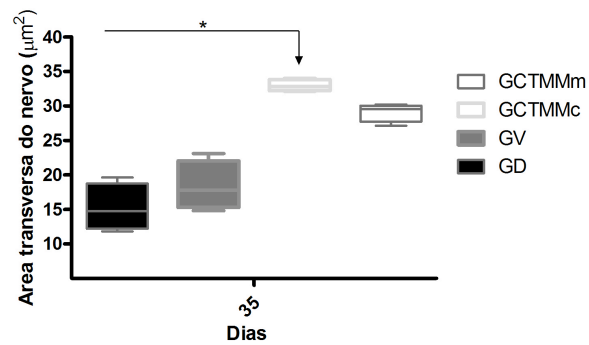


Figura 10. Gráfico representando a marcação imunohistoquímica do BDNF. GD (n=7), GV(n=7), GCTMMc (n=7), GCTMMm (n=7), no dia 35 após o reparo do nervo ciático esquerdo. * diferença entre os grupos ($p < 0.0034$).

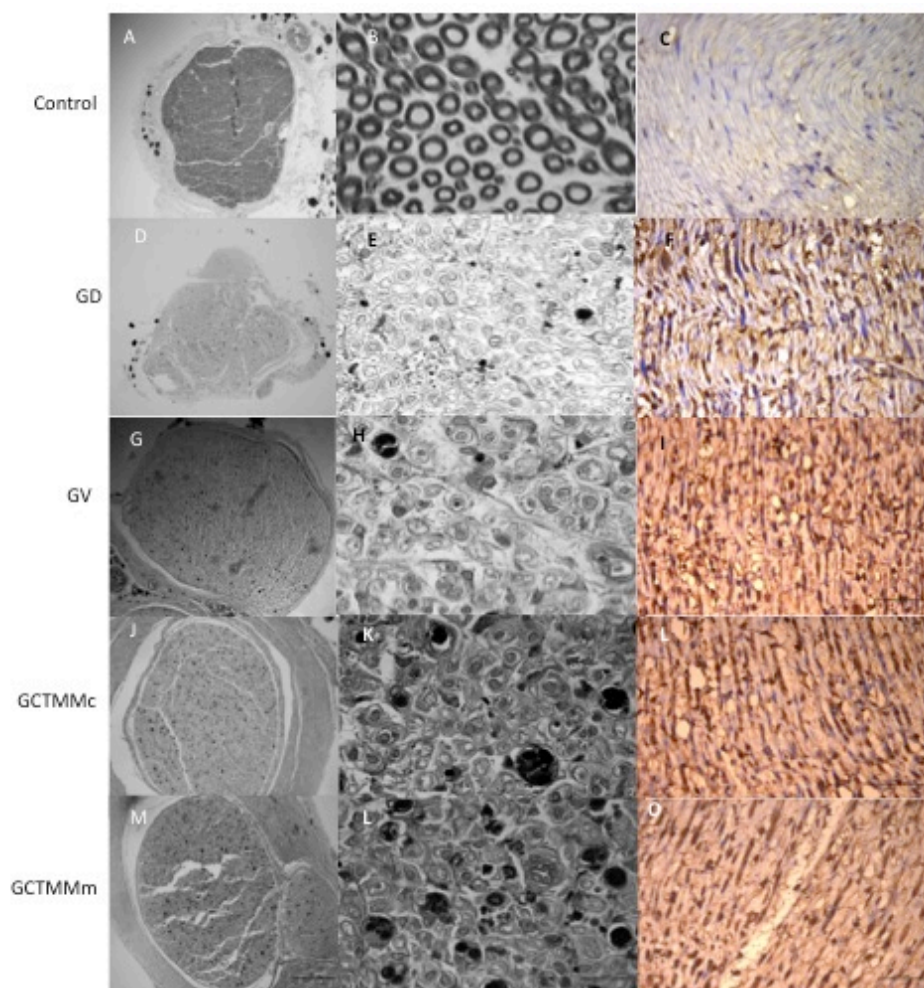


Figura 11. Imagens panorâmicas e em zoom, do nervo ciático esquerdo dos grupos: GC (A,B,C), GD (D,E,F), GV (G,H,I), GCTMMc (J,K,L), GCTMMm (M,N,O), mostrando o diâmetro total da fibra nervosa (A,D,G, J, M, magnificação, 10x), número e densidade de axônios (B, E, H, K,N, magnificação,100x) e tincão positiva de imunistoquímica para BDNF na porção distal do nervo ciático esquerdo(C, F, I, L, O, magnificação, 40x).

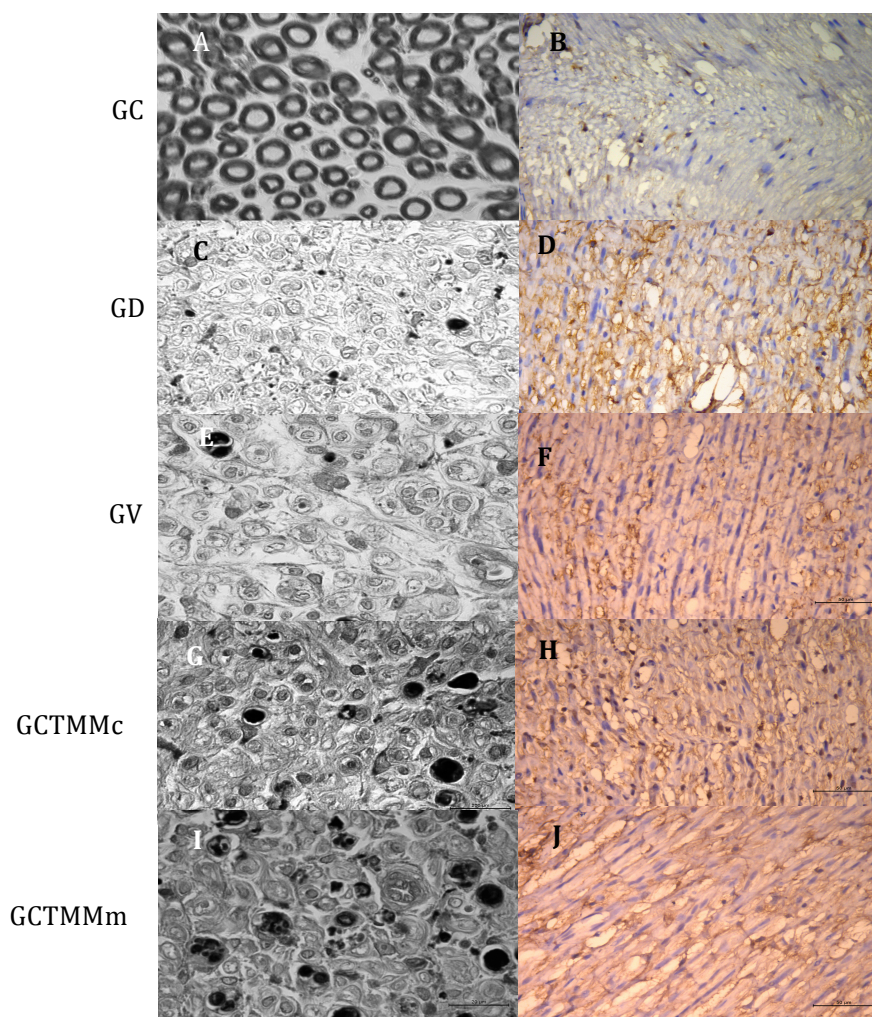


Figura 12. Imagens panorâmicas e em zoom, do nervo ciático esquerdo dos grupos: GC (A,B), GD (C,D), GV (E,F), GCTMMc (G,H), GCTMMm (I,J), mostrando o diâmetro número e densidade de axônios, representando a ausência e quebra da bainha de mielina e axônios degenerados (A, C, E, G,I, magnificação,100x) e tinção positiva de imunohistoquímica para S-100 na porção distal do nervo ciático esquerdo, mostrando baixa intensidade no GC (controle de denervação) (B), e positividade para a marcação nos grupos GV, GCTMMc e GCTMMm, indicando presença e proliferação de células de Schwann (B,D,F,H,J, magnificação, 40x).

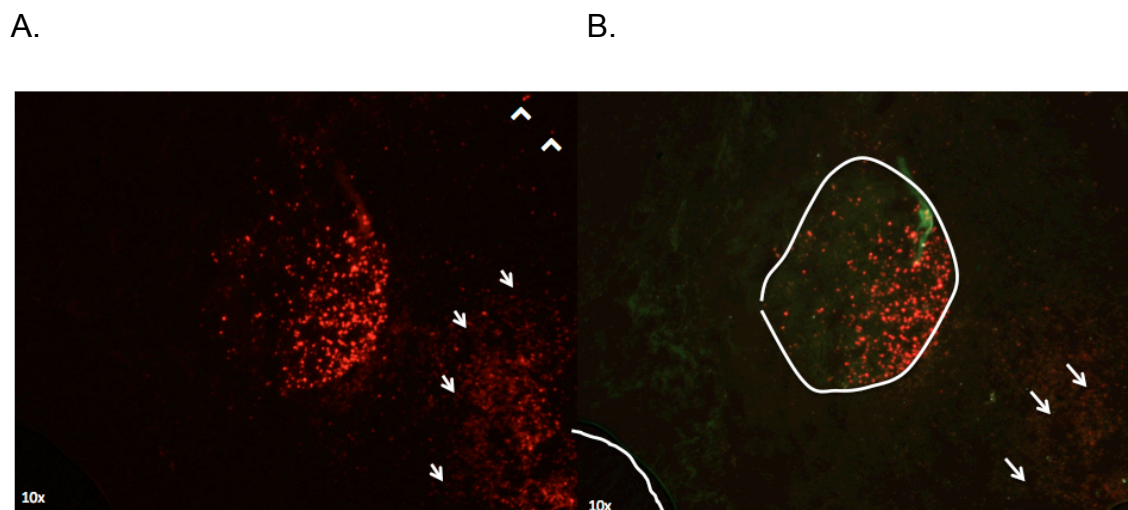


Figura 13. Marcação das CTMM com os nanocristais Qtracker® 655 no microscópio de fluorescência com o filtro vermelho (A) e verde (B), 35 dias após a tubulação com veia descelularizada do nervo ciático esquerdo e microencapsulação com gel de plaquetas. As setas representam as CTMM caninas. Na região demarcada observa-se a concentração da maioria da CTMM caninas principalmente na região proximal, conformando uma estrutura redonda compatível com a microencapsulação do gel (B). Note-se a migração celular para o coto distal (setas). Detecta-se algumas células migrando pra a região proximal (cabeça de seta). Magnificação 10x (A, B).

Tabela 1. Massa (g) dos músculos tibiais craniais direito e esquerdo. Média (g), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo do diâmetro do peso do músculo tibial cranial direito e esquerdo nos animais dos grupos, GD, GV, GCTMMc e GCTMMm

Grupos	Massa do Músculo		Massa do Músculo	
	Tibial Cranial Direito (g)		Tibial Cranial Esquerdo (g)	
	Média / dp	Mediana min/max	Média / dp	Mediana min/max
1. GD	0,63 ± 0,07	0,65	0,16 ± 0,02	0,15
	Ab	(0,48/0,87)	Ab	(0,13/0,22)
2. GV	0,61 ± 0,15	0,60	0,17 ± 0,03	0,17
	Ac	(0,45 / 0,82)	Ac	(0,12/1,22)
3. GCTMMm	0,48 ± 0,20	0,44	0,17 ± 0,06	0,16
	Db	(0,22 / 0,85)	Db	(0,11/0,26)
4. GCTMMc	0,55 ± 0,14	0,49	0,15 ± 0,05	0,13
	Ba	(0,39 / 0,72)	Ba	(0,11/0,27)

Massa do Músculo Tibial Cranial direito: GD=GV=GCTMMm=GCTMMc
 Massa do Músculo Tibial Cranial esquerdo: GD=GV=GCTMMm=GCTMMc
 Médias seguidas de letras minúsculas diferem estatisticamente entre si (P<0.05)

Tabela 2. Massa (g) do músculo gastrocnêmio direito e esquerdo. Média (g), desvio padrão, mediana, valor mínimo e máximo do diâmetro do peso do músculo gastrocnêmio e esquerdo nos animais dos grupos, GD, GV, GCTMMc e GCTMMm

Grupos	Massa do Músculo		Massa do Músculo	
	Gastrocnêmio direito (g)		Gastrocnêmio esquerdo (g)	
	Média/dp	Mediana min/max	Média/dp	Mediana min/max
1. GD	1,7 ± 0,28	1,6	0,40 ± 0,02	0,42
	Ac	(01,13/02,2)	Ac	(0,27/0,50)
2. GV	1,9 ± 0,52	01,85	0,47 ± 0,11	0,45
	Bc	(1,27 / 2,6)	Bc	(0,37/0,74)
3. GCTMMm	2,0 ± 0,76	1,9	0,61 ± 0,16	0,59
	Ab	(0,91 / 3,1)	Ab	(0,11/0,26)
4. GCTMMc	1,8 ± 0,16	1,6	0,5 ± 0,16	0,47
	Da	(1,3 / 2,5)	Da	(0,33/0,83)

Massa do Músculo Gastrocnêmio esquerdo: GD=GV=GCTMMm=GCTMMc

Massa do Músculo Gastrocnêmio direito: GD=GV=GCTMMm=GCTMMc

Médias seguidas de letras minúsculas diferem estatisticamente entre si (P< .05)

CAPÍTULO 3

Referências

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S; PITTENGER, M. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, v. 105, p. 1815-1822, 2005.

AKASSOGLU, K; STRICKLAND, S. "Nervous system pathology: the fibrin perspective". *Biological chemistry*, v. 383, p. 37-45, 2002.

ALEXANIAN, A.R; MAIMAN, D.J; KURPAD, S.N; GENNARELLI, T.A. In vitro and in vivo characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment. *Stem Cells*, v. 17, p. 1123-1130, 2008.

ARINZEH, T.L; PETER, S.J; ARCHAMBAULT, M.P; VAN DEN BOS, C; GORDON, S; KRAUS, K; SMITH, A; KADIYALA, S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical- sized canine segmental defect. *The Journal Bone and Joint Surgery*, v. 85, p. 1927–1935, 2003.

BAIN, J.R; MACKINNON, S.E; HUNTER, D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plastic Reconstructive Surgery*, v. 83, p. 129-138, 1989.

BAIN, J.R; VELTRI, K.L; CHAMBERLAIN, D; FAHNESTOCK, M. Improved functional recovery of denervated skeletal muscle after temporary sensory nerve innervation. *Neuroscience*, v. 103, p. 503– 510, 2001.

BARBANÉ, G. F. SCHWINDT, T.T; CALCAGNOTTO, M.E; MOTTA, F.L; MARTINEZ, G.Jr; de OLIVEIRA, A.C; KEIM, L.M; D'ALMEIDA, V; MENDEZ-OTERO, R; MELLO, L.E. Chemically-induced rat mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties. *Plos one*, v. 4, p. 5222, 2009.

BARTHOLOMEW, A; STURGEON, C; SIATSKAS, M; FERRER, K; MCINTOSH, K; PATIL, S; HARDY, W; DEVINE, S; UCKER, D; DEANS, R; MOSELEY, A; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, v. 30, p. 42-48, 2002.

BOYD, J.G; GORDON T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *European Journal of Neuroscience*, v.15, p. 613–626, 2002.

BRAGA-SILVA, J; GEHLEN, D; PADOIN, A.V; MACHADO, D.C. GARICHOCHEA, B. COSTA DA COSTA, J. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves?. *The Journal Hand Surgery, European Volume*, v. 33, p. 488-49, 2008.

BRUCHEZ, M.P. Turning all the lights on: quantum dots in cellular assays. *Current Opinion in Chemical Biology*, v, 9. p, 533-537, 2005.

BRUSHART, T.M; GERBER. J; KESSENS, P; CHEN, Y.G; ROYALL, R.M."Contributions of Pathway and Neuron to Preferential Motor Reinnervation". *The Journal of Neurosciense*, v. 18, p. 8674-8681, 1998.

BYDLOWSKI, S. P; DEBES A.A; MASELLI L.M.F; JANZ F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, v. 1, p.25-35, 2009.

CAMPBELL, W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clinical Neurophysiology*, v. 119, p. 1951–1965, 2008.

CARLSON, B.M; BORISOV, A.B; DEDKOV, E.I; DOW, D; KOSTROMI-NOVA T.Y. The biology and restorative capacity of long-term denervated skeletal Muscle. *Basic Applied Myology*, v.12, p. 247-254, 2002.

CARRIEL V. S; ANEIROS-FERNANDEZ, J; ARIAS-SANTIAGO, S; GARZON, I. J; ALAMINOS, M; CAMPOS, A. A novel histochemical method for a simultaneous staining of melanin and collagen fibers. *The Journal of histochemistry and cytochemistry*, v. 59, p. 270–277, 2011.

CHAMBERLAIN, G; FOX J; ASHTON B; MIDDLETON J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 2007.

CHEN, C.J; OU, Y.C; LIAO, S.L; CHEN, W.Y; CHEN, S.Y; WU, C.W; WANG, W.Y; HUANG, W.Y; HSU, S.H. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Experimental Neurology*, v. 204, p. 443-453, 2007.

CHEN, F. H; SONG L; MAUCK R.L;WAN-JU L; TUAN R.S. Mesenchymal Stem Cells. In: LANZA, R; LANGER, R; VACANTI, J. Principles of Tissue Engineering. (ed). San Diego: Elsevier Academic Press, 2007. chap. 55, p. 823-843.

CHEN, Y.S; HSIEH, C.L; TSAI, C.C; CHEN, T,H; CHENG, W.C; HU, C.L; YAI, C.H. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*, v. 21, p. 1541–1547, 2000.

CHEN, Z.L; YU, W.M; STRICKLAND, S. Peripheral Regeneration, *Annual Review Neuroscience*, v, 30. p, 209-33, 2007.

CHUNG, C.S; FUGITA, N; NAKAHARA, N; YUI, S; NAM, E; NISHIMURA, R. A Comparison of Neurosphere Differentiation Potential of Canine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of Veterinary Medical Sciences*, v. 75:7, p. 879:886, 2013.

COLEMAN, M. 2005. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nature Reviews, Neuroscience*. v, 6, p. 889–898, 2005.

COLOGNATO, H; FFRENCH-CONSTANT, C; FELTRI, M.L. Human diseases reveal novel roles for neural laminins. *Trends in Neurosciences*. v. 28, p. 480-486, 2005.

CONFORTI, L; GULLEY, J; COLEMAN, M. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nature*, v. 15, p. 394-409, 2014.

CONGET, P.A; MINGUELL, J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 181, p. 67-73, 1999.

DA SILVA, M.L; CHAGASTELLES, P.C; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, v.119, p. 2204-2213, 2006.

DAHL, S.L; KOH, J; PRABHAKAR, V; NIKLASON, L.E. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplantation*. v, 12, p. 659-66, 2003.

DEZAWA ,M. Takahashi, I; ESAKI, M; TAKANO, M; SAWADA, H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *The European Journal of Neuroscience*, v. 14, p. 1771-1776, 2001.

DI NICOLA, M; CARLO-STELLA, C; MAGNI, M; MILANESI, M; LONGONI, P.D; MATTEUCCI, P; GRISANTI, S; GIANNI, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, *Blood*, v. 99, p. 3838-3843, 2002.

DIMUZIO, P; FISCHER, L; MCILHENNY, S; DIMATTEO, C; GOLESORHKI, N; GRABO, D. Development of a tissue-engineered bypass graft seeded with stem cells. *Vascular*, v. 14, p. 338-42, 2006.

DINH, P; HAZEL, A; PALISPIS, W; SURYADEVARA, S; GUPTA, R. Functional assessment after sciatic nerve injury in a rat model. *Microsurgery*, v. 29, p. 644-

649, 2009.

DOMINICI, M; LE BLANC, K; MUELLER, I; SLAPER-CORTENBACH, I; MARINI, F; KRAUSE, A; DEANS, R; KEATING, A; PROCHOP, D.J; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, p. 315-317, 2006.

DOYU, M; SOBUE, G; KEN, E; KIMATA, K; SHINOMURA, T. Laminin A, B1, and B2 chain gene expression in transected and regenerating nerves: regulation by axonal signals. *The Journal Neurochemistry*, v. 60, p, 543–51, 1993.

DUAN, H; NIE, S. Cell-Penetrating Quantum Dots Based on Multivalent and Endosome-Disrupting Surface Coatings. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, p. 3333-3338, 2007.

DUBOVY, P. Schwann cells and endoneurial extracellular matrix molecules as potential cues for sorting of regenerated axons: A review. *Anatomical Science International*, v. 29, p. 198-208, 2004.

ERICES, A. P; CONGET, P, MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, v.109, p. 235–242, 2000.

FOX, J.M; CHAMBERLAIN, G; ASHTON, B.A; MIDDLETON, J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *British Journal of Haematology*, v.137, p.491-502, 2007.

FU, S.Y; GORDON, T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *Journal of Neuroscience*, v.15, p. 3886–3895, 1995.

FU, S.Y; GORDON, T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Molecular Neurobiology*, v. 14, p. 67–116, 1997.

FUREY, M.J; MIDHA, R; XU, Q.G; BELKAS, J; GORDON, T. Prolonged target deprivation reduces the capacity of injured motoneurons to regenerate. *Neurosurgery*, v. 60, p. 723–732, 2007 .

GANGULY, A; TANG, Y; WANG, L; LADT, K; LOI, J; DARGENT, B; CHRISTOPHE, L; ROY. A dynamic formin-dependent deep F-actin network in axons. *Journal of Cell Biology*, 2015.

GATTEGNO-HO, D; ARGYLE, S. A; ARGYLE, D. J. Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. *The Veterinary Journal*, v. 191, p. 19-27, 2012.

GENTIL, B. J; COOPER, L. Molecular basis of axonal dysfunction and traffic impairments in CMT. *Brain Research Bulletin*, v. 88, p. 444–453, 2012.

GEORGE, E.B; GLASS, J.D; GRIFFIN, W. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *Journal of Neuroscience*, v.15, p. 6445–6452, 1995.

GEORGE, R; J.W. GRIFFIN. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radicotomy model. *Experimental Neurology*, v. 129, p.225–236, 1994.

GILBERT, T.W; SELLARO, T.L; BADYLAK, S.F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*.v, 27, p. 3675-83, 2006.

GILLEY, J; COLEMAN, M.P. Endogenous Nmnat2 is an essential survival factor for maintenance of healthy axons. *PLoS One*, v. p. 8, 2010.

GLASS, J.D; BRUSHART, T.M; GEORGE, E.B; GRIFFIN, J.W. Prolonged survival of transected nerve fibres in C57BL/Ola mice is an intrinsic characteristic of the axon. *Journal of Neurocytology*, v. 22, p. 311–321, 1993.

GORDON, T. Mechanisms for functional recovery of the larynx after surgery repair of injured nerves. *J Voice*, v. 8, p. 70-78, 1994.

GRAVVANIS, A; LAVDAS, A; PAPALOIS, A. E; FRANCESCHINI, I; TSOUTSOS, D. A; DUBOIS-DACQ, M; MATSAS, R; IOANNOVICH, J.D. "Effect of genetically modified Schwann cells with increase motility in end-to-side nerve grafting". *Microsurgery*, v. 25,p. 423-432, 2005.

GREENSTEIN, B; GREENSTEIN, A. Color atlas of Neuroscience, Neuroanatomy and Neurophysiology. New York: Thieme Stuttgart, 2000. p. 78-102.

GRIFFIN, J.W; GEORGE, E.B; HSIESH, S.T; GLASS, J.D.(Ed). Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. In: Waxman, S.G; Kocsis, J.F; Sytys, P.K. The Axon: Structure, Function and Pathophysiology. ed. New York: Oxford Univ.1995. p, 3750–90.

GRIFFIN, J.W; GEORGE, R; LOBATO, C; TYOR, W.R; YAN, L.C; GLASS, J.D. Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *Journal of Neuroimmunology*, v. 40, p. 53-65, 1992.

GRINNEMO, K; MANSSON, A; DELLGREN, D; KLINGBERG, D; WARDELL, .; DRVOTA, V; TAMMIK, C; HOLGERSSON, J; RINGDÉN, O; SYLVÉN, C; LE BLANC, K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *The Journal Thoracic and*

Cardiovascular Surgery, v. 127, p. 1293-1300, 2004.

GRINNEMO, K.H; MANSSON-BROBERG, A; LE BLANC, K; VORBASCIO, M; WARDELL, E; SIDDIQUI, A.J; HAO, X; SYLVÉN, C; DELLGREN, G. Xenoreactivity and engraftment of 2human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *Annals of Medicine*, v. 38, p. 144-153, 2006.

GROTHER, C; HAASSTERT, K; JUNGNICHEL J. Physiological function and putative therapeutic impact of the FGF-2 system in peripheral nerve regeneration- lessons from in vivo studies in mice and rats. *Brain Research Reviews*. v, 51, p. 293-99, 2006.

GROTHER, C; NIKKHAH, G. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anatomy and Embryology*, v. 204, p. 171-177, 2001

GUERTIN, A.D; ZHANG, D.P; MAK, K.S; ALBERTA, J.A; KIM, H.A. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. *The Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 3478-87, 2005.

HARI, A; DJOHAR, B; SKUTELLA, T; MONTAZERI, S. Neurotrophins and extracellular matrix molecules modulate sensory axon outgrowth. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 22, p. 113-207, 2004.

HOKE, A; CHENG, C; ZOCHODNE, D.W. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family of growth factors in peripheral nerve injury in rats. *NeuroReport*, v. 11, p. 1651-54, 2000.

HOKE, A; GORDON, T; ZOCHODNE, D.W; SULAIMAN, O.A. A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Experimental Neurology*, v. 173, p. 77-85, 2002.

HOOD, B; LEVENE, H.B; LEVI, A.D. Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects. *Neurosurgery focus*, v. 26 (2), 2009.

HU, N; WU, H; XUE, C; CONG, Y; WU, J.'XIAO, Z; YANG, Y; DING, F; GU, X. Long-term outcome of the repair of 50 mm long median nerve defects in rhesus monkeys with marrow mesenchymal stem cells-containing, chitosan-based tissue engineered nerve grafts. *Biomaterial*, v. 34, p. 100-111, 2013.

HUGHES, P.M; WELLS, G.M; PERRY, V.H; BROWN, M.C; MILLER, K.M. Comparison of matrix metalloproteinase expression during Wallerian degeneration in the central and peripheral nervous systems. *Neuroscience*,

v.113, p. 273–87, 2002.

IKEDA, M; UEMURA, T; TAKAMATSU, K; OKADA, M; KAZUKI, K; TABATA, Y; IKADA, Y; NAKAMURA, H. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *Journal of Biomedical Material Research Part A*, v.102, p. 1370-1378, 2014.

IKEDA, N; NONOGUCHI, N; ZHAO, M.Z; WATANABE, T; KAJIMOTO, Y; FUTURAMAN, D; KIMURA, F; DEZAWA, M; COFFIN, R.S; OTSUKI, Y; KUROIWA, T; MIYATAKE, S. Bone marrow stromal cells that enhanced fibroblast growth factor-2 secretion by herpes simplex virus vector improve neurological outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, v. 36, p. 2725-2730, 2005.

JAISWAL, J.K; MATTOUSSI, H; MAURO, JM; SIMON SM. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature Biotechnology*. v. 21, p. 47-51, 2003.

JAVAZON, E.H; BEGGS, K.J; FLAKE, A.W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Experimental Hematology*, v. 32, p. 414-425, 2004.

JESSEN, K.R; MIRSKY, R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, p. 671–82, 2005.

JONES, E; MCGONAGLE, D. Human bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo*. *Rheumatology*, v.6, p.1-6, 2007.

KAMPFL, A; POSMANTUR, R; NIXON, R; GRYNSPAN, F; ZHAO, X; LIU, S.J; NEWCOMB, J.K; CLIFTON, G.L; HAYES. R.L. Mu-calpain activation and calpain mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, v. 67, p.1575–1583, 1996.

KAPPOS, E.A; ENGELS, P.A; TREMP, M; MEYER, SCHWABEDISSEN, M.Z; DI SUMMA, P; FISCHMANN, A; VON FELTEN, S; SCHERBERICH, A; SCHAEFER, D.J; KALBERMATTEN, D.F. Peripheral Nerve Repair: Multimodal Comparison of the Long-Term Regenerative Potential of Adipose Tissue-Derived Cells in a Biodegradable Conduit. *Stem Cells Development*, v. 24, p. 2127-41, 2015.

KAUPPILA, T.J; E., HUOPANIEMI, T; HUJANIN, E; LIESI, P. "A laminin graft replaces neurorrhaphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve." *Experimental Neurology*, v. 123, p. 181-191, 1993.

- KEILHOFF, G; FANSA, H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration—A real hope or just an empty promise?. *Experimental Neurology*, v. 232(2), p. 110–113, 2011.
- KEILHOFF, G; GOIHL, A; LANGNASE, K; FANSA, H; WOLF, G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *European Journal of Cell Biology*, v. 85(1), p. 11–24, 2006.
- KERSCHENSTEINER, M. M; SCHWAB, J.W; LICHTMAN, T; MISGELD, T. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nature Medicine*, v.11, p. 572–577, 2005.
- KETSCHKEK, A; JONES, S; SPILLANE, M; KOROBOVA, F. 'SVITKINA, T; GALLO, G. Nerve growth factor promotes reorganization of the axonal microtubule array at sites of axon collateral branching. *Developmental Neurobiology*, v. 75, p. 1441-1461, 2015.
- KIEVITS, F; BOERENKAMP, W.J; IVANYI, P. H-2-dependent binding of xenogeneic beta 2-microglobulin from culture media. *The Journal of Immunology*, v.140, p. 4253-4255, 1988.
- KINGHAM, P; KALBERMATTEN, D.F; MAHAY, D; ARMSTRONG, S.J; WIBERG, M; TERENCEHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Experimental Neurology*. v, 207, p.267-274, 2007.
- KOEPPEN, A.H. "Wallerian degeneration: history and clinical significance." *Journal of Neurological Sciences*, p. 220, v. 115-117, 2004.
- KRAMPERA, M; MARCONI, A; PASINI, A; GALIE, M; RIGOTTI, G; MOSNA, F; TINELLI, M; LOVATO, L; ANGHILERI, A; ANDREINI, A; PIZZOLO, G; SBARBATI, A; BONETTI, B. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*,v, 40, p. 382–490, 2007.
- KUROZUMI, K; NAKAMURA, K; TAMIYA, T; KAWANO, Y; KOBUNE, M; HIRAI, S. UCHIA, H; SASAKI, K; ITO, Y; KATO, K; HOMOU, O; DATE, I; HAMADA, H. BDNF gene- modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Molecular Therapy*, v. 9, p. 189-197, 2004.
- LARSON, D.R; ZIPFEL, W.R; WILLIAMS, R.M; CLARK, S; BRUCHEZ, M; WISE, F; WEBB, W. Water-Soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science*, v. 300, p. 1434-1436, 2004.
- LE BLANC, K; RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical ex- perience. *J Internal Medicine*, v. 262, p. 509 - 525, 2007.

LE BLANC, K; TAMMIK, C; ROSENDAHL, K; ZETTERBERG, E; RINGDEN, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, v. 31, p. 890-896, 2003.

LEE, D.H; CLAUSSEN, G.C; OH, S. Clinical nerve conduction and needle electromyography studies. *Journal of the American Academy Orthopaedic Surgery*, v. 12, p. 276-287, 2004.

LEUNG, V.Y.L; CHAN, D; CHEUNG, K.M.C. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *European Spine Journal*. v. 15, p. 406-413, 2006.

LEWIN, S.L; UTLEY, D.S; CHENG, E.T; VERITY, A.N; TERRIS, D.J. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope*. v. 107, p. 992-999, 1997.

LIECHTY, K.W; MACKENZIE, T.C; SHAABAN, A.F; RADU, A.F; MOSELEY, A.M; DEANS, R; MARSHAK, D.R; FLAKE, A.W. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature Medicine*, v. 6, p. 1282-1286, 2000.

LIU, H.M; YANG, L.H; YANG, Y.J. Schwann cell properties: 3. C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J. Neuropathol. Experimental Neurology*, v. 54, p. 487-96, 1995.

LOPES, S. Análise do comportamento biológico de heteroenxertos descelularizados e homoenxertos criopreservados: estudo em ovinos. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 24, p. 15-22, 2009.

LUNDBORG, G. "A 25-Year Perspective of Peripheral Nerve Surgery: Evolving Neuroscientific Concepts and Clinical Significance". *Journal of Hand Surgery*, v. 25A, p. 391- 414, 2000.

LUNDBORG, G; GELBERMAN, R.H; LONGO, F.M; POWELL, H.C; VARON S. "In vivo regeneration of cut nerves encased in silicone tubes: growth across a six-millimeter gap." *Journal of neuropathology and experimental neurology*, v. 41, p. 412-422, 1982.

LUNGBORG G. Bridging nerve defects: the role of tissue interpositioning. In: MASQUELET, A.C; FERREIRA, A.C. Severe traumatic defects of the upper limb. London: Martin Dunitz.p153-167, 2003.

MACKINNON, S.E. "Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration-Discussion."

Plastic and Reconstructive Surgery, v. 98, p. 1272-1274, 1996.

MADISON, R.D; ARCHIBALD, S; BRUSHART, T.M. "Reinnervation accuracy of the rat femoral nerve by motor and sensory neurons." *The Journal of Neuroscience*, v.16, p. 5698-5703, 1996.

MADISON, R.D; ARCHIBALD, S.J; KRARUP, C. Peripheral Nerve Injury. In COHEN, I.K.; DIEGELMAN, F.; LINDBALD, W.J.(ed.). *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects*. WB Saunders: Philadelphia, 1992, p. 450.

MAERS, S; SCHACHNER, M; BRUSHART, T.M. "Antobodies to myelin-associated glycoprotein accelerate preferential motor reinnervation." *Journal Peripheric Nervosous System*, v. 8, p. 91-9, 2003.

MAHMOOD, A; LU, D; CHOPP, M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*, v. 53, p. 697-702, 2003.

MAJUMDAR, M.K; THIEDE, M.A; MOSCA, J.D; MOORMAN, M; GERSON, S.L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of Celulal Physiology*, v, 176, p. 57-66, 1998.

MAKKAR R.R; PRICE, M; LILL, M, FRANTZEN, M; TAKIZAWA, K; KLEISLI, T; ZHENG, J; KAR, S; MCCLELAN, R; MIYAMOTA, T; BICK-FORRESTER, J; FISHBEIN, M.C; SHAH, P.K; FORRESTER, J.S; SHARIFI, B; CHEN, P.S; QAYYUM, M. Intramyocardial injection of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells without immunosuppression preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction. *Journal Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, v. 10, p. 225-233, 2005.

MASAKI, T; MATSUMURA, K; SAITO, F; SUNADA, Y; SHIMIZU, T. Expression of dystroglycan and laminin-2 in peripheral nerve under axonal degeneration and regeneration. *Acta Neuropathologica*, v. 99, p. 289-95, 2000.

MATSUMOTO, K; OHNISHI, K; KIYOTANI, T; SEKINE, T; UEDA, H; NAKAMURA, T; ENDO, K; SHIMIZU, Y. "Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves". *Brain Research*, v. 868, p. 315-328, 2000.

MATSUSE, D; KITADA, M; KOHAMA, M; NISHIKAWA, K; MAKINOSHIMA, H; WAKAO, S; FUJIYOSHI, Y; HEIKE, T; NAKAHATA, T; AKUTSU, H; UMEZAWA, A; HARIGAE, H; KIRA, J; DEZAWA, M. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *Journal of Neuropathology and*

Experimental Neurology, v. 69, p. 973-985, 2010.

MATSUYAMA, T; MACKAY, M; MIDHA, R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: A review. *Neurologia Medico-Chirurgica*, v. 40, p. 187–199, 2000,

MEDVEDEV, S; SHEVCHENKO, A.L; MAZUROK, N.A; ZAKIIAN, S.M. OCT4 and NANOG are the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. *Genetika*, v. 42, p. 1589-1608, 2008.

MILLES, H. Factors of affecting the outcome of peripheral nerve surgery, *Microsurgery*, v. 26, p. 295-302, 2006.

MILLES, H."Interfascicular nerve grafting." *The Orthopedic clinics of North America*, v. 2, p. 419-435, 1970.

MOLDOVAN, M; ALVAREZ,S; KRARUP, C. Motor axon excitability during Wallerian degeneration. *Brain*, v. 132, p. 511–523, 2009.

MONACO ,J.J. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunology Today*, v. 13p. 173–79, 1992.

MONTEIRO, B.S; ARGOLO NETO, N; DEL CARLO, R.J. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, v. 40, n. 1, 2010.

MORGAN, L; JESSEN, K.R; MIRSKY, R. Negative regulation of the P0 gene in Schwann cells: suppression of P0 mRNA and protein induction in cultured Schwann cells by FGF2 and TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3. *Development*, v.120, p.1399–409, 1994.

MOSNA F, L; SENSEBE, M; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a users guide. *Stem Cells Development*, v.19, p.1449-1470, 2010.

MULLER-BORER, B.J; CASCIO, W.E; ESCH, G.L; KIM, H.S; COLEMAN, W.B; GRISHAM, J.W; ANDERSON, P.A.W; MALOUF, N.N. Mechanisms controlling the acquisition of a cardiac phenotype by liver stem cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 104, p. 3877-3882, 2007.

MURAKAMI, T; FUJIMOTO, Y; YASUNAGA, Y; ISHIDA, O; TANAKA, N; IKUTA, Y; OCHI, M. Transplanted neuronal progenitor cells in a peripheral nerve gap promote nerve repair. *Brain Research*. v. 974, p. 17-24, 2003.

NAFF, N.J; ECKLUND, J. History of peripheral nerve surgery techniques. *Neurosurgery clinics of North America*, v. 12, p. 197-209, 2001.

NAVEILHAN, P; ELSHAMY, W.M; ERNFORS, P. Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR α after sciatic nerve lesion

in the mouse. *European Journal of Neuroscience*, v. 9, p. 1450–60, 1997.

NEUMANN, S; WOOLF, C.L. Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron*, v. 23(1), p. 83-91, 1999.

NGO, T.B; WAGGONER, P; ROMERO, A.A; NELSON, K.D; EBERHART, R.C.; SMITH, G.M. "Poly (L- Lactide) Microfilaments Enhance Peripheral Nerve Regeneration Across Extended Nerve Lesions." *Journal of Neuroscience Research*, v. 72, p. 227-238, 2003.

NGUYEN, Q.T; SANES, J.R; LICHTMAN, J.W. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nature Neuroscience*, v. 5, p. 861–67, 2002.

ODA, Y. TANO, K; KANEI, T; HARAGUCHI, T; ITAMOTO, K.; NAKAZAWA,.; TAURA, Y. Characterization of neuron-like cells derived from canine bone marrow stromal cells. *Veterinary Research Communications*, v. (37), p. 133-138, 2013.

OKUDA, K; KAWASE, T; MOMOSE, M; MURATA, M; SAITO, Y; SUZUKI, H; WOLFF, L.F; YOSHIE, H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *Journal Periodontology*. v. 74(6), p. 849-57, 2003.

OLIVEIRA, D.M.L. BRENO, A.B; MARTI, L.C; SIBOV, T,T; PAVON, L.F; MALHEIROS, D.M; CAMPOS, A.H. Labeling of human mesenchymal stem cells with *quantum dots* allows tracking of transplanted cells engrafted in infarcted pig hearts, Einstein. v. 7, p. 284-289, 2009.

OLIVEIRA, J.T; ALMEIDA, F.M; BIANCALANA, A; BAPTISTA, A.F; TOMAZ, M.A; MELO, P.A; MARTINEZ, A.M. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit enhance median-nerve regeneration, prevent decrease of creatine phosphokinase levels in muscle, and improve functional recovery in mice. *Neuroscience*, v. 170, p.1295–1303, 2010.

OSWALD, J.S; BOXBERGER, B; JORGENSEN, S; FELDMANN, G; EHNINGER, M; BORNHAUSER, M; WERNER, C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, v. 22,p. 377–384, 2004.

OUARDOUZ, M; NIKOLAEVA, M.A; CODERRE, E; ZAMPONI, G.W; MCRORY, J.E; TRAPP B.D; YIN, X; WANG, W; WOULFE, J; STYS, P.K. Depolarization-induced Ca²⁺ release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca²⁺ channel activation of ryanodine receptors. *Neuron*, v. 40, p. 53-63, 2003.

PAN, H.C; YANG, D.Y; CHIU, Y.T; LAI, S.Z; WANG, Y.C; CHANG, M.H; CHENG, F.C. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human

amniotic mesenchymal stem cell. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 13, p. 570-575, 2006.

PANNUCCI, C; MYCKATYN, T.M; MACKINNON, S.E; HAYASHI, A. End-to-side nerve repair: review of the literature. *Restorative Neurology and Neuroscience*, v. (25), p. 45-63, 2007.

PAUNESCU, V; DEAK, E; HERMAN, D; SISKA, I.R; TANASIE, G; BUNU, C; ANGHEL, S; TATU, C.A; OPREA, T.I; HENSCHLER, R. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 11, p. 502-508, 2007.

PAWLOWSKI, K.J; RITTGERS, S.E; SCHMIDT, S.P; BOWLIN, G.L. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Frontiers in Molecular and Biosciences*, v. 9, p. 1412-21, 2004.

PEKER, F; SOLAKOGLU, C; YUKSEL, F; KUTLAY, M. "Effects of time lapse on results of partial nerve injury repair. *Journal of Reconstructive Microsurgery*. p. 21, v. 145-149, 2005.

PEREIRA LOPES, F.R; CAMARGO DE MOURA CAMPOS, L; DIAS CORRÊA, J,Jr; BALDUINO, A; LORA, S; LANGONE, F; BOROJEVIC, R; BLANCO MARTINEZ, A.M. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Experimental Neurology*, v. 198, p. 457-468, 2006.

PHINNEY,D.G;PROCKOP,D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells*, v. 25, p. 2896–2902, 2007.

PISKINS, A; KAPLAN, S; AKTAS, A; AYYILDIZ, M; RAIMONDO, S; ALIÇ, T; BOZKURT, H.H; GEUNA, S. Platelet gel does not improve peripheral nerve regeneration: an electrophysiological, stereological and electron microscopic study. *Microsurgery*, 29(2), p. 144-153, 2008.

RASMUSSEN I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, v. 312, p. 2169 –2179, 2006.

ROBINSON, G.A; MADISON, R. "Motor neurons can preferentially reinnervate cutaneous pathways." *Experimental Neurology*, v. 190, p. 407-413, 2004. RODRÍGUEZ, J.F; VERDÚ, E; CEBALLOS, D; NAVARRO, X. "Nerve Guides Seeded with Autologous Schwann Cells Improve Nerve Regeneration." *Experimental Neurology*, v.161, p. 571-584, 2000.

RYAN J.M; BARRY, F.P; MURPHY, J.M; MAHON, B.P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation*, v. 2, p. 8, 2005.

SANTOS, P; WILLIAMS, S.L; THOMAS, S.S. Neuromuscular evaluation using rat gait analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 61, p. 79-84, 1995.

SATAR, B. HIDIR, Y; SERDAR, M.A; KUCUKTAG, Z; URAL, A.U; AVCU, F; SAFALI, M; OGUZTUZUN, S. Protein profiling of anastomosed facial nerve treated with mesenchymal stromal cells. *Crioteraphy*, v. 14, p. 522-528, 2012.

SCHLOSSHAUER, B, MÜLLER, E; SCHRÖDER, B; PLANCK, H; MÜLLER, H.W. Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration. *Brain Research*, v, 963, p. 321-326, 2003.

SCHWINDT, T.T. BARNABÉ, G.F; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, v. 16, p. 13-19, 2005.

SCREVEN, R; KENYON, E; MYERS, M,J; YANCY, H.F; SKASKO, M; BOXER, LYNNE, B; BIGLEY III, E.E; BORJESSON, D; ZHU, M. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow, *Veterinary Immunology and immunopathology*, v. 161, p. 21-23, 2014.

SHIM, W.S.S; JIANG, P; WONG, J; TAN, Y.L; CHUA, Y.S; TAN, Y.K; SIN, Y.K; LIM, T; CHUA; TEH, M; LIU, T.C; SIM, E. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Commun*, v. 324, p. 481-488, 2004.

SONG, X.Y.; ZHOU, F.; ZHONG, J.H.; WU, L.L.; ZHOU, X.F. "Knockout of p75(NTR) impairs re- myelination of injured sciatic nerve in mice." *Journal of Neurochemique*, v, 96, p. 833-842, 2006.

STRIOGA, M; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A; SLABY, O; MICHALEK, J. Same or not same? Comparation ef adipose tissue-derived versus bone marrow derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem cells Dev*, v. 14, p. 2725-52, 2012.

SUN, F; ZHOU, K; MI, W.J; QIU, J.H. Repair of facial nerve defects with decellularized artery allografts containing autologous adipose-derived stem cells in a rat model. *Neuroscience Letters*, v. 99, p. 104-8, 2011..

TAKEMURA, Y; IMAI, S; KOJIMA, H; KATAGI, M; YAMAKAWA, I; KASAHARA, T; URABE, H; TERASHIMA, T; YASUDA, H; CHAN, L; KIMURA, H; MATSUSUE, Y. Brain-Derived Neurotrophic factor from bone Marrow- Derived Cells Promotes Post-Injury Repiar of Peripehral Nerve. *Plos One*. v. 6, p.4-11, 2012.

TOMITA, K; MADURA, T; MANROVANI, C; TERENGI, G. Differentiated adipose-derived stem cells promote myelination and enhance functional recovery in a rat model of chronic denervation. *Journal of Neuroscience Research*, v. 90, p. 1392-402, 2012.

TOS, P; RONCHI, G; PAPALIA, I.Z; SALLEN, Y.V; LEGAGNEUX, J; GEUNA, Z.S. GIACOBINI-ROBECCHIZ M.G. Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part I experimental models international review of 47. *Neurobiology*, v. 87, p. 47-79, 2009.

TSAO, J.W; BROWN, M.C; CARDEN, M.J; MCLEAN, W.G; PERRY, V.H. Loss of the compound action potential: an electrophysiological, bio-chemical and morphological study of early events in axonal degeneration in the C57BL/Ola mouse. *European Journal of Neuroscience*, v. 6, p. 516-524, 1994.

TYNER, T.R; PARKS, N; FARIAB, S; SIMONSB, M; STAPPB, B; CURTIS, B; SIAN, K; YAMAGUCHI, K.T. "Effects of collagen nerve guide on neuroma formation and neuropathic pain in a rat model." *The American Journal of Surgery*, v. 193, p. 1-6, 2007.

UEMURA, T; TAKAMATSU, K; IKEDA, M; OKADA, M; KAZUKI, K; IKADA, Y; NAKAMURA, H. Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 419, p. 130-135, 2012.

VAREJÃO, A.S; CABRITA, A.M; MEEK, M.F; MEEK, M.F; BULAS-CRUZ, J; MELO-PINTO, P; RAIMONDO, S; GEUNA, S; GIACOBINI-ROBECCHI, M.G. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *Journal of Neurotrauma*, v. 21, p. 1652-1670, 2004.

VAREJÃO, A.S.P; CABRITA, A.M; GEUNA, S; PATRÍCIO, J.A; AZEVEDO, H; FERREIRA, A.J; MEEK, M.F. "Functional Assessment of Sciatic Nerve Recovery: Biodegradable Poy(DLLA-epsilon-CL) Nerve Guide Filled with Fresh Skeletal Muscle". *Microsurgery*, v. 23, p. 346-353, 2003.

WAITAYAWINYU, T; PARISI, D.M; MILLER, B; LURIA, S; MORTON, H.J; CHIN, S.H; TRUMBLE, T.E. A comparison of polyglycolic acid versus type 1 collagen bioabsorbable nerve conduits in a rat model: an alternative to autografting. *Journal of Hand Surgery*, p. 32(10), v.1521-9, 2007.

WALSH, S; MIDHA, R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurgery*, v. 26, p. 1-8, 2009.

WANG, G; GUANGYUAN, L; QIANG, A.O; YANDAO, G; XIUFANG, Z. Preparation of cross-linked carboxymethyl chitosan for repairing sciatic nerve

injury in rats. *Biotechnology Letters*, v. 32, p. 59-66, 2010.

WANG, J; DING, F; GU, Y; LIU, J; GU, X. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. *Brain Research*, v. 1262, p. 7-15, 2009.

WANG, J; CHEN-CHIA, Y; SHYH-CHANG, C; YUEH-LING, H. No synergistic effect of mesenchymal stem cells and exercise on functional recovery following sciatic nerve transection, *Functional Neurology*, v. 25, p. 33-43, 2010.

WANG, Y; ZHAO, Z; REM, Z; ZHAO, B; ZHANG, L; CHEN, J; XU, W; LU, S; ZHAO, Q; PENG, J. Recellularized nerve allografts with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Letters*, v. 514, p. 96-101, 2012.

WHITWORTH, I.H; DORÉ, C.J; GREEN, C.J; TERENGHI, G. "Increased Axonal Regeneration Over Long Nerve Gaps Using Autologous Nerve-Muscle Sandwich Grafts". *Microsurgery*, v.16, p. 772-778, 1995.

WILBOURN, A. J. Nerve conduction studies. Types, components, abnormalities, and value in localization. *Neurologic Clinics*, v. 20, p. 305-338, 2002.

WODEWOTZKY, T.I; LIMA-NETO, J.F; PEREIRA JUNIOR O.C.M; SUDANO, M.J; LIMA, S.A.F; BERSANO, P.R.O; YOSHIOKA, S.A; LANDIM-ALVARENGA, F.C. *In vitro* cultivation of canine multipotent mesenchymal stromal cells on collagen membranes treated with hyaluronic acid for cell therapy and tissue regeneration. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 45, p. 1157-1162, 2012.

WOODBURY, D; SCHWARZ, E.J; PROCKOP, D.J; BLACK, I.B. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, v.6, p. 364:370, 2000.

YOSHIHARA, H; SHUMSKY, J.S; NEUHUBER, B; OTSUKA, T; FISCHER, I; MURRAY, M. Combining motor training with transplantation of rat bone marrow stromal cells does not improve repair or recovery in rats with thoracic contusion injuries. *Brain Research*, v. 1119, p. 65-75, 2006.

YOSHIMURA, T; KAWANO, Y; ARIMURA, N; KAWABATA, S; KIKUCHI, A; KAIBUCHI, K. GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*, v.120, p. 137-49, 2005.

ZANG, L; GUO, Q; XU, W; LU, S. Repair of nerve defect with acellular nerve graft supplemented by bone marrow stromal cells in mice. *Microsurgery*, v. 31, p. 388-394, 2011.

ZHAO, Z; WANG, Y; PENG, J; REN, Z; ZHAN, S; LIU, Y; ZHAO, B; ZHAO, Q; ZANG, L; GUO, Q; XU, W; LU, S. Repair of nerve defect with acellular nerve graft supplemented by bone marrow stromal cells in mice. *Microsurgery*, v. 31, p. 388-394, 2011.

ZHOU, F.Q; ZHOU, J; DEDHAR, S; WU, Y.H; SNIDER, W.D. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron*, v. 42, p. 897–912, 2004.

ZUK, P.A; ZHU,M; MIZUNO, H; HUANG, J; FUTRELL, J.W; KATZ, A.J; BENHAIM, P; LORENZ, H.P; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, v. 7, p. 211-228, 2001.

ANEXOS

Normas da publicação da revista *International Journal of Stem Cells*

Ethical Guidelines

The studies on human and animals should indicate that procedures were in accordance with institutional guidelines (i.e. Institutional Review Board and Institutional Animal Care and Use Committee) and be mentioned in the text section of the manuscripts.

Format of Manuscripts

Manuscripts should be original not previously published nor submitted to other journals and must be written in English.

How to submit: on line submission only acceptable

Preparation for Submission

Manuscripts should be created in Microsoft Word format.

Times New Roman is highly recommended font.

Use at least 2.5 cm (or 1 inch) margins of all sides and at least 12-pitch type.

All sections of manuscripts must be double-spaced.

Number the pages consecutively in the middle portion of the bottom.

Title page, abstract, text, acknowledgements, potential conflict of interest, references, tables, figures and figure legends should typed on a separate page and follow in that order.

Do not embed figures in the text.

Title Page

Indicate the article type: Original article, Review Article, Technical Report, Brief Report, Letter to the Editor.

Name(s) of author(s)

Name(s) of institution(s) of each author

Correspondence information for Corresponding Author: Name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address

Key words or Phrases

1) Four to six key words or phrases, using terms from the most recent Medical Subject Headings of Index Medicus (<http://nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>).

2) If suitable MeSH terms are not available for recently introduced terms, present terms may be used.

Abstract

Abstract is required for Original Article, Review Article, Technical Report, and Brief Report.

Be concise: No more than 250 words.

Do not cite references in the abstract.

Defined acronym or abbreviation on first usage in parentheses.

Subheadings

1) Use following subheadings in Original Articles: Background and Objectives,

Methods (Subjects) and Results, and Conclusions.

2) Subheadings are not mandatory in Review Articles, Brief Reports, Technical Reports, and Letter to the Editor.

Text

Text should be no more than 6,000 words excluding title page, abstract, acknowledgements, potential conflict of interest, references, tables, figures, and legends.

Typical main headings can be used, such as Introduction, Materials (Subjects) and Methods, Results, and Discussion.

All references, tables, and figures should be numbered in the order in which they are cited in the text.

Acronyms, abbreviations, and symbols must be defined on first usage.

Introduction should include the background and the aims of study.

Materials (Subjects) and Methods should be described in detail and also include statistical methods.

Results should be described in proper order with tables and figures.

Discussion should include the interpretation and the conclusions of study.

Acknowledgments

Acknowledgments should specify all sources of funding, institutional or corporate, for the research discussed in the study. Acknowledgments include collaborators, technical help, secretarial assistance.

Potential Conflict of Interest

Potential Conflict of Interest must be disclosed. If there are no potential conflict of interest, please add the following statement: "The authors have no conflicting financial interest."

References

Accuracy of reference data is the author's responsibility. Verify all entries against original sources, especially journal titles, inclusive page numbers, publication dates, accents, diacritical marks, and spelling in languages other than English.

Cite reference selectively: No more than 40

All authors must be listed: Do not use 'et al.'

Cite references in numerical order according to the order of mention in text and number them as like (1, 2) or (1-3).

Abbreviations of journal names should conform to those in the Index Medicus and on MEDLINE.

Personal communications, unpublished observations, and submitted manuscripts must be cited in the text as "([name(s)], unpublished data, 200X)."

Abstracts may be cited only if they are the sole source and must be identified in the references as "Abstract."

"In press" citations must have been accepted for publication and the name of journal or book publisher included.

Adhere to the format provided by the following examples:

- Format for journal articles: Kim DI, Kim MJ, Joh JH, Shin SW, Do YS, Moon JY, Kim NR, Lim JE, Kim AK, Eo HS, Kim BS, Cho SW, Yang SH, Park CJ, Shim JS. Angiogenesis facilitated by autogenous whole bone marrow stem cell

transplantation for Buerger's disease. *Stem Cells* 2006;24:1109-1200

- Format for books: Fox JC. Clinical applications of gene therapy: Cardiovascular disease. In: Quesenberry PJ, Stein GS, Forget BG, Weissman SM, editor. *Stem Cell Biology and Gene Therapy*. New Jersey: Wiley-Liss; 1998. 471-502

Tables

Tables must be titled, numbered, and cited in the text.

Each table must be typed on a separate sheet and double-spaced.

Table number should be Arabic, followed by a period and a brief informative title.

Abbreviation within the table should be explained in a footnote.

Footnotes: Use superscript lowercase letters within a table (i.e.: a, b, c ---)

Do not use vertical lines in tables. Use only horizontal lines above and below the column headings and at the bottom of the table only.

Tables should be created in Microsoft Word table function. Do not place Excel table in a Word document.

Figures

Figures must be cited in numerical order in the text (using the Arabic numbers).

Both black and white figures or color illustrations are acceptable.

The combined total number of figures and tables should not exceed 8.

Figures must be uploaded as separate files (jpg, gif, pdf, microsoft powerpoint files).

Figure legends

Figure legends must be typed on a separate sheet and double-spaced.

Figure legends contain a brief title and explanation of the figures.

The magnification and stain methods used for photomicrographs should be stated.

Any abbreviations or symbols used in the figures must be defined in the figure legends.

Style

Use American-English spelling and minimize the use of nonstandard abbreviations.

For biochemical abbreviations, use those currently recommended by The Journal of Biological Chemistry in its instructions to authors.

Italicize genes and loci, and use approved names listed in the appropriate nomenclature database.

Avoid using multiple names for genes and proteins: Alternative names should be given on first mention only.

For the special materials and equipments, give the manufacturer's name. Capitalize trade names and indicate registered trademarks. Give the formal, chemical name of a compound as established by the international convention after the first use of trivial name. Thereafter, the trivial name may be used.

Abbreviate units of measure only when used with numbers. Specify estimates of variance (e.g., SD, SE) and give references for statistical methods.