

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CONDUTO DE ORIENTAÇÃO NERVOSA FUNCIONALIZADO
COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES
PROMOVE A REGENERAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO EM
RATOS

DIEGO NOÉ RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

Botucatu - SP
Outubro de 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CONDUTO DE ORIENTAÇÃO NERVOSA FUNCIONALIZADO
COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES
PROMOVE A REGENERAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO EM
RATOS

DIEGO NOÉ RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

Tese apresentada junto ao programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Martins
Amorim

Co-Orientador: Prof. Dr. Matheus
Bertanha

Botucatu - SP
Outubro de 2020

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

Sánchez, Diego Noé Rodríguez.

Conduto de orientação nervosa funcionalizado com células estromais mesenquimais multipotentes promove a regeneração do nervo isquiático em ratos / Diego Noé Rodríguez Sánchez. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Rogério Martins Amorim
Coorientador: Matheus Bertanha
Capes: 50501062

1. Engenharia tecidual. 2. Nervos periféricos - Ferimentos e lesões. 3. Regeneração nervosa. 4. Células mesenquimais estromais. 5. Terapia celular.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos; Impressão 3D; Lesão de nervo periférico; Regeneração nervosa; Terapia celular.

Nome do Autor: Diego Noé Rodríguez Sánchez

Título: CONDUTO DE ORIENTAÇÃO NERVOSA FUNCIONALIZADO COM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES PROMOVE A REGENERAÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO EM RATOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof. Dra. Juliany Gomes Quitzan

Membro

Departamento de Cirurgia veterinária e Reprodução Animal

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Profa. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Membro

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

Instituto de Biologia-UNICAMP.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

FZEA-USP-Pirassununga

Data da defesa: 19 de outubro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rogério Martins Amorim, pela orientação, apoio, incentivo, confiança e ensinamentos fornecidos, contribuindo na solidificação deste estudo.

Ao meu co-orientador, Prof. Matheus Bertanha, pela colaboração para o uso do laboratório de engenharia celular, possibilitando a realização do experimento.

Aos professores Dra. Elenice Deffune, Dr. Alexandre de Oliveira, Dr. Rui S. Ferreira, Dr. Jorge da Silva e Dra. Marjorie Golim, pela disponibilidade e colaboração para a realização deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro com bolsa de Doutorado (2016/14364-2).

À toda a equipe do laboratório de engenharia celular (LEC/FMB/Unesp), da unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX/FMB/Unesp) e do laboratório de Regeneração Nervosa (LRN/Unicamp) pelo apoio técnico, ensinamentos, parceria, colaboração e acolhimento para a realização deste estudo.

Aos colegas de trabalho e amigos, Mariana, Felipe, Leandro, Vick, Paulinha, Ana Lívia, Lenize, Luciana, Diego, José e Bardella pela ajuda concedida para a realização deste trabalho.

Aos amigos que estiveram ou não presentes neste caminho,

À minha família, aos meus pais Noé e Blanca e aos meus irmãos Daniel, Edison, Camilo, Sérgio pelo apoio incondicional, incentivo, força e principalmente pela vida para realizar a minha missão profissional.

À Giovana minha esposa, pelo incentivo e apoio incondicional, muito importantes no decorrer do meu crescimento profissional e pessoal.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Veterinária (FMVZ/Unesp), do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária e aos residentes da CMPA do hospital veterinário pelo apoio, colaboração e possibilidade de aplicação clínica dos conhecimentos adquiridos no estudo.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/Unesp/Botucatu), pela possibilidade de realizar a minha Pós-graduação, por ceder suas instalações e serviços para que esse trabalho pudesse ser realizado.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Iniciadores utilizados nas reações de qPCR nas MSC de cão.----- 23

Quadro 2. Condições de termociclagem das amplificações por qpcr.----- 24

Quadro 3. Iniciadores utilizados nas reações de qPCR do tecido medular. --- 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários selecionados para a realização da imunomarcação no nervo isquiático. -----	31
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação proposto das células estromais mesenquimais multipotentes (MSC) na regeneração nervosa.....	14
Figura 2. Delineamento do experimento 1.	19
Figura 3. Delineamento do experimento 2..	20
Figura 4. Lesão experimental e reparo do nervo isquiático nos grupos experimentais.....	26
Figura 5. Caracterização das AdMSC de rato.....	34
Figura 6. Caracterização geométrica dos NGC de PCL fabricados pela impressão em 3D.....	35
Figura 7. Caracterização dos NGCc de PCL fabricados por impressão 3D. ...	36
Figura 8. Avaliação locomotora pelo índice de funcionalidade do nervo isquiático durante 12 semanas nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr.....	37
Figura 9. Avaliação locomotora pelo índice de funcionalidade do tibial durante 12 semanas nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr.....	38
Figura 10. Recuperação funcional locomotora (Catwalk) na semana 8 e 12 após a lesão experimental nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr.	40
Figura 11. Latência e amplitude obtida no músculo tibial cranial na semana 8 e 12 nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr.	41
Figura 12. Latência e amplitude obtidas nos músculos interósseos na semana 8 e 12 isquiático nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr.	42
Figura 13. Análise da VCN na semana 8 e 12 nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr.....	42
Figura 14. Aparência microscópica dos nervos isquiáticos 12 semanas após o reparo.....	44
Figura 15. Células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo canino.....	45
Figura 16. Caracterização das AdMSC de cão.	46
Figura 17. Expressão relativa dos genes BDNF, GDNF, HGF e IL-10 após a estimulação direta com IFN- γ	47
Figura 18. Avaliação locomotora através do IFNC e IFT durante 12 semanas nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc.	49

Figura 19. Avaliação da marcha (Catwalk) na semana 8 e 12 após a lesão nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc.	50
Figura 20. Latência e amplitude obtidas nos músculos interósseos nas semanas 8 e 12 após a lesão nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc.	52
Figura 21. Distribuição de frequência da razão "g" e dot plot da razão "g"/diâmetro do axônio.	54
Figura 22. Aparência microscópica dos nervos isquiáticos 12 semanas após o reparo.....	55
Figura 23. Análise quantitativa da intensidade de fluorescência no nervo isquiático 30 dias após a lesão experimental e reparo.	56
Figura 24. Análise qualitativa da imunomarcagem do BDNF no nervo isquiático 30 dias após a lesão.	57
Figura 25. Análise qualitativa da imunomarcagem da neurotrofina GDNF no nervo isquiático 30 dias após a lesão..	58
Figura 26. Análise qualitativa da imunomarcagem do colágeno tipo IV no nervo isquiático 30 dias após a lesão.	59
Figura 27. Expressão relativa dos genes BDNF, GDNF, HGF e IL-10 na medula espinhal ipsilateral á lesão 30 dias após o reparo nos grupos Sham e GPCL+MSCc.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	tridimensional
AdMSC	células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
bFGF	fator de crescimento dos fibroblastos básico
c-met	receptor do fator de crescimento de hepatócitos
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
COX-2	cicloxigenase-2
CTNF	fator neurotrófico ciliar
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's modified Eagle medium/nutrient mixture F-12</i>
ENMG	eletroneuromiografia
FDM	<i>fused/filament deposition modeling</i>
FGF-2	fator de crescimento dos fibroblastos
GA	grupo autoenxerto
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDNF	fator neurotrófico derivado da glia
GFP	proteína fluorescente verde
GPCL	grupo tratado com NGC de policaprolactona
GPCL+MSCc	grupo tratado com NGC e células estromais mesenquimais multipotentes de cão
GPCL+MSCr	grupo tratado com NGC e células estromais mesenquimais multipotentes de rato
HEPES	tamponador de ácido sulfônico zwitteriônico
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HPRT	hipoxantina fosforibosiltransferase
IDO	indoleamina 2,3- dioxigenase
IFN- β	interferon beta
IFNC	índice de funcionalidade do nervo isquiático
IFT	índice de funcionalidade do nervo tibial
IGF-1	fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL-1 α	interleucina alfa
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL- 4	interleucina 4
IL-6	Interlecina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-27	interleucina 27
IL-31	interleucina 31
INF- γ	interferon-gama
LIF	fator inibidor de leucemia
M1	macrófagos pró-inflamatórios
M2	macrófagos anti-inflamatórios
MHC-I	complexo principal de histocompatibilidade classe I

MHC-II	complexo principal de histocompatibilidade classe II
mRNA	RNA mensageiro
MSC	células estromais mesenquimais multipotentes
NGC	<i>nerve guidance channels</i>
NGF	fator de crescimento do nervo
NT-3	neurotrofina-3
NT-4	neurotrofina-4
NT-5	neurotrofina-5
P75 ^{NTR}	receptores de baixa afinidade p75
PCL	policaprolactona
PGA	ácido poliglicólico
PGE2	prostaglandina E2
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB	soro fetal bovino
Sham	grupo Sham
SLPi	proteína inibidora de protease secretada por leucócitos
SNP	sistema nervoso periférico
TGF- α	fator de transformação do crescimento alfa
TGF- β	fator de transformação do crescimento beta
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	fator de necrose tumoral beta
Trks	receptores de alta afinidade tirosina quinase
VCN	velocidade de condução nervosa
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 <i>Lesões traumáticas do sistema nervoso periférico</i>	7
2.1.1 <i>Degeneração nervosa</i>	7
2.1.2 <i>Regeneração axonal</i>	8
2.2 <i>Engenharia de tecidos e medicina regenerativa no sistema nervoso periférico</i>	9
2.2.1 <i>Regeneração dentro de condutos de orientação nervosa ((nerve guidance channels (NGCs))</i>	9
2.2.2 <i>Terapias com fatores de crescimento</i>	11
2.2.3 <i>Terapias baseadas em células</i>	12
2.2.4 <i>Potencial mecanismo de ação das MSC na regeneração nervosa</i>	13
2.3 <i>Rol das citocinas neuropoiéticas no trauma de nervos</i>	14
2.4 <i>Sinais de ativação das MSC</i>	15
3 HIPÓTESE	17
4 OBJETIVOS	17
4.1 <i>Objetivo geral</i>	17
4.2 <i>Objetivos específicos</i>	17
5 MATERIAIS E MÉTODOS	18
5.1 <i>Animais experimentais</i>	18
5.1.2 <i>Experimento 1</i>	18
5.1.3 <i>Experimento 2</i>	19
5.2 <i>Isolamento e caracterização das AdMSC</i>	21
5.2.1 <i>Diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica das AdMSCs</i>	21
5.2.2 <i>Citometria de fluxo das AdMSC</i>	22
5.2.3 <i>Avaliação da expressão genica das AdMSC de cão após a estimulação com interferon-gama (INF-γ)</i>	22
5.3 <i>Modelamento, impressão em 3D e construção dos NGCs</i>	24
5.4 <i>Lesão traumática e reparo do nervo isquiático</i>	25
5.5 <i>Índice de funcionalidade do nervo ciático (IFNC) e tibial (IFT)</i>	27
5.6 <i>Avaliação da marcha – Catwalk</i>	28
5.7 <i>Avaliação eletrofisiológica</i>	28
5.8 <i>Preparação dos espécimes e análise morfométrica</i>	29
5.9 <i>Imunofluorescência do nervo isquiático (S-100, neurofilamento, BDNF, GDNF, P75^{NTR} e colágeno IV)</i>	30
5.10 <i>Expressão gênica dos fatores neurotróficos (BDNF, GDNF e HGF) e citocinas (IL-6 e IL-10) na medula espinhal</i>	31
5.11 <i>Análise estatística</i>	32
6 RESULTADOS	33
6.1 <i>Resultados do experimento 1</i>	33

6.1.1 As AdMSC de rato mostraram origem mesenquimal -----	33
6.1.2 Análise ultraestrutural dos NGCs fabricados por impressão 3D -----	34
6.1.3 Os NGC funcionalizados com AdMSC de rato apresentaram efeitos positivos na recuperação funcional -----	37
6.1.4 Os NGC funcionalizados com AdMSC de rato estimularam a recuperação da marcha-----	39
6.1.5 Os NGC funcionalizados com AdMSC de rato incrementaram na recuperação eletrofisiológica -----	40
6.1.6 Os NGC funcionalizados com AdMSC de rato mostraram tendência a presença de axônios de maior diâmetro -----	43
6.2 Resultados do experimento 2 -----	44
6.2.1 As AdMSC de cão apresentaram características mesenquimais -----	44
6.2.2 A capacidade neurotrófica e anti-inflamatória das AdMSC de cão foi incrementada após a estimulação com IFN- γ -----	46
6.2.3 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão aumentaram a recuperação funcional motora-----	47
6.2.4 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão apresentaram efeitos positivos na recuperação da marcha -----	49
6.2.5 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão apresentaram efeitos positivos na recuperação eletrofisiológica-----	51
6.2.6 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão mostraram tendência a presença de axônios de maior diâmetro -----	52
6.2.7 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão estimularam a expressão do P75 ^{NTR} e apresentaram preservação da reatividade das células de Schwann----	55
6.2.8 Os NGC funcionalizados com AdMSC estimularam a expressão de BDNF e GDNF e colágeno tipo IV no nervo isquiático -----	56
6.2.9 Os NGC funcionalizados com AdMSC evidenciaram <i>up-regulation</i> de BDNF, GDNF e HGF na medula espinhal lombossacral-----	60
7 DISCUSSÃO -----	61
7.1 Experimento 1-----	62
7.2 Experimento 2-----	65
8 CONCLUSÕES-----	70
8.1 Experimento 1-----	70
8.2 Experimento 2-----	71
9 BIBLIOGRAFIA -----	72
10 TRABALHO CIENTIFICO a ser enviado para a revista “Stem Cell Research and Therapy”. -----	83
Anexos -----	124

RODRIGUEZ-SANCHEZ, D.N. **Conduto de orientação nervosa funcionalizado com células estromais mesenquimais multipotentes promove a regeneração do nervo isquiático em ratos.** Botucatu, 2020. 124p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As lesões traumáticas do sistema nervoso periférico (SNP) são altamente debilitantes, levando a déficits sensório-motores a longo prazo. A regeneração nervosa depende de um microambiente permissivo para o crescimento axonal, associado a presença de moléculas solúveis bioativas. Neste sentido, o uso das células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo (AdMSC) em combinação com condutos de orientação nervosa (NGC) poderiam acarretar estratégias promissoras para a regeneração nervosa. Ratos Wistar foram submetidos a lesão crítica do nervo isquiático (12 mm de *gap*) e divididos em grupos experimentais: Sham (abordagem do nervo isquiático sem alterações), GA (técnica de autoenxerto), GPCL (tubulação com NGC vazio), GPCL+MSCc (tubulação com NGC + 10^6 AdMSC de cão embebidas em biopolímero de fibrina) e GPCL+MSCr (tubulação com NGC + 10^6 AdMSC de rato embebidas em biopolímero de fibrina). Os NGC de policaprolactona (PCL) foram fabricados por impressão 3D. As AdMSC de cão foram caracterizadas *in vitro* e foi avaliado o potencial neuroregenerativo após a estimulação com INF- γ (BDNF, GDNF, HGF e IL-10). Foram avaliados o índice de funcionalidade do nervo isquiático e tibial durante 12 semanas *in vivo*. A análise da marcha e a eletroneuromiografia foram avaliadas nas semanas 8 e 12. Foi realizada a morfometria *post-mortem* nas semanas 8 e 12 após o reparo nervoso. Trinta dias após a lesão nos grupos GPCL+MSCc e Sham, foram analisadas a expressão de fatores neurotróficos (BDNF, GDNF e o receptor p75^{NTR}) e a reatividade das células de Schwann (S-100 e neurofilamento) pela imunofluorescência, e a expressão gênica na medula espinhal (BDNF, GDNF, HGF, IL-6 e IL-10). A estimulação com INF- γ aumentou a expressão gênica de BDNF, GDNF, HGF e IL-10 nas AdMSC de cão. Os grupos GPCL+MSCc e GPCL+MSCr apresentaram recuperação motora e eletrofisiológica quando comparados ao grupo GPCL em

8 e 12 semanas. Porém, os valores não foram superiores ao autoenxerto. Os achados foram relacionados a presença de fibras mielinizadas, maior expressão de BDNF, GDNF e P75^{NTR} no nervo isquiático e a *up-regulation* de *BDNF*, *GDNF* e *HGF* na medula espinhal. Foi observada tendência a maior reatividade das células de Schwann e ramificação axonal no nervo isquiático. A combinação de NGC impressos em 3D e funcionalizados com AdMSC de cão e de rato mostraram efeitos neuroprotetores. A associação de AdMSC e biopolímero de fibrina suportaram o microambiente trófico e estimularam o estado pró-regenerativo na lesão crítica do nervo isquiático em ratos.

Palavras-chave: bainha de mielina, engenharia de tecidos, impressão 3D, lesão de nervo periférico, neurotinese, regeneração nervosa, policaprolactona, terapia celular,

RODRIGUEZ-SANCHEZ, D.N. **Nerve guidance channels functionalized with multipotent mesenchymal stromal cells promotes sciatic nerve regeneration in rats.** Botucatu, 2020. 124p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Peripheral nervous injuries (PNS) are highly debilitating, leading to long-term motor and sensory deficits. Nerve regeneration depends of the permissive microenvironment for axonal growth associated to bioactive molecules. In this sense, the use of multipotent mesenchymal stromal cells adipose tissue derived (AdMSC) in combination with nerve guidance conduits (NGC) could be promising strategies for nerve regeneration. Wistar rats were submitted to critical sciatic nerve injury (12 mm gap) and divided into experimental groups: Sham, GA (autograft), GPCL (empty NGC), GPCL + MSCc (NGC + 10^6 plus canine AdMSC embedded in fibrin biopolymer), GPCL + MSCr (NGC + 10^6 plus rat AdMSC embedded in fibrin biopolymer). Polycaprolactone (PCL) NGC was manufactured by 3D printing. *In vitro*, regenerative potential was evaluated after INF- γ stimulation (BDNF, GDNF, HGF and IL-10). *In vivo*, were measure the sciatic ant tibial functional index for 12 weeks. Gait analysis and electroneuromyography were performed at 8 and 12 weeks. *Post-mortem*, morphometric analysis was made at 8 and 12 weeks after nerve repair. Thirty days after lesion in the GPLC+MSCc and Sham, were evaluated the expression of neurotrophins (BDNF, GDNF and p75^{NTR} receptor), Schwann cells reactivity by immunofluorescence (S-100 and neurofilament) and gene expression in the spinal cord (BDNF, GDNF, HGF, IL-6 and IL-10). The stimulation with INF- γ increased gene expression on canine AdMSC *in vitro* for BDNF, GDNF, HGF and IL-10. The groups GPCL+MSCc and GPCL+MSCr showed functional motor and electrophysiological motor recovery when compared with the GPCL group at 8 and 12 weeks. However, the values were not superior to GA group. These findings were related to presence of myelinated fibers, increased of neurotrophins expression BDNF, GDNF and p75^{NTR} on sciatic nerve and *up-regulation* of the BDNF, GDNF and HGF in the spinal cord. A trend towards greater reactivity of Schwann cells and axonal branching in the sciatic nerve were observed. The

combination of NGC 3D-printing and functionalized with canine and rat AdMSC showed neuroprotective effects. The association of canine or rat AdMSC and fibrin biopolymer support trophic microenvironment and stimulate a pro-regenerative state in severe sciatic nerve injury in rats.

Keywords: myelin sheath, tissue engineering, 3D printing, nerve injury, neurotmesis, nerve regeneration, cell-therapy, polycaprolactone

1 INTRODUÇÃO

As lesões traumáticas do sistema nervoso periférico (SNP) são relativamente frequentes em humanos e animais, sendo altamente debilitantes devido às perdas sensório/motoras persistentes que afetam a qualidade de vida do paciente (FORTERRE et al., 2007; KOUYOUMDJIAN, 2006; VAN SOENS et al., 2009).

Embora o SNP apresente uma capacidade de regeneração endógena associada a complexa interação entre a degeneração *Walleriana*, a resposta imunológica e as moléculas pró-regenerativas, as lesões com defeitos longos (*long-gaps*) perdem o suporte trófico entre o segmento proximal lesionado e o músculo, resultando em falha da regeneração nervosa (CAMPBELL, 2008; FORTERRE et al., 2007). O autoenxerto é a técnica padrão para reparo de lesões de *long-gaps*, entretanto, apresenta limitações associadas a recuperação funcional incompleta, lesão do nervo doador e insuficiente revascularização (RAY; MACKINNON, 2010).

Conduitos de orientação nervosa (*nerve guidance channels* (NGC)) têm sido utilizados em defeitos com *long-gaps*, visando conduzir os axônios regenerantes e aumentar a concentração de fatores tróficos (DODLA et al., 2019; NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012). Diversos NGCs usando diferentes técnicas de fabricação convencionais foram desenvolvidos baseando-se em biomateriais (ANGIUS et al., 2012; NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012; TYNER et al., 2007), contudo os resultados funcionais não mostraram superioridade a técnica de autoenxerto (KONOFOS; VER HALEN, 2013; MOORE et al., 2009; RAY; MACKINNON, 2010; SALTZMAN et al., 2019; WAITAYAWINYU et al., 2007; WU et al., 2016).

A engenharia de tecidos apresenta três pilares: 1) *scaffolds*; 2) células e 3) fatores de crescimento. A interação e combinação dos três componentes poderia contribuir na restauração do tecido nervoso danificado (LANGER; VACANTI, 1999). Recentemente, as técnicas de biofabricação como a impressão tridimensional (3D) permitem a construção de *scaffolds* com o objetivo de regenerar tecidos com arquiteturas complexas (PEDDE et al., 2017). A construção de NGC por impressão 3D apresenta vantagens, como estabilidade mecânica, alta porosidade, geometria biomimética, reprodutibilidade e

adaptabilidade a diversos polímeros (PEDDE et al., 2017; ZHU et al., 2018). A policaprolactona (PCL) pertence ao grupo dos poliésteres sintéticos termosensíveis e se destaca pela biocompatibilidade, permeabilidade e degradação (NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012).

Na engenharia de tecidos, as células estromais mesenquimais multipotentes (*multipotent mesenchymal stromal cells*, MSC) derivadas do tecido adiposo (*adipose-tissue derived multipotent mesenchymal stromal cells*, AdMSC) dispõem de relevante potencial translacional (CASEIRO et al., 2016; KISIEL et al., 2012; MARTINELLO et al., 2011; VIEIRA et al., 2010). Estudos prévios evidenciaram o potencial terapêutico das AdMSC associado a produção de fatores neurotróficos, anti-inflamatórios, imunomoduladores e pró-angiogênicos (CASEIRO et al., 2016; LOPATINA et al., 2011; TOMITA et al., 2012; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

A atividade parácrina das AdMSC depende da persistência, viabilidade, capacidade de migração e integração no microambiente inflamatório local (KISIEL et al., 2012; NORONHA et al., 2019). Neste sentido, matrizes biológicas como biopolímero de fibrina poderiam contribuir como veículo terapêutico para sustentar as MSC aplicadas no local da lesão e por sua vez os fatores secretados (BARROS et al., 2009; BISCOLA et al., 2016). Diversos estudos revelaram o potencial terapêutico do biopolímero de fibrina em lesões traumáticas de medula espinhal e raízes nervosas (ARAÚJO et al., 2017; BARBIZAN et al., 2013; BISCOLA et al., 2017; DE CASTRO et al., 2016). Nós hipotetizamos se NGC de PCL fabricados por impressão 3D e funcionalizados com AdMSC promovem a regeneração após a lesão experimental crítica do nervo isquiático em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões traumáticas do sistema nervoso periférico

As lesões traumáticas do SNP são relativamente frequentes acometendo o plexo braquial e o nervo isquiático em cães, associado a tração ou abdução excessiva do membro torácico ou pélvico (VAN SOENS et al., 2009). Em humanos, estudos epidemiológicos mostram incidência de trauma do SNP de 13.9 por 100000 habitantes por ano e de 2-5% dos pacientes encaminhados a centros de trauma nível I podem apresentar lesões do SNP (ASPLUND et al., 2009; TAYLOR et al., 2008).

2.1.1 Degeneração nervosa

Após o trauma do SNP, se desencadeia o processo de degeneração *Walleriana*, caracterizado pela degeneração distal do nervo lesionado e a subsequente eliminação dos detritos celulares inibitórios criando uma microambiente favorável para a ploriferação e alinhamento longitudinal das células de Shwann (bandas de Bügner) que guiam os axônios regenerados (SCHEIB; HÖKE, 2013). Após 12-24h, os microtúbulos axonais se desorganizam e começa a dissolução do esqueleto, associado a ausência do fornecimento de energia (ROTSHENKER, 2011). O influxo de íons de cálcio ativa vias apoptóticas que degradam os neurofilamentos axonais, liberando detritos granulares (ROTSHENKER, 2011). Posteriormente, se inicia a fase de eliminação dos detritos pelos macrófagos atraídos ao local da lesão e pelas células de Schwann (KOEPPEN, 2004; ROTSHEKNER, 2011).

No segmento proximal do nervo lesionado, os axônios são privados de fatores neurotróficos e em consequência os neurônios motores sofrem apoptose ou cromatólise reversível (SCHEIB; HÖKE, 2013). Em condições ideais, os cones de crescimento podem se estender a uma taxa de 1 a 3 mm por dia (GRIFFIN et al., 2013). Entretanto, quando as células de Schwann perdem o contato com os seus axônios cronicamente, os mecanismos de suporte da

lâmina basal e bandas de Bügner não são mantidos após a lesão, criando um ambiente que não suporta a regeneração (SCHEIB; HÖKE, 2013).

2.1.2 Regeneração axonal

Paralelo ao processo de degeneração se inicia o processo de regeneração axonal. A integridade do corpo neuronal e das células de Schwann são um pré-requisito para a regeneração (SCHEIB; HÖKE, 2013). O processo regenerativo depende da complexa interação de fatores neurotróficos, proteínas da matriz extracelular e da resposta inflamatória (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; BOYD; GORDON, 2003a; SCHEIB; HÖKE, 2013). As células de Schwann sintetizam fatores neurotróficos, como fator de crescimento do nervo (NGF), fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), neurotrofinas -3, -4 e -5 (NT-3/4/5), fator de crescimento dos fibroblastos 2 (FGF-2), neuroregulinas, fator neurotrófico ciliar (CTNF), que interagem seletivamente em receptores tirosina quinases (trks) (trkA para o NGF, trkB para o BDNF e as NT-4/5, trkC para o NT-3) e receptores de neurotrofinas p75 (P75^{NTR}) (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; BOYD; GORDON, 2003a; SCHEIB; HÖKE, 2013). Os fatores neurotróficos influenciam a orientação e o crescimento dos axônios motores e sensitivos que entraram em estado de regeneração mediado pela expressão de genes no corpo celular (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; BOYD; GORDON, 2003a; SCHEIB; HÖKE, 2013).

O processo inflamatório e o recrutamento de macrófagos após a lesão são cruciais para a eliminação de moléculas inibitórias da mielinização (DUBOVÝ; KLUSÁKOVÁ; HRADLOVÁ SVÍŽENSKÁ, 2014). Os macrófagos participam na síntese de moléculas da matriz extracelular como o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), o fator de transformação do crescimento alfa (TGF- α), o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) e moléculas associadas a neovascularização como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; BOYD; GORDON, 2003a; SCHEIB; HÖKE, 2013). Adicionalmente, proteínas da matriz extracelular produzidas pelas células de Schwann promovem a extensão dos axônios regenerantes (CHEN; YU; STRICKLAND, 2007). Desta forma, as células de Schwann promovem a regeneração através da proliferação, secreção

de fatores tróficos, citocinas e fagocitose dos restos de mielina (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; BOYD; GORDON, 2003a; SCHEIB; HÖKE, 2013).

Embora o SNP apresente capacidade intrínseca de regeneração diversos fatores limitam a regeneração após o trauma com *long-gaps*: 1) os neurônios motores axotomizados perdem progressivamente a capacidade regenerativa e de expressão de genes pró-regenerativos; 2) a denervação prolongada no segmento distal do nervo lesionado reduz progressivamente a capacidade de resposta regenerativa das células de Schwann residentes; 3) os axônios em regeneração podem ser direcionados de forma inapropriada e 4) a perda de conexão nervo-músculo leva a perda de fibras musculares, redução da densidade capilar muscular e fibrose muscular (SULAIMAN; GORDON, 2009).

2.2 Engenharia de tecidos e medicina regenerativa no sistema nervoso periférico

2.2.1 Regeneração dentro de condutos de orientação nervosa ((*nerve guidance channels (NGCs)*))

As estratégias da engenharia de tecidos propõem a interação de *scaffolds*, células e fatores de crescimento (LANGER; VACANTI, 1999). A interação e a combinação dos três componentes por meio do uso de AdMSC em associação a NGC poderiam ser empregados para restaurar o tecido nervoso danificado.

Existem diversas estruturas tubulares simples fabricadas com biomateriais naturais ou sintéticos, como colágeno, ácido poliglicólico (PGA), PCL, veias, artérias, entre outros (ANGIUS et al., 2012; DE RUITER et al., 2014; OLIVEIRA; VIDAL; LANGONE, 2005; REID et al., 2011; WANG; CAI, 2010), que exibem resultados positivos na recuperação funcional em com defeitos curtos entre 5-10mm de *gap* (DI SUMMA et al., 2011; KONOFAOS; VER HALEN, 2013). Apesar dos resultados positivos, estudos mostram os NGC simplificados mostram reinervação incompleta quando comparado a técnica de autoenxerto (KONOFAOS; VER HALEN, 2013; MOORE et al., 2009; RAY; MACKINNON, 2010; SALTZMAN et al., 2019; WAITAYAWINYU et al., 2007; WU et al., 2016). A migração incompleta das células de Schwann e a ausência de moléculas pró-

regenerativas é relatada como um fator limitante da regeneração com o uso de NGC simplificados (LUNDBORG, 2000).

Em geral, os NGC para o reparo nervoso devem apresentar características-chaves como: (1) força mecânica e degradação; (2) modulação em 3D do ambiente celular; (3) porosidade; (4) suporte da adesão celular, alongamento axonal e revascularização (DODLA et al., 2019; NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012). Se conhecem diversas técnicas de fabricação de NGC para modular o microambiente em 3D, incluindo a separação de fases, a liofilização, a lixiviação de porogênio e o *eletrospinning* (ZHANG et al., 2010). Porém, há limitações em relação ao controle limitado da geometria, tamanho e porosidade (O'BRIEN et al., 2015). Recentemente, a modalidade de impressão tridimensional (3D) surgiu como uma ferramenta para construir *scaffolds* ordenados e biomiméticos, podendo ser usados para depositar células embebidas em matrizes para a regeneração do tecido (PEDDE et al., 2017). Tecnologias de manufatura aditiva como a deposição por fusão (*fused/filament deposition modeling (FDM)*), permitem a deposição de material termoplástico em camadas finas com vantagens como baixo custo, resistência, fácil manipulação e compatibilidade com diversos polímeros (JOHNSON et al., 2015; O'BRIEN et al., 2015; PEDDE et al., 2017).

A policaprolactona (PCL) pertence ao grupo dos poliésteres sintéticos termosensíveis e se destaca pela sua biocompatibilidade, permeabilidade, degradação e adaptabilidade à técnica de FDM (NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012). Embora, o PCL mostrou ser um substrato adequado para a sobrevivência das células de Schwann *in vitro* (STRATTON et al., 2016; YU et al., 2011), apresenta hidrofobicidade limitando a adesão celular na superfície do polímero em ausência de funcionalização (STRATTON et al., 2016). Diversas abordagens para melhorar a bioatividade, incluindo co-polimerização, funcionalização da superfície e misturas de polímeros tem sido usadas para incrementar a adesão celular (STRATTON et al., 2016).

2.2.2 Terapias com fatores de crescimento

Os fatores neurotróficos NGF, BDNF, NT-3/4 e os fatores neurotróficos derivados da glia (GDNF), incluindo o CTNF, ativam a transcrição e tradução de proteínas que suportam a regeneração axonal e sobrevivência neuronal (BOYD; GORDON, 2003a; HAUSOTT; KLIMASCHEWSKI, 2016). A possibilidade de melhorar a regeneração nervosa pela aplicação exógena de fatores neurotróficos foi abordada em estudos, que mostraram efeitos neuroprotetores associados a aumento da regeneração axonal motora e sensorial, sobrevivência neuronal e efeitos anti-inflamatórios (FADIA et al., 2020; TAJDARAN et al., 2019).

A aplicação contínua de BDNF e GDNF aumentou o número de neurônios em regeneração no modelo de lesão crônica (KLIMASCHEWSKI; HAUSOTT; ANGELOV, 2013). O GDNF estimulou a regeneração de neurônios sensoriais com redução da dor na denervação crônica (FROSTICK; YIN; KEMP, 1998; MINNONE; DE BENEDETTI; BRACCI-LAUDIERO, 2017). O fator de crescimento de hepatócito (HGF) e o seu receptor *c-met*, expressados pelas células de Schwann, apresentaram efeitos anti-inflamatórios, angiogênicos e promovem a regeneração axonal (KO et al., 2018; NAKAMURA; MIZUNO, 2010). Um estudo usando plasmídeo portador de HGF mostrou recuperação funcional e morfológica após a lesão nervosa comparável ao autoenxerto (BOLDYREVA et al., 2018; NAKAMURA; MIZUNO, 2010). No entanto, fatores solúveis exibem limitações, devido à meia-vida biológica curta e alto custo, pois um único fator aplicado é incapaz de promover neuroproteção eficiente (KLIMASCHEWSKI; HAUSOTT; ANGELOV, 2013). Devido à dificuldade de atingir a dosagem, as estratégias recentes usando fatores neurotróficos para a regeneração nervosa são orientadas para o uso de terapias celulares, terapias baseadas em genes e estimulação endógena (HSU et al., 2017; SCHEIB; HÖKE, 2013).

2.2.3 Terapias baseadas em células

O transplante celular é umas das abordagens que atrai interesse na regeneração neural (YOUSEFI et al., 2019). Fontes como as células de Schwann foram usadas em combinação com NGC (JESURAJ et al., 2011), entretanto, há limitações na obtenção e cultura destas células (HOOD; LEVENE; LEVI, 2009; KALBERMATTEN et al., 2008). As AdMSC de cão dispõem de potencial translacional devido as características progenitoras, habilidade proliferativa e fácil acessibilidade (CASEIRO et al., 2016; KISIEL et al., 2012; MARTINELLO et al., 2011; VIEIRA et al., 2010). Diversos estudos evidenciaram a capacidade secretora de fatores, capazes de promover a mielinização, regeneração das fibras nervosas, neuroproteção, angiogênese e modulação do ambiente inflamatório (LOPATINA et al., 2011; TOMITA et al., 2012; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

As MSC murinas e humanas indiferenciadas têm sido descritas como imunotolerantes em modelos de transplante *in vivo* e *in vitro*, fator relacionado a sua hipoimunogenicidade, e à imunomodulação do ambiente local, que podem permitir abordagens experimentais com células alogênicas e xenogênicas (NAUTA; FIBBE, 2007).

O efeito parácrino e regenerativo das MSC depende da capacidade de integração no local da lesão, migração, persistência, *homing* e viabilidade das células (ELEUTERI; FIERABRACCI, 2019; KISIEL et al., 2012; NORONHA et al., 2019). Portanto, veículos terapêuticos como matrizes de fibrina poderiam evitar a dispersão das células, contribuindo na manutenção e adesão celular dentro da estrutura interna de NGCs porosos (BARROS et al., 2009; BISCOLA et al., 2016). A maioria das matrizes de fibrina de uso comercial contém trombina e fibrinogênio e são derivadas a partir do sangue humano, podendo apresentar limitações como a possível transmissão de doenças infecciosas virais (BARROS et al., 2009; BISCOLA et al., 2016). Para superar essas limitações, fontes de origem animal como biopolímero de fibrina derivado do veneno de serpente e sangue bubalino, mostraram potencial terapêutico em lesões do sistema nervoso (ARAÚJO et al., 2017; BARBIZAN et al., 2013; BISCOLA et al., 2017; DE CASTRO et al., 2016). O biopolímero de fibrina é obtido a partir de proteases derivadas do veneno de cascavél (*Crotalus durissus terrificus*) com atividade

similar a trombina. Além disso, para evitar o uso de sangue humano, a fonte fibrinogênio é obtida a partir do crioprecipitado de soro do sangue bubalino (BARROS et al., 2009). Previamente, o biopolímero de fibrina mostrou ser um *scaffold* adequado para as MSC derivadas da medula óssea de ratos, permitindo a sobrevivência, funcionalidade e adesão celular (GASPAROTTO et al., 2014). Além disso, o biopolímero de fibrina mostrou versatilidade na adesão tissular após o reparo término-terminal em nervos de ratos, com biocompatibilidade e ausência de efeitos adversos no microambiente regenerativo (BISCOLA et al., 2016). Similarmente, estudos mostraram a capacidade de adesão e de suporte da regeneração nervosa do biopolímero de fibrina após o trauma medular e de raízes nervosas ventrais e dorsais (ARAÚJO et al., 2017; BARBIZAN et al., 2013; BISCOLA et al., 2017; DE CASTRO et al., 2016).

2.2.4 Potencial mecanismo de ação das MSC na regeneração nervosa

A utilização de AdMSC nas lesões traumáticas de nervos objetiva usar uma linhagem específica de células indiferenciada produtora de fatores neurotrófico e anti-inflamatórios (BISCOLA et al., 2016; CARTAROZZI et al., 2015; CASEIRO et al., 2016; YAO et al., 2016; YOUSEFI et al., 2019). Os principais mecanismos de ação baseiam-se em sua capacidade de integração no microambiente e produção parácrina de complexas moléculas pró-regenerativas com propriedades neuro/axonioprotetiva, imunomoduladoras, angiogênicas e pró-regenerativas (LOPATINA et al., 2011; TOMITA et al., 2012; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008) (Figura 1). A neuroproteção mediada por MSC está associada, principalmente, a produção dos fatores neurotróficos BDNF, GDNF, NGF, IGF, FGF-2 e HGF (BROHLIN et al., 2012; CASEIRO et al., 2016; GU et al., 2010; KINGHAM et al., 2014; LOPATINA et al., 2011; TAKEMURA et al., 2012; TOMITA et al., 2012). A angiogênese é associada a fatores angiopoieticos, como angiopoietina-1, bFGF e VEGF (CASEIRO et al., 2016; KINGHAM et al., 2014; KINNAIRD et al., 2004). Os mecanismos imunorreguladores estão relacionados à interleucina-10 (IL-10), prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), óxido nítrico, heme oxigenase-

1, HGF e o fator transformação do crescimento beta (TGF- β), (ELEUTERI; FIERABRACCI, 2019; NAKAMURA; MIZUNO, 2010; RIBEIRO et al., 2015b; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

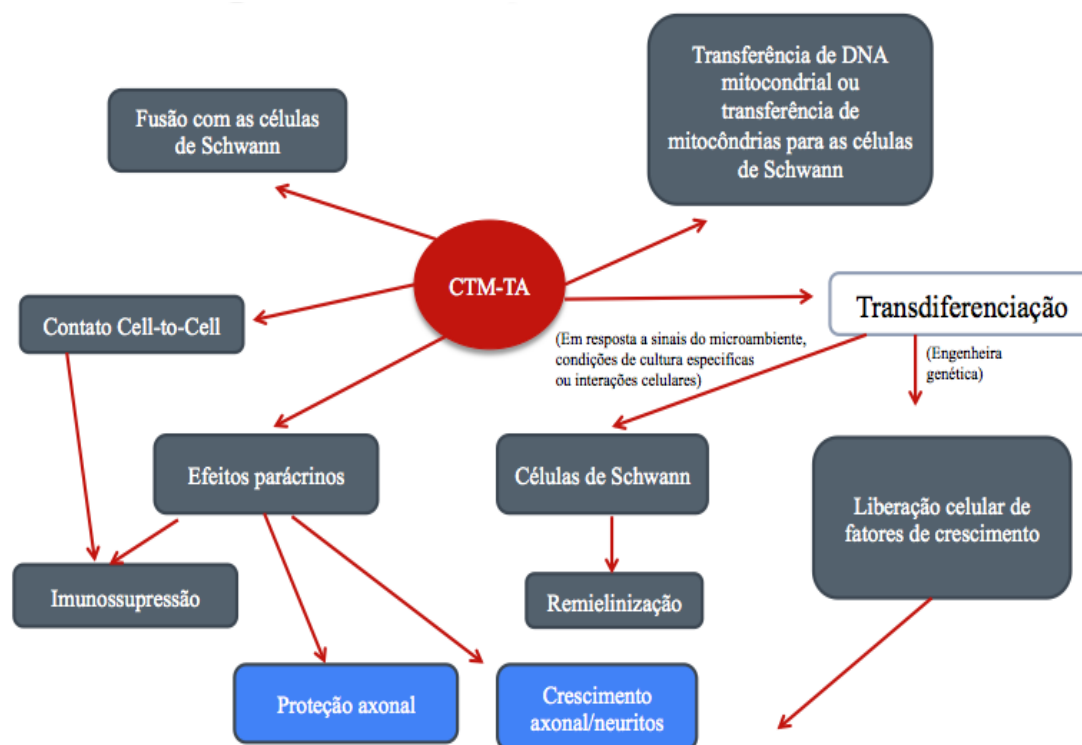


FIGURA 1. Mecanismo de ação proposto das células estromais mesenquimais multipotentes (MSC) na regeneração nervosa. As MSC estimulam crescimento e proteção axonal por meio da secreção de diversos fatores tróficos. Adaptado de (OLIVEIRA et al., 2013).

2.3 Rol das citocinas neuropoiéticas no trauma de nervos

Após a lesão do SNP, são produzidas diversas citocinas que podem apresentar efeitos positivos ou negativos na regeneração axonal (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010). A fase primária da expressão das citocinas acontece na fase inicial da degeneração *Walleriana*, e o segundo pico acontece na fase final da resposta inflamatória (TASKINEN et al., 2000). Após a lesão, as interações entre citocinas e fatores neurotróficos durante a inflamação podem

modular positivamente a regeneração axonal a sobrevivência neuronal (GÖLZ et al., 2006).

Dentre as citocinas neuropoiéticas, se encontram o fator neurotrófico ciliar (CNTF), o fator inibidor de leucemia (LIF), a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 27 (IL-27) e a interleucina 31 (IL-31) (BAUER; KERR; PATTERSON, 2007). O CNTF, LIF e IL-6 são citocinas implicadas em condições do SNP e neurônios (DUBOVÝ; JANČÁLEK; KUBEK, 2013; MURPHY et al., 2000). O fator inibidor de leucemia e a IL-6 estão envolvidos em sinais quimiotáticos derivados de células de Schwann para recrutamento de macrófagos, que contribuem para a regeneração nervosa (TOFARIS et al., 2002).

Durante a degeneração *Walleriana*, a citocina pró-inflamatória IFN- γ é altamente expressada (GILLEN; JANDER; STOLL, 1998). O IFN- γ estimula a infiltração de macrófagos M1 (pró-inflamatórios) que liberam citocinas pró-inflamatórias adicionais, como TNF- α , interleucina 1 alfa (IL-1 α) e beta (IL-1 β), óxido nítrico e metaloproteinases para destruição tecidual (MURRAY; WYNN, 2011). Em contrapartida, os macrófagos M2 ativados (anti-inflamatórios) liberam citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13) e IL-10, atuando como mediadoras da restauração tecidual e da modulação da resposta pró-inflamatória (DEFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015; ROTSHENKER, 2011). Ambas citocinas - IL-6 e IL-10 - modulam a resposta inflamatória, inibindo a síntese e a liberação de moléculas pró-inflamatórias adicionais após degeneração axonal e eliminação dos debris de mielina (DEFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015; ROTSHENKER, 2011). A IL-10 regula a infiltração de macrófagos M1 e a produção de metaloproteinases, controlando, assim, a degradação da mielina (DEFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015).

2.4 Sinais de ativação das MSC

As propriedades imunomoduladoras das MSC podem ser fortemente influenciadas pelo ambiente inflamatório, particularmente pelo IFN- γ (REN et al., 2008; VIGO et al., 2019). Em aplicações celulares alogênicas, o IFN- γ pode ser uma citocina pró-inflamatória relevante devido ao seu papel na ativação das respostas imunes inatas e adaptativas (POLCHERT et al., 2008). Estudos mostraram que MSC tratadas com IFN- γ suprimiram a proliferação dos linfócitos

T e das células *natural killer* (DE WITTE et al., 2016). O IFN- γ pode induzir a expressão de IDO, PGE2 e TGF- β e IL-10 parte das MSC, envolvidas na supressão de linfócitos T e regulação da produção das citocinas inflamatórias TNF- α e da interleucina 12 (IL-12), IL-1 β e interleucina 8 (IL-8) (DE WITTE et al., 2016). Um estudo demonstrou um incremento da atividade imunossupressora das MSC induzida pelo IFN- γ , sendo associado a produção de IDO, PGE2 e cicloxigenase-2 (COX-2) (ENGLISH et al., 2007).

Observações *in vivo* com o uso de MSC para o tratamento da doença do enxerto *versus* hospedeiro sugerem que o IFN- γ , produzido pelos linfócitos T em reposta ao reconhecimento do antígeno, estimula a atividade imunossupressora da MSC (POLCHERT et al., 2008). No modelo de encefalite experimental autoimune, a administração de interferon beta (IFN- β) apresentou efeitos sinérgicos e aumentou a capacidade imunomoduladora das MSC mediada pela proteína inibidora de protease secretada por leucócitos (SLPi) e HGF, mediadores solúveis envolvidos nas funções imunológicas e regenerativas das MSC. Os resultados apoiam a idéia do aprimoramento da capacidade regenerativa da MSC mediada por citosinas (VIGO et al., 2019). Neste sentido, é factível que o ambiente inflamatório rico em IFN- γ como observado após a lesão do SNP, possa otimizar o efeito das MSC na regeneração nervosa (VIGO et al., 2019).

Existem dúvidas fundamentais quanto a segurança e eficácia do uso terapêutico das MSC alogênicas e xenogênicas em animais e humanos, portanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer o efeito e a funcionalidade das MSC indiferenciadas em ambientes não próprios (*non-self-environment*) (LIN; HOGAN, 2011; RIBEIRO et al., 2015b).

3 HIPÓTESE

Foi hipotetizado que NGCs fabricados por impressão 3D e funcionalizados com AdMSC embebidas em biopolímero de fibrina promovem a regeneração nervosa após lesão experimental crítica de nervo isquiático em ratos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar se a funcionalização da estrutura interna do NGC de PCL com AdMSC incrementa a recuperação funcional, eletrofisiológica e morfológica do nervo isquiático após lesão experimental crítica em ratos.

4.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver processo de manufatura, por impressão 3D, NGC de PCL funcionalizado internamente com AdMSC embebidas em biopolímero de fibrina;
2. Comparar a recuperação funcional pelo índice do nervo isquiático e tibial nos grupos experimentais;
3. Comparar a dinâmica da marcha pelo método de análise "Catwalk" nos grupos experimentais;
4. Comparar a latência, amplitude e velocidade de condução nervosa (VCN) do nervo isquiático e fibular comum nos grupos experimentais;
5. Comparar o diâmetro das fibras e axônios mielinizados, espessura da bainha de mielina e razão "g" do nervo isquiático dos grupos experimentais;
6. Avaliar a expressão gênica dos fatores neurotróficos BDNF, GDNF, HGF e da citocina IL-10 nas AdMSC de cão *in vitro*,
7. Caracterizar a expressão do BDNF, GDNF, S100, P75^{NTR}, neurofilamento e colágeno IV após a lesão nos grupos GPCL+MSCc e Sham,
8. Comparar a expressão gênica das neurotrofinas BDNF, GDNF, HGF e da citocinas IL-10 e IL-6 na medula espinal após a lesão nos grupos GPCL+MSCc e Sham,
9. Avaliar a sobrevivência das AdMSC de cão 30 dias após a lesão nos grupos GPCL+MSCc e Sham.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais experimentais

Foram selecionados ratos Wistar fêmeas (*Rattus Novergicus*) e mantidos em condições de ambiente controlado. Todos os procedimentos foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UNESP, protocolo nº 1243–2017). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos:

1. Grupo sham (Sham): o nervo isquiático foi abordado sem alterações (n = 5);
2. Grupo autoenxerto (GA): foi realizada a lesão de 12mm de comprimento e imediatamente o mesmo segmento de nervo foi suturado com pontos perineurais (n = 5);
3. Grupo PCL (GPCL): após a lesão de 12mm, o NGC de PCL vazio foi fixado com pontos perineurais (n = 5);
4. Grupo GPCL+MSCr: após a lesão de 12mm o NGC foi fixado e funcionalizado com 1×10^6 AdMSC de rato embebidas em biopolímero de fibrina (n = 5).
5. Grupo GPCL+MSCc: após a lesão de 12mm o NGC foi fixado e funcionalizado com 1×10^6 AdMSC de cão embebidas em biopolímero de fibrina (n = 5).

Os grupos experimentais foram realizados paralelamente e foram comparados em dois experimentos distintos:

5.1.2 Experimento 1

Foram comparados os grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr. As AdMSC de rato foram caracterizadas *in vitro* e NGC de PCL foram modelados e fabricados por impressão 3D. Após os procedimentos cirúrgicos foram realizadas análises funcionais e eletrofisiológicas nos grupos experimentais. *In vivo* foi avaliado o índice de funcionalidade do nervo isquiático (IFNC) e tibial (IFT) semanalmente

durante 12 semanas. A análise da marcha pela plataforma *CatWalk* e a eletroneuromiografia foram avaliados na semana 8 e 12 após o reparo do nervo. *Post-mortem* foi realizada a avaliação morfológica na semana 8 e 12 após o reparo nervoso (Figura 2).

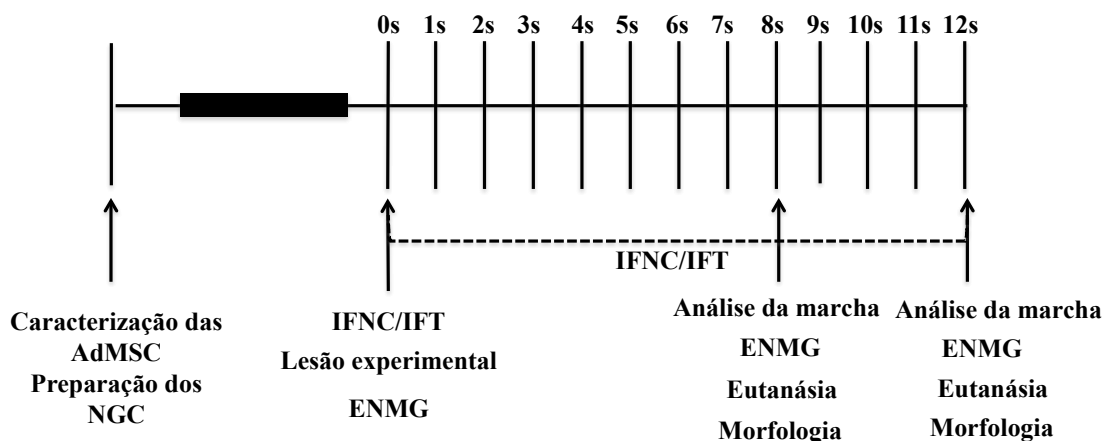


FIGURA 2. Delineamento do experimento 1. Foram comparados os grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr. Ad-MSC - Células estromais mesenquimias multipotentes; NGC - nerve guidance channel; IFNC - índice funcional do nervo isquiático; IFT- índice funcional do nervo tibial; ENMG - eletroneuromiografia.

5.1.3 Experimento 2

Foram comparados os grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc. As análises estatísticas foram realizadas usando os valores dos grupos Sham, GA, GPCL realizados no experimento 1 e comparados com o GPCL+MSCc. *In vitro* as AdMSC de cão foram caracterizadas e foram usados os NGC de PCL fabricados no experimento 1. *In vivo* foi avaliado o índice de funcionalidade do nervo isquiático (IFNC) e tibial (IFT) semanalmente durante 12 semanas. A análise da marcha pela plataforma *CatWalk* e a eletroneuromiografia foram avaliados na semana 8 e 12 após o reparo do nervo. *Post-mortem* foi realizada a análise morfométrica na semana 8 e 12 após o reparo do nervo. Com base nos resultados superiores observados no grupo GPCL+MSCc após a análise

estatística na recuperação funcional, electrofisiológica e histomorfométrica, foi avaliado o perfil de expressão gênica das AdMSC caninas após a estimulação *in vitro* com a citocina pró-inflamatória IFN- γ . Adicionalmente foi avaliado se o efeito terapêutico estava relacionado a expressão de fatores neurotróficos no nervo isquiático e na medula espinhal ipsilateral ao nervo lesionado. Desta maneira, as AdMSC de cão ($n = 3$) foram submetidas a estimulação *in vitro* com IFN- γ , sendo avaliada a expressão gênica de fatores neurotróficos e citocinas associados a regeneração nervosa (BDNF, GDNF, HGF, IL-10). Em ambos os grupos Sham ($n = 3$) e GPCL+MSCc ($n = 3$) foram avaliados por imunofluorescência a expressão proteica de BDNF, GDNF, S100, P75^{NTR}, neurofilamento e colágeno IV no nervo isquiático; e a expressão gênica de BDNF, GDNF, HGF, IL-10 e IL-6 na medula espinhal (Figura 3).

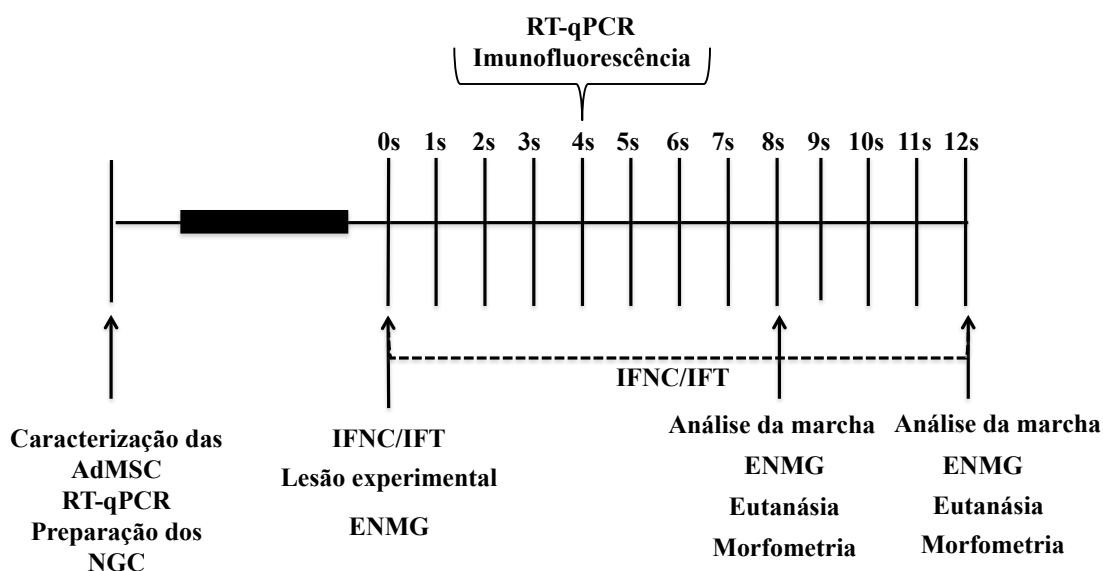


FIGURA 3. Delineamento do experimento 2. Foram comparados os grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc. Ad-MSC - Células estromais mesenquimias multipotentes; RT-qPCR – PCR quantitativa em tempo real; NGC - nerve guidance channel; IFNC - índice funcional do nervo isquiático; IFT- índice funcional do nervo tibial; ENMG - eletroneuromiografia.

5.2 Isolamento e caracterização das AdMSC

O tecido adiposo subcutâneo de cães jovens saudáveis e de ratos Wistar machos entre 250g a 350g foram coletados. Os procedimentos foram realizados seguindo protocolos descritos previamente, com modificações (SANCHEZ et al., 2017). O tecido adiposo foi digerido em colagenase tipo 1A (1mg/mL em HEPES, Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil) durante 1 hora, agitando gentilmente a cada 5-10 minutos (37°C). Posteriormente, foi realizado o bloqueio enzimático, a centrifugação (1200rpm por 10 minutos) e filtragem (70 µm, *cell strainer*, BD falcon™). O conteúdo celular foi semeado em garrafas de cultura aderente em presença de meio de cultura contendo 90% de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*), 10% soro fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina (100 U/mL), 1,2% de anfotericina B (250 µg/mL) (Gibco, Grand Island, NY, USA).

Após a digestão do tecido adiposo de rato, o conteúdo celular foi semeado em garrafas de T-25 na presença de 90% DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/nutrient mixture F-12*), 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina (100 U/mL) e 1,2% de anfotericina B (250 µg/mL) (Gibco, Grand Island, NY, USA).

As células foram expandidas até a 3ª passagem (P3) e congeladas para formar o banco de AdMSC que foi usado nos animais experimentais e na caracterização celular.

5.2.1 Diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica das AdMSCs

As Ad-MSC de cão e de rato em P3 foram submetidas *in vitro* a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica usando o *StemPro Kit* (Gibco, Grand Island, NY, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Duas semanas após a estimulação com meio indutor, as células foram fixadas com paraformaldeído (4%, pH 7,34) e a demonstração da diferenciação osteogênica e adipogênica foi realizada usando colorações histológicas Alizarin red (2%, pH 4,2) e Oil red (0,5% em isopropanol) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), respectivamente. Três semanas após a diferenciação condrogênica, as

células cultivadas em micromassa foram fixadas em formalina a 10%, embebidas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina. As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz invertida usando o software LAS 4.0 (DM IRB, Leica Microsystems, Germany).

5.2.2 Citometria de fluxo das AdMSC

As amostras de AdMSC de cão e de rato em P3 foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson Company, San Jose, USA). As AdMSC de cão e de rato foram avaliadas para os marcadores de superfície em reações contendo os anticorpos CD 90-PERCP (BD, Pharmigen™, San Diego, CA, USA), CD 34-FITC (BD Pharmigen™, San Diego, CA, USA), CD 45-PE (BD Pharmigen™, San Diego, CA, USA), CD 71-FITC (BD Pharmigen™, San Diego, CA, USA). As suspensões celulares foram ajustadas a concentração de 1×10^5 , diluídas em 100 μ L de solução isotônica e os anticorpos conjugados foram adicionados nessa diluição para cada reação. Posteriormente, os anticorpos foram incubados durante 30 minutos protegidos da luz e foi completada a reação com 400 μ L de isotôn. Os tubos foram centrifugados a 1200 rpm durante 10 minutos para a análise imediata no citometro de fluxo. Os controles foram realizados em células não submetidas a marcação para verificar a auto-fluorescencia. Foram obtidos 20000 eventos para a realização da análise. Os dados foram avaliados pelo software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Company, San Jose, USA).

5.2.3 Avaliação da expressão genica das AdMSC de cão após a estimulação com interferon-gama (INF- γ)

Amostras de AdMSC de cão foram ativadas *in vitro* por meio de estimulação direta para avaliar a capacidade neurotrófica e anti-inflamatória usando um mediador inflamatório recombinante relevante para lesão PNI como descrito previamente (AMORIM et al., 2020). Foram efetuadas triplicatas com 2×10^5 células/cm² por poço em placa de 24 poços (Costar®, 24 wells, TC-treated, Corning, NY, USA) acrescidas com 0,75 mL de meio basal contendo INF- γ ,

(50ng/mL; INF- γ recombinante canino, Kingfisher Biotech, Saint Paul, USA). Após 96 horas, as AdMSC de cão foram coletadas em TRIzol (TRIzol™, Invitrogen™, São Paulo, Brasil) e foram armazenadas a -80°C para a análise subsequente. Para o controle, as AdMSC foram cultivadas em meio de cultura basal.

O ácido ribonucleico (RNA) foi extraído usando o kit Mini RNAeasy™ (Qiagen, São Paulo, Brasil). O RNA foi quantificado por espectrofotometria usando o *NanoDrop 2000* (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA). A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada usando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante. A transcrição reversa para a amplificação do DNA complementar (cDNA) foi realizada com o termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific). As condições de termociclagem foram: 10 minutos a 25°C; 12 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. As reações foram realizadas em triplicatas usando o cDNA produzido, a enzima PowerUp™ SYBR™ Green (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific, Vilnius, Lithuania), água livre de RNA e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) caninos (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) Quadro 1.

QUADRO 1. Iniciadores utilizados nas reações de qPCR nas AdMSC de cão

Nome	Sequência (5' → 3')
BDNF	(F) GTGTCGAAAGGCCAACTGAAG
	(R) CGTGTAACCCATGGGATTGC
GDNF	(F) GGTTTGCTACAGCCAGCAGTT
	(R) CGCACCATGTTCAAATCCA
HGF	(F) ATGGTTCTTGGCGTCATTGTT
	(R) AATGCCAGGACGATTTGGAA
IL-10	(F) CCCAGGATGGCAACTCTTCTC
	(R) CGGGATGGTATTTTGCAGATC
GAPDH	(F) CATCAACGGGAAGTCCATCT
	(R) TACTCACCACCAGCATCACC
HPRT	(F) CGGCTTGCTCGAGATGTGAT
	(R) GCACACAGAGGGCTATGT

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro. GDNF - fator neurotrófico derivado da glia. HGF - fator de crescimento de hepatócitos. IL-10 – interleucina 10. GAPDH-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. HPRT-hipoxantina fosforibosiltransferase.

As amostras foram testadas com dois genes de referência; GAPDH e HPRT. O método de qPCR foi realizado com o termociclador QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific). As condições de termociclagem (*PCR stage*) e curva de fusão (*melt curve*) constam no Quadro 2.

QUADRO 2. Condições de termociclagem das amplificações de qPCR

Condições de Termociclagem		
Ciclos	Temperatura	Tempo
40 ciclos	50°C	2 minutos
	95°C	2 minutos
	95°C	1 segundo
	60°C	30 segundos
Curva de Fusão		
Contínuo	1,6°C	1 segundo
	95°C	15 segundos
	1,6°C	1 segundo
	60°C	1 minuto

5.3 Modelamento, impressão em 3D e construção dos NGCs

O polímero de PCL em forma de *pellets* (Mn - 50,000 g/mol, Sigma-Aldrich, Brasil) foi usado para a impressão 3D. As membranas foram impressas utilizando a tecnologia FDM na impressora FAB@CTI (Centro de tecnologia da informação Renato Archer CTI, São Paulo, Brasil). O processo de extrusão consiste na moldagem sob pressão de um material termoplástico viscoso através de um orifício (*open-ended die*). Estudos anteriores avaliaram a interação entre MSC e matrizes PCL impressas em 3D (MAURMANN et al., 2017). Os parâmetros de impressão foram: *jog speed* 2400Hz; *deposition rate* 0.07; *path speed* 8.8 mm/s; *path width* 0.3 mm, *path height* 0.3 mm e temperatura de 80°C. Os parâmetros de impressão foram definidos com o *software* FAB@Home (Centro de tecnologia da informação Renato Archer, São Paulo, Brasil). Os filamentos de PCL foram depositados em duas camadas de forma contínua com geometria quadrada (15 mm x 15 mm de lado, 225 mm²) recriando uma membrana e os NGC foram construídos através da selagem por aquecimento controlado. As membranas foram enroladas ao redor de um suporte de 1.5 mm,

seladas e esterilizadas. As membranas impressas em 3D foram revestidas por pulverização catódica com ouro (MED 010; Balterz Union) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (ESEM Quanta 200; Fei Company, Oregon, EUA). Os parâmetros geométricos foram avaliados usando um software de análise de imagem (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda). Durante a montagem dos NGCs, as membranas foram enroladas em pino cirúrgico de 1,5 mm e seladas com aquecimento controlado evitando a deformação da porosidade no local da selagem. Os NGCs foram esterilizados por lavagem com solução de etanol 70% por 10s, seguida de lavagem com água destilada. Após a secagem em temperatura ambiente, os NGCs foram submetidos à irradiação UV (200–280 nm) por 2 horas.

5.4 Lesão traumática e reparo do nervo isquiático

A lesão experimental do nervo isquiático foi realizada sob anestesia com isoflurano (Isoforine®, Cristalia, Brasil) em microscópio microcirúrgico (DF Vasconcelos, São Paulo, Brasil). A lesão experimental consistiu em neurotmeses de 12 mm de *gap*, considerado acima do nível crítico experimental em ratos (YANNAS; ZHANG; SPILKER, 2007) (Figura 4B). Em lesões de 12 mm de *gap* aproximadamente 10% do total de axônios mielinizados regenerantes são conduzidos dentro de NGCs de silicone (YANNAS; HILL, 2004; YANNAS; ZHANG; SPILKER, 2007). No grupo Sham, o nervo foi exposto sem modificações (Figura 4A). No grupo GA foi simulada a técnica de autoenxerto com 12 mm de *gap* (Figura 4C). O segmento nervoso foi re-suturado com pontos perineurais (9/0 nylon, Shalon, Brasil). No grupo GPCL, após a lesão de 12 mm de *gap* foram introduzidos os cotos nervosos 1,5 mm dentro do NGC e suturados com pontos perineurais (9/0 nylon, Shalon, Brasil) (Figura 4D). Nos grupos GPCL+MSCc e GPCL+MSCr, os NGC foram fixados e funcionalizados com 1×10^6 AdMSC de cão ou de rato (Figura 4E). Os planos cirúrgicos foram suturados (5/0, Vycril, Ethicon, USA) e foi administrado tramadol a dose única de 20mg/kg/SC, seguido de 2,5 mg dia/oral durante 5 dias.

No processo de funcionalização dos NGC, as AdMSC foram embebidas em biopolímero de fibrina (Patentes BR1020140114327 e BR1020140114360, Center for the Study of Venoms and Venomous Animals, CEVAP, São Paulo, Brasil). Previamente, a fibrina foi testada como suporte para as células (GASPAROTTO et al., 2014). A fibrina polimeriza rapidamente após a mistura de três componentes: (1) crioprecipitado rico em fibrinogênio; (2) solução de cloreto de cálcio 25mM; (3) solução enriquecida de trombina-*like*. No primeiro momento foi preparada a solução fibrinogênio + MSC. O *pellet* com 10^6 células foi ressuspenso em 25uL do fibrinogênio. Usando uma microseringa de precisão (50 μ L, 22s gauge, point style 2, Hamilton, Nevada, USA) a solução fibrinogênio + MSC foi aplicada lenta e uniformemente (Figura 4F). Posteriormente, foi aplicado 25 μ L de solução da solução de trombina obtendo uma suspensão final de 50 μ L (relação 1:1).

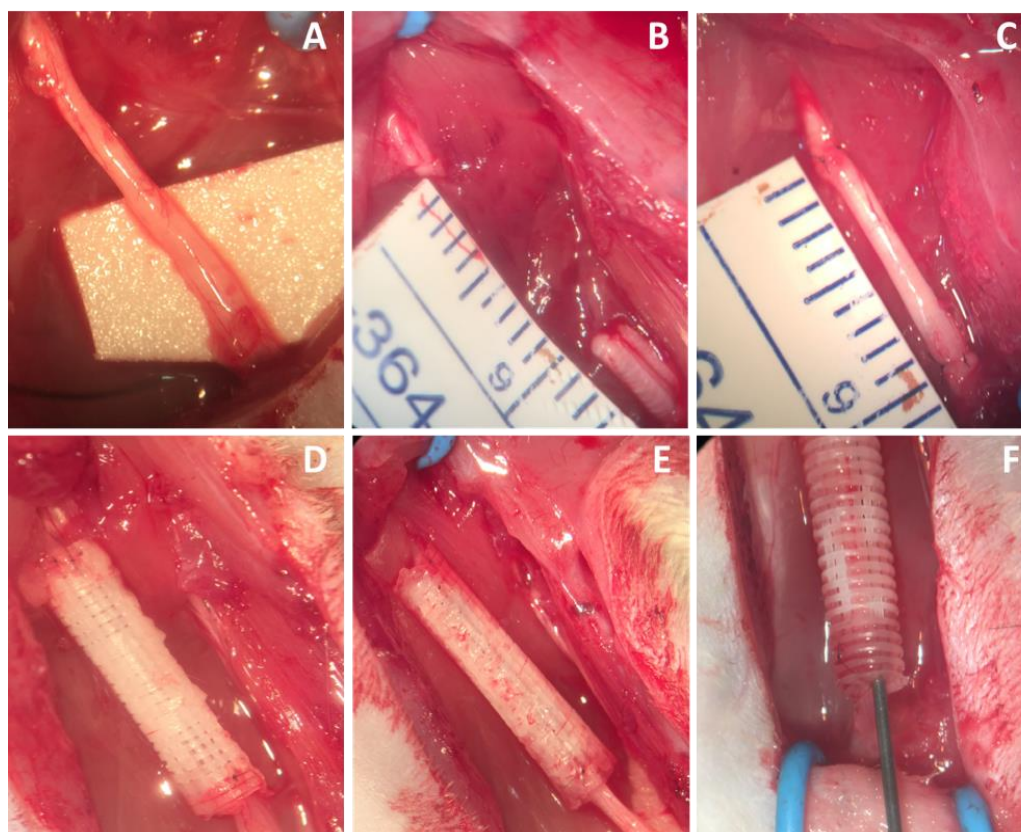


FIGURA 4. Lesão experimental e reparo do nervo isquiático nos grupos experimentais. (A) Sham. (B) lesão de 12 mm de gap. (C) técnica de autoenxerto. (D) GPCL. (E) GPCL+MSCr. (F) funcionalização da estrutura interna do NGC com AdMSC embebidas em biopolímero de fibrina.

5.5 Índice de funcionalidade do nervo ciático (IFNC) e tibial (IFT)

Os índices funcionais foram realizados semanalmente durante 12 semanas nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc GPCL+MSCr. Os membros pélvicos de cada animal foram umedecidos em tinta nanquim preta e os animais andaram por um corredor de 78 X 9cm, sobre uma folha de papel branco onde ficaram impressas as marcas das pegadas. Posteriormente, foram analisadas através das medições da distância do calcanhar aos dedos (PL); da distância entre o primeiro e o quinto dedos (TS) e da distância entre o segundo e o quarto dedos (IT). Os cálculos foram realizados seguindo as formulas descritas previamente (BAIN; MACKINNON; HUNTER, 1989). IFNC = $-38.3 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$ (30, 31); IFP = $174.9 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 80.3 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) - 13.4$; IFT = $-37.2 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 104.4 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 45.6 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$. NPL (*Normal print length*): comprimento da pegada do membro normal. EPL (*Experimental print length*): comprimento da pegada do membro experimental. NTS (*Normal toe spread*): abertura total do membro normal. ETS (*Experimental toe spread*): abertura total do membro experimental. NIT (*Normal intermediary toe spread*): abertura entre os dedos intermediários do membro normal. EIT (*Experimental intermediary toe spread*): abertura entre os dedos intermediários do membro experimental. Foi calculada a média de três ciclos de marcha de cada animal experimental (membro esquerdo) e do membro normal (membro direito). Posteriormente, foi calculada a média $\pm$ erro padrão para cada grupo experimental e para cada semana avaliada durante 8 e 12 semanas. As medições dos índices equivalentes a -100 indicam lesão total, enquanto ao redor de 0 refletem função normal.

5.6 Avaliação da marcha – *Catwalk*

Foi realizado no pré-operatório e na semana 8 e 12, respectivamente, nos animais dos grupos experimentais Sham, GA, GPCL, GPCL+MSCc e GPCL+MSCr. A análise da recuperação motora dos animais foi realizada pelo sistema automatizado *CatWalk* (Noldus, Wageningen, Netherlands). Ao longo de uma passarela de vidro, uma luz fluorescente verde é projetada de forma homogênea, permitindo intensificar as áreas nas quais os membros torácicos e pélvicos dos animais entram em contato com a placa de vidro. As pegadas dos membros foram capturadas por uma câmera de vídeo de alta velocidade (Fujinon DF6HA-1B), posicionada embaixo da passarela. Desta forma, a imagem é digitalizada e enviada para uma matriz. Com esta tecnologia as pegadas fluorescentes podem ser detectadas em diferenças de pressão. Os sinais fornecidos pela câmera foram digitalizados, pela placa de vídeo PCImage-SG (Matrix vision GmH, Oppenheimer, Alemanha). Três corridas foram obtidas e classificadas por cada animal e a relação ipsilateral/contralateral foi calculada obtida para os parâmetros avaliados: tempo de suporte (*stand time*) (segundos), área máxima de contato (*maximum contact area*) (cm²), intensidade máxima de contato (*maximum contact maximum intensity*), velocidade do balanço (*swing speed*) (m/s) balanço (*swing*) (s).

5.7 Avaliação eletrofisiológica

Foi realizada no pré-operatório e na semana 8 e 12, respectivamente, nos animais dos grupos experimentais Sham, GA, GPCL, GPCL+MSCc e GPCL+MSCr. As medições realizadas foram: latência (ms), amplitude (mV) e VCN do nervo isquiático obtidas nos músculos interósseos plantares (NAVARRO, 2016; NAVARRO; VERDÚ; BUTÍ, 1994; VALERO-CABRÉ; NAVARRO, 2001). Sob anestesia geral com isoflurano 5% (Isoflurine®, Cristalia, Brasil), foram realizados os estímulos com pulsos elétricos de 0,1 ms e intensidade supra-máxima) usando eletrodos de agulha monopolares colocados de forma percutânea no entalhe (*notch*) do nervo isquiático proximal ao sitio da lesão e na região posterior do calcanhar distal ao local da lesão. A latência e

amplitude foram obtidas no osciloscópio (Sapphire II 4ME, Teca Medelec, USA) a partir dos músculos interósseos. Durante o teste a temperatura dos ratos foi mantida entre 34-36°C.

Foi medida a latência e a amplitude do nervo fibular comum no músculo tibial cranial. Foi realizado um estímulo com pulsos elétricos de 0,1 ms (100us e intensidade supra-máxima) através de um estimulador bipolar diretamente no nervo isquiático proximal ao sítio da lesão após a exposição cirúrgica. As agulhas monopolares foram inseridas no ventre destes músculos. O eletrodo de referência foi posicionado na região abdominal.

A VCN através do nervo regenerado foi calculada dividindo a distância entre os dois estímulos eletrodos pela diferença entre as duas latências (distância/latência 2 - latência 1). Foi realizado o cálculo da média $\pm$ erro padrão para cada grupo experimental no pré-operatório, na semana 8 e 12, respectivamente.

5.8 Preparação dos espécimes e análise morfométrica

A análise morfométrica foi realizada na semana 8 e 12 nos animais dos grupos experimentais Sham, GA, GPCL, GPCL+MSCc GPCL+MSCr. Os animais foram anestesiados para a realização da ENMG. Posteriormente, foram eutanasiados com overdose de barbitúrico (120mg/kg/IP, Thiopentax, Cristalia, Brasil). Foi realizada a perfusão transcardíaca com 200ml de solução salina tamponada (NaCl 0,9% em PB 0,1M, pH 7,4). Imediatamente após, foi realizada a fixação aplicando 200ml com solução de Karnovsky (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 1% em PB 0,2M, pH 7,34). Os membros contendo o nervo regenerado foram imersos na mesma solução fixadora por 12 horas a 4°C. Posteriormente, os nervos contidos na estrutura interna do NGC foram dissecados e divididos em dois segmentos: proximal e distal. O procedimento de pós-fixação foi realizado em 3 horas em solução de tetróxido de ósmio 1%, diluído em PB 0,2M. Os fragmentos foram incluídos em resina de glicol metacrilato (Leica microsystems, Heidelberg, Germany) e cortes transversais do segmento proximal (2 μ m) foram obtidos e corados com azul de toluidina 0,25%.

A análise morfométrica foi realizada amostrando pelo menos 30% de cada seção transversal do nervo usando um microscópio de campo claro (Leica Microsystems CMS, Leica DM 4000 B-M). Dois campos foram amostrados em cada nervo (ampliação de 100x) para a obtenção dos diâmetros da mielina e dos axônios, usando o software Adobe Photoshop CC 2019. Os parâmetros morfométricos incluíram: diâmetro dos axônios mielinizados; diâmetro das fibras mielinizadas; espessura da mielina (diâmetro da fibra - diâmetro do axônio/2); e razão "g" (diâmetro do axônio/diâmetro da fibra). A média e o desvio padrão foram calculados para cada grupo experimental e para cada momento avaliado.

5.9 Imunofluorescência do nervo isquiático (S-100, neurofilamento, BDNF, GDNF, P75^{NTR} e colágeno IV)

A análise da imunomarcagem foi realizada *post-mortem* 30 dias após nos grupos experimentais: Sham (n=3) e GPCL+MSCc (n=3). Os animais foram submetidos a eutanásia e perfusão transcardíaca. A fixação foi realizada com formaldeído a 4% em tampão sódico (0,1M, pH 7,4). A estrutura tubular contendo o nervo regenerado foi dissecada e imersa na mesma solução fixadora por 12 horas a 4°C. Em seguida, o material foi imerso em soluções de sacarose a 10%, 20% e 30% (PB 0,1M, pH 7,4 por 12 horas) e incluídos em Tissue-Tek O.C.TTM (Sakura Finetek, Torrance, USA) e congelados à -80°C. Foram obtidos cortes congelados longitudinais (12 µm) da estrutura nervosa da região interna do NGC. Durante a Imunofluorescência, as lâminas foram incubadas em uma solução de albumina sérica bovina (3%, BSA, PB 0,1M, pH 7,4) ou soro de burro (3% *donkey serum*, PB 0,1M, pH 7,4), durante 1 hora. Os anticorpos primários foram incubados por 4 horas a temperatura ambiente (Tabela 1).

TABELA 1. Anticorpos primários selecionados para a realização da imunomarcação no nervo isquiático.

Marcador	Empresa	Hospedeiro	Código	Diluição
S100	Abcam	Coelho	AB868	1:500
Neurofilamento	Millipore	Coelho	AB1989	1:200
BDNF	Millipore	Coelho	Ab1534	1:500
GDNF	Millipore	Ovelha	Ab5252p	1:500
p75 ^{NTR}	Santa Cruz	Cabra	Sc-6188	1:250
Colágeno IV	Santa Cruz	Coelho	SC-11360	1:100

Os anticorpos secundários conjugados com Alexa flúor 488, Alexa flúor 546 e CY2 foram aplicados e incubados por 45 minutos. As lâminas foram lavadas e montadas em glicerol/DAPI. Para a análise quantitativa da imunomarcação foram obtidas imagens representativas usando o microscópio de fluorescência (BX51, Olympus Corporation, Tokio, Japan). As imagens foram importadas para a determinação da densidade integrada de pixels com a ferramenta limiar do software *ImageJ* (versão 1.33u, *National Institute of Health*, USA).

5.10 Expressão gênica dos fatores neurotróficos (BDNF, GDNF e HGF) e citocinas (IL-6 e IL-10) na medula espinhal

A análise da expressão gênica na medula espinhal ipsilateral foi realizada 30 dias após a lesão em dois grupos: Gsham (n=3) e GPCL+MSCc (n=3). O tecido medular previamente congelado foi finamente picado e homogeneizado com trizol (TRIzolTM, InvitrogenTM, São Paulo, Brasil) e clorofórmio. As amostras foram agitadas utilizando kit e agitador Precellys Lising Kit® (Uniscience, São Paulo, Brazil) durante 30 segundos. O RNA total foi extraído e quantificado usando o Mini RNAeasyTM kit (Qiagen, São Paulo, Brasil) e o *NanoDrop 2000* (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA). A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada usando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied BiosystemsTM, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante. As reações foram realizadas em triplicatas usando como modelo cDNA produzido, a enzima PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix (Applied BiosystemsTM, Thermo Fischer Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania),

água livre de RNA e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) de rato (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) Quadro 3.

QUADRO 3. Iniciadores utilizados nas reações de qPCR do tecido medular.

Nome	Sequência (5' → 3')
BDNF	(F) GGCCCAACGAAGAAAACCAT
	(R) AGCATCACCCGGGAAGTG
GDNF	(F) ACTTGGGTTTGGGCTACGAA
	(R) CAGGAACCGCTACAATATCGAAA
HGF	(F) ATCGTGGCAATGGGAAAAAC
	(R) GAACATGTGAGTCCAGACCTTGTT
IL-10	(F) CCCAGGATGGCAACTCTTCTC
	(R) CGGGATGGTATTTTGCAGATC
IL-6	(F) CCCACCAGGAACGAAAGTCA
	(R) GCGGAGAGAACTTCATAGCTGTT
β2-microglobulina	(F) GCCATCCACCGGAGAATG
	(R) GGTGGAAGTGAACACGTAGCA
HPRT	(F) CGGCTTGCTCGAGATGTGAT
	(R) GCACACAGAGGGCTATGT

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro. GDNF - fator neurotrófico derivado da glia. HGF - fator de crescimento de hepatócito. IL-10 - Interleucina - 10. IL-6 interleucina 6. Hipoxantina a fosforibosiltransferase (HPRT).

As amostras foram testadas com dois genes de referência, o B2M e o HPRT. O método de qPCR foi realizado com o termociclador QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific) com as condições de termociclagem (*PCR stage*) e curva de fusão (*melt curve*) descritas no Quadro 2.

5.11 Análise estatística

As variáveis (IFNC, IFT, amplitude, latência e VCN) foram avaliadas quanto à normalidade com testes estatísticos (Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov), estatística descritiva análises gráficas (QQ plots). Foi realizado um teste de análise de variância (*2way ANOVA multiple comparisons*) seguido do teste de Tukey para verificar a diferença nas médias das variáveis entre cada grupo e momento do experimento. As variáveis (densidade integrada de pixels e quantificação relativa) foram avaliadas quanto à normalidade com testes

estatísticos (Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov), estatísticas descritivas e análises gráficas. Para dados paramétricos foi realizado o t teste para amostras não pareadas. Para dados não paramétricos foi realizado o teste Mann-Whitney para amostras não pareadas. O nível de significância entre os grupos foi $p < 0.05$. As diferenças foram denotadas por um único asterisco ($p < 0,033$), dois asteriscos ($p < 0,002$) e três asteriscos ($p < 0,001$) (GraphPad Prism versão 8 para Mac, San Diego, CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Resultados do experimento 1

6.1.1 As AdMSC de rato mostraram origem mesenquimal

A população de AdMSC de rato evidenciou características específicas mesenquimais demonstrado pela morfologia fusiforme e homogênea de células com capacidade de aderência ao plástico, além da capacidade de diferenciação a linhagens celulares do mesodermo e expressão de antígenos de superfície ((*clusters differentiation* (CD)) associados a células de origem mesenquimal (Figura 5A-H).

A multipotencialidade foi demonstrada *in-vitro* pela estimulação positiva para as tri-linhagens osteogênica aos 14 dias, adipogênica aos 14 dias e condrogênica aos 21 dias quando comparado aos controles (Figura 5A, B e C). A análise imunofenotípica pela citometria de fluxo (P4) confirmou expressão positiva para os antígenos CD 90⁺ (*Thy-1*) e CD71⁺ (*transferrin receptor*). Houve ausência de expressão dos antígenos hematopoiéticos CD45⁻ e CD34⁻ (*transmembrane glycoprotein*). Desta forma, a população celular ratificou características mesenquimais multipotentes (Figura 5).

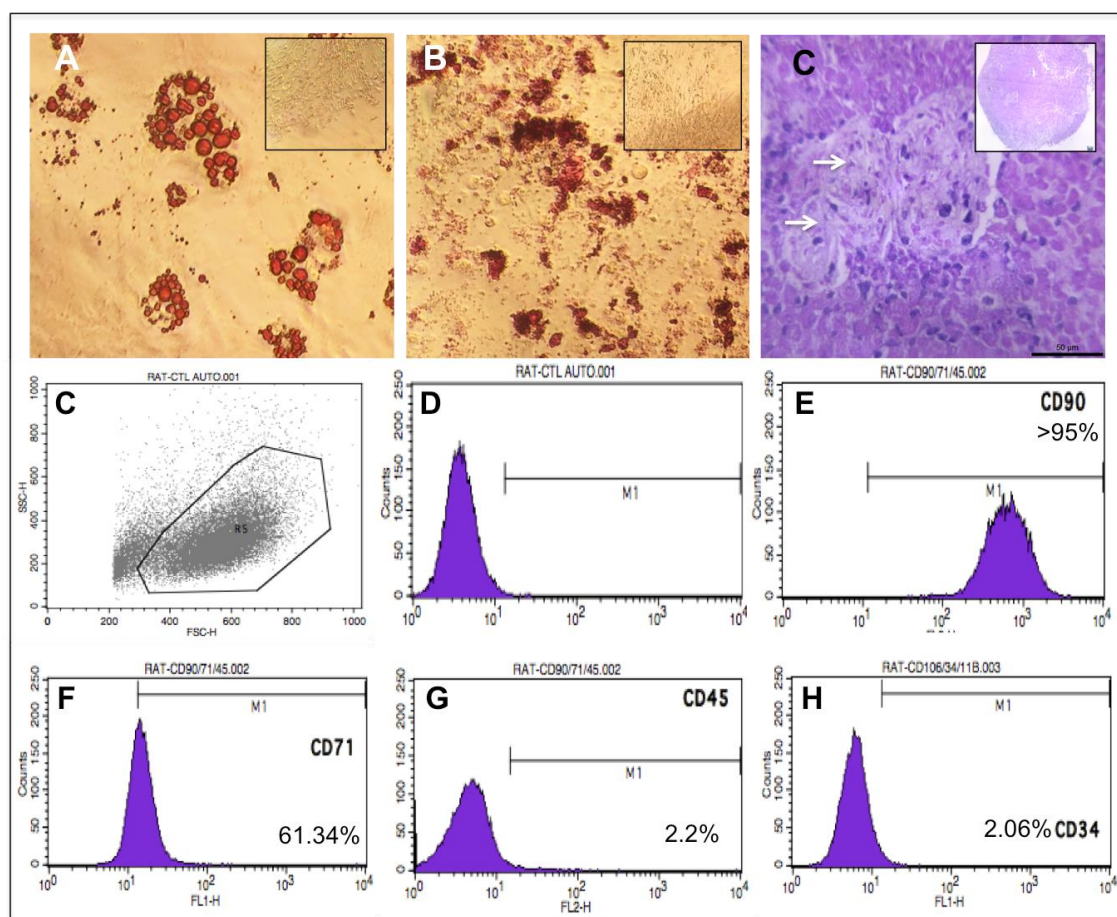


FIGURA 5. Caracterização das AdMSC de rato. **(A)** diferenciação adipogênica e controle positivo (intercalado em A). **(B)** diferenciação osteogênica e controle positivo (intercalado em B). **(C)** Foi observado presença de matriz extracelular (setas) na diferenciação condrogênica (Intercalado: micromassa celular após a diferenciação). **(D)** Gráfico dot plot mostrando a delimitação do gate da população analisada. **(E)** marcação negativa do autocontrole. **(F)** CD 90⁺; **(G)** CD 71⁺, **(H)** CD45⁻ **(I)** CD34⁻, respectivamente. Barra de escala em 20x = 20 µm; barra da escala diferenciação condrogênica, 50 µm.

6.1.2 Análise ultraestrutural dos NGCs fabricados por impressão 3D

As membranas de PCL foram fabricadas por impressão 3D usando a técnica FDM. Os filamentos foram depositados continuamente em uma geometria quadrada (15 mm x 15 mm) ao longo da direção vertical na primeira camada e da direção horizontal na segunda camada. A deposição do PCL criou uma membrana com filamentos dipostos de forma transversal (Figura 6A-

E). Os filamentos apresentam diâmetro de $396 \pm 74 \mu\text{m}$. Foi observada espessura da membrana de $386 \pm 41 \mu\text{m}$ (Figura 6F). As lacunas de ar entre os filamentos (áreas sem polímero) formaram poros com altura de $312 \pm 58 \mu\text{m}$ e comprimento de $300 \pm 51 \mu\text{m}$ (Figura 6F). As fibras foram alinhadas de forma uniforme com formas e tamanhos dos poros definidos (Figura 7A e B). Após a montagem por aquecimento controlado os NGCs mostraram diâmetro aproximado de 1.5 mm e arquitetura lisa na superfície externa com (Figura 7C e D).

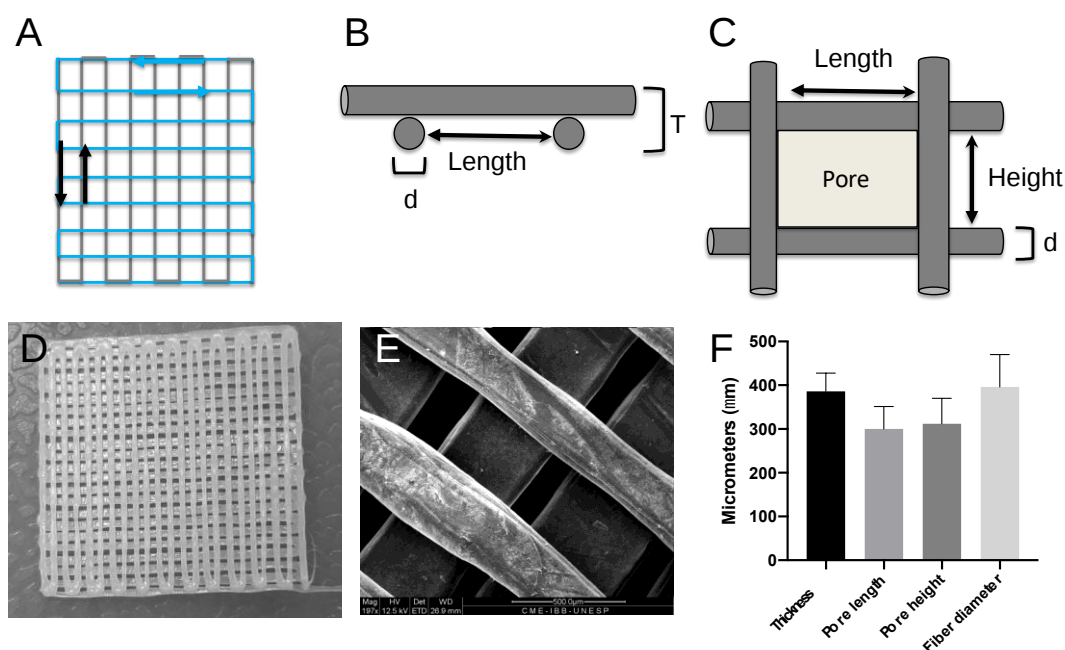


FIGURA 6. Caracterização geométrica dos NGC de PCL fabricados pela impressão em 3D. **(A)** Trajeto da altura e do comprimento da primeira e da segunda camada durante a deposição do PCL na impressão 3D. **(B)** Vista lateral das duas camadas de membranas PCL com filamentos entrelaçados. **(C)** Vista dorsal das membranas PCL mostrando a altura (height) e o comprimento (length) do poro e o diâmetro do filamento. **(D)** Aparência macroscópica das membranas após a impressão. **(E)** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de membrana de PCL, mostrando a macroporividade. **(F)** Parâmetros geométricos das membranas de PCL. Os valores são representados como média $\pm$ desvio padrão. Barra da escala: 500 μm .

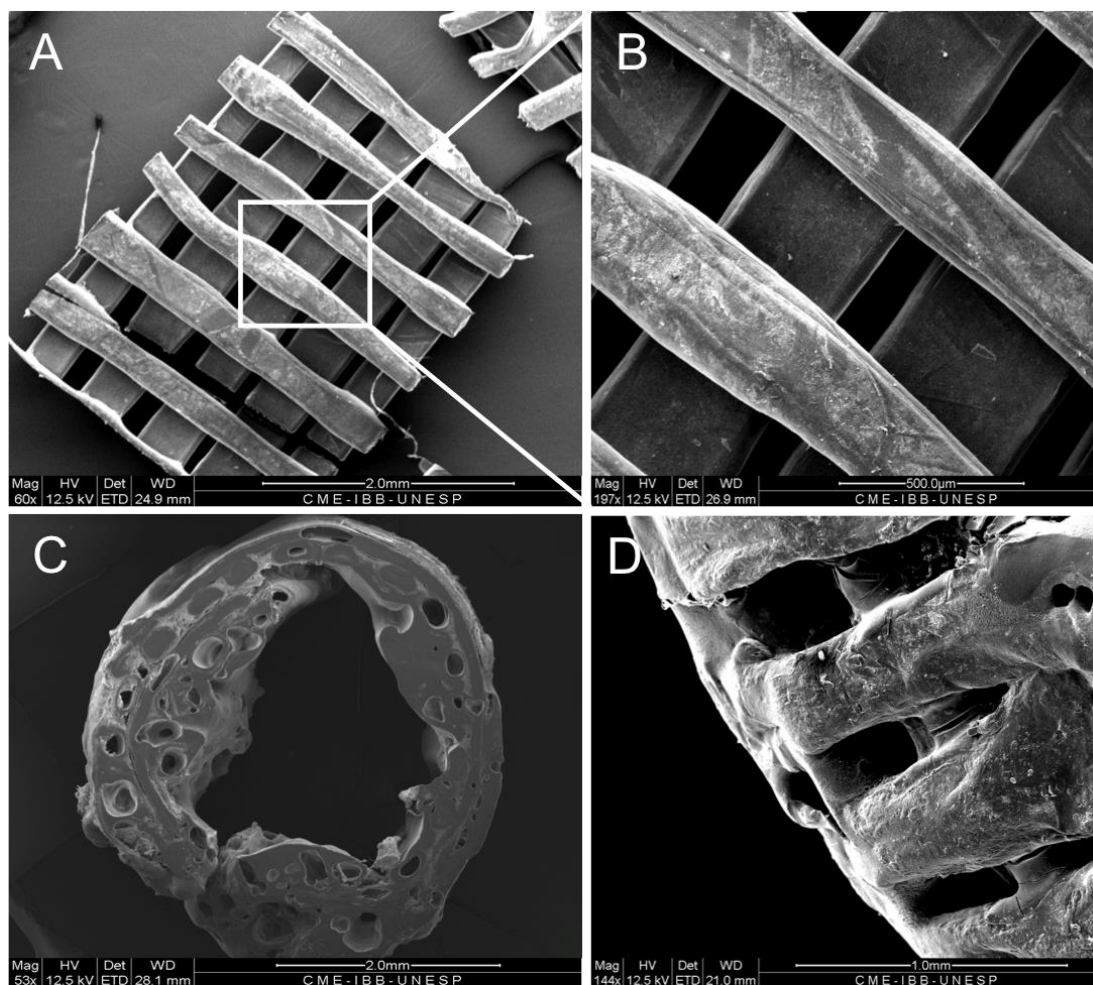


FIGURA 7. Caracterização dos NGCc de PCL fabricados por impressão 3D. **(A)** Vista dorsal da arquitetura da membrana de PCL (barra da escala 2.0 mm). Observe a presença de macroporosidade, formada a partir de filamentos depositados de forma transversal em duas camadas. **(B)** Os filamentos de PCL depositados apresentaram superfície regular e lisa (barra da escala 500 μm). **(C)** corte transversal do NGC após a montagem (barra da escala 2.0 mm). **(D)** superfície externa dos NGCs (barra da escala 2.0 mm).

6.1.3 Os NGC funcionalizados com AdMSC de rato apresentaram efeitos positivos na recuperação funcional

Foram detectadas diferenças significativas no IFNC na semana 8 entre o grupo GA (IFNC; -52,08 8s) e os grupos GPCL (IFNC; -73,65 8s) ($p=0.08$). Entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo GA (IFNC; -52,08 8s) e o grupo GPCL+MSCr (IFNC; 66,46 8s) ($p>0.05$).

Foi observada diferença significativa na semana 11 entre o grupo GA (IFNC; -52,58) e GPCL (IFNC; -72,44) ($p=0.03$) e GPCL+MSCr (IFNC; -76,16;) ($p<0.001$). Na semana 12, não houve diferenças significativas entre o grupo GA (IFNC; -50,40) e os grupos GPCL (IFNC; -75,38 12s) ($p<0.001$). Porém, não houve diferença significativa entre o grupo GA (IFNC; -50,40 12s) e o grupo GPCL+MSCr (IFNC; -65,14) ($p>0.05$). Os grupos GA e GPCL+MSCr evidenciaram incremento na recuperação motora funcional com respeito ao GPCL que mostrou valores inferiores (Figura 8).

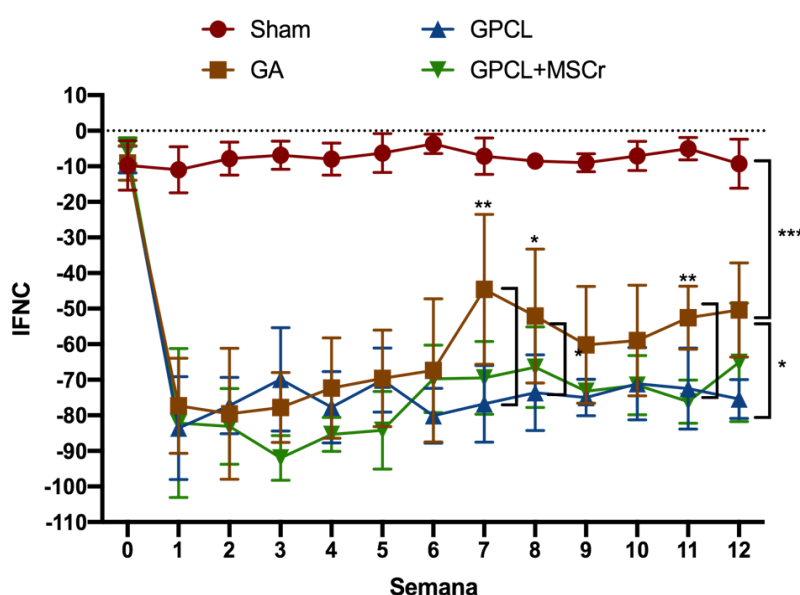


FIGURA 8. Avaliação locomotora pelo índice de funcionalidade do nervo isquiático durante 12 semanas nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr. Os valores obtidos foram representados semanalmente como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

Na análise do IFT foram detectadas diferenças significativas no IFT na semana 7 entre o grupo GA (IFT; -60,87) e o grupos GPCL (IFT; -79,78) ($p=0.02$). Porém, não houve diferenças significativas quando comparado ao grupo GPCL+MSCr (IFT; -75,85) ($p>0.05$) (Figura 9). Por outro lado, não foram detectadas diferenças significativas no IFT na semana 8 entre os grupos GA (IFT; -59,25 8s), GPCL (IFT; -74,75 8s) e GPCL+MSCr (IFT; -71,43) ($P>0.05$).

Foram detectadas diferenças significativas no IFT na semana 12 semana entre o grupo GA (IFNC; -64,25 11s; - 60,34 12s) e os grupos GPCL (IFT; -82,81 11s; -85,28 12s) ($p<0.001$) e GPCL+MSCr (IFT; -82,13 12s; -77,69) ($p=0.006$). O grupo GA evidenciou incremento na recuperação motora funcional.

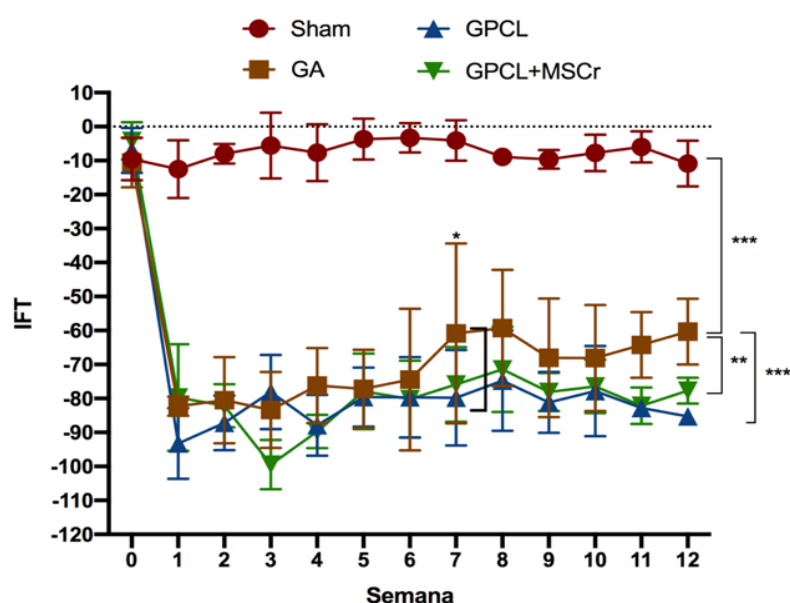


FIGURA 9. Avaliação locomotora pelo índice de funcionalidade do tibial durante 12 semanas nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr. Os valores obtidos foram representados como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

6.1.4 Os NGC funcionalizados com AdMSC de rato estimularam a recuperação da marcha

Não foram observadas diferenças significativas no tempo de suporte (*stand*) na semana 8 entre o grupo Sham quando comparado ao grupo GA e GPCL+MSCr com valores de 0,21 s, 0,16 s e 0,14 ms, respectivamente ($p>0.05$). Entretanto, foi observada diferença significativa entre o grupo Sham quando comparado ao GPCL com valores de 0,21 s, e 0,10 s, respectivamente ($p=0.03$). Na semana 12 o suporte (*stand*) foi superior no grupo Sham quando comparado aos grupos GA ($p=0.02$), GPCL ($p=0.01$) e GPCL+MSCr ($p=0.03$) com valores de 0,24 s, 0,12 s, 0,11 s e 0,13 respectivamente (Figura 10A).

Na avaliação da intensidade máxima do contato máximo (*maximum contact maximum intensity*) foram observadas diferenças significativas na semana 8 entre o grupo Sham e os grupos GA ($p=0.006$), GPCL ($p<0.001$) com valores de 158,8, 122,1 e 114,8, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa entre o grupo Sham quando comparado ao grupo GPCL+MSCr (140,8) ($p>0.05$). Na semana 12, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr ($p>0.05$) (Figura 10B).

Foram notadas diferenças significativas na área da pegada (*print area*) na semana 8 entre o grupo Sham quando comparado aos grupos GPCL ($p=0.001$) e GPCL+MSCr ($p=0.048$) com valores de 0,65 cm², 0,23 cm² e 0,38 cm², respectivamente. Na semana 12 houve diferença significativa entre o Sham e os grupos GPCL ($p=0,002$), GPCL+MSCr ($p=0,024$) com valores de 0,60 cm², 0,18 cm² e 0,29 cm² (Figura 10C).

Não foram detectadas diferenças significativas no tempo do balanço (*swing*) na semana 8 e 12 entre o grupo Sham quando e os grupos GA, GPCL e GPCL+MSCr ($p>0,05$) (Figura 10D).

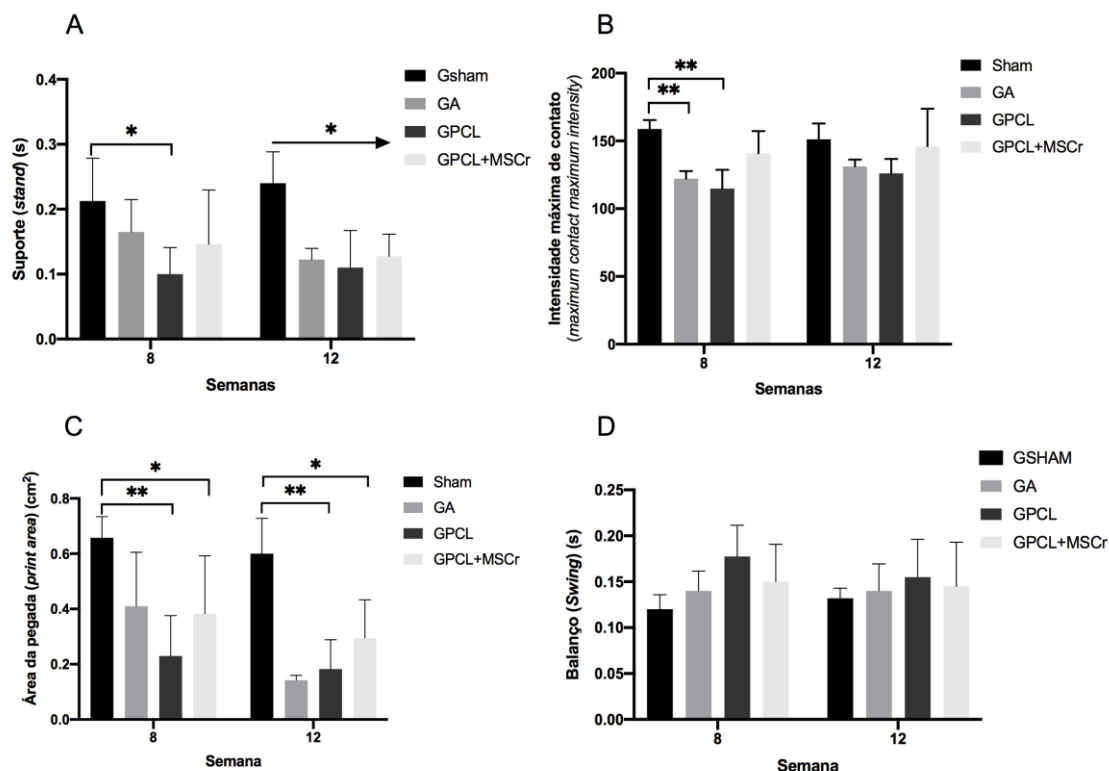


FIGURA 10. Recuperação funcional locomotora (Catwalk) na semana 8 e 12 após a lesão experimental nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr. (A) tempo de suporte (stand) (s), (B) intensidade máxima de contato (maximum contact maximum intensity), (C) área da pegada (print area) (D) tempo do balanço (swing) (s). Os valores foram representados como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

6.1.5 Os NGC funcionalizados com AdMSC de rato incrementaram na recuperação eletrofisiológica

Na obtenção dos parâmetros no musculo tibial cranial, não foram notadas diferenças significativas na latência média na semana 8 e 12 entre o grupo Sham quando comparado ao grupo GA, GPCL e GPCL+MSCr ($p > 0.05$) (Figura 11A).

Na amplitude média houve diferenças significativas na semana 8 e 12 entre o grupo GA e os grupos GPCL ($p < 0.002$) e GPCL+MSCr ($p < 0.001$). O grupo GPCL+MSCr evidenciou tendência a recuperação da amplitude (Figura 11B).

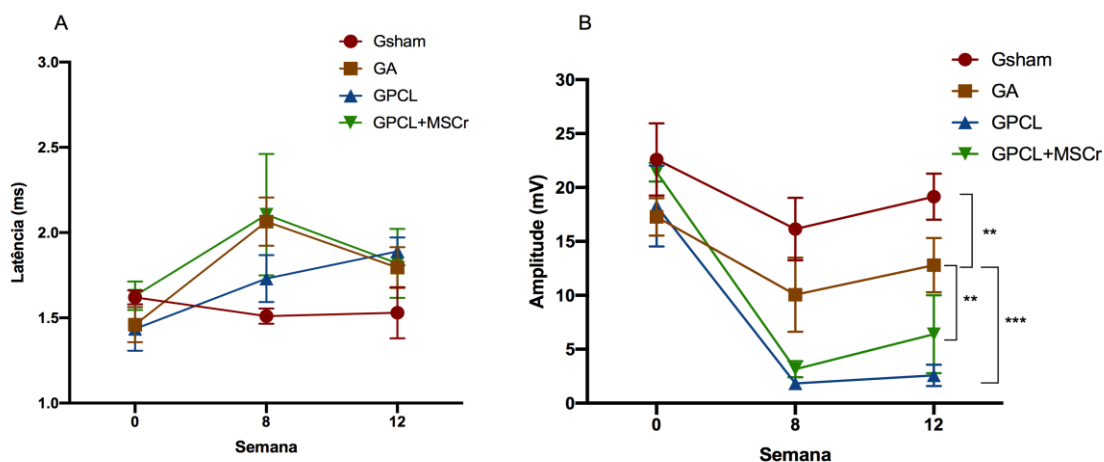


FIGURA 11. Latência e amplitude obtida no músculo tibial cranial na semana 8 e 12 nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr. **(A)** latência (ms). **(B)** amplitude (mV). Os valores foram representados como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

Na obtenção dos parâmetros nos músculos interósseos não foram notadas diferenças significativas na latência na semana 8 e 12 entre o grupo Sham quando comparado ao grupo GA e GPCL+MSCr ($p > 0.05$). Entretanto, foi observada diferença significativa entre o grupo Sham e GPCL na semana 8 e 12 ($p = 0.007$ 8s; $p = 0.04$ 12s), respectivamente (Figura 12A). Por outro lado, foram detectadas diferenças significativas na amplitude na semana 8 e 12 entre o grupo Sham comparado aos grupos GA, GPCL e GPCL+MSCr, respectivamente ($p < 0.001$).

A medição da VCN na semana 8 não mostrou diferenças significativas entre o grupo Sham (42,35 m/s) e os grupos GA (47,99 m/s), GPCL (28,02 m/s) e GPCL+MSCr (20,69 m/s) ($p > 0.05$), respectivamente. A medição da VCN na semana 12 não houve diferença significativa entre o grupo Sham (65,21 m/s) e os grupos GA (55,96 m/s) e GPCL+MSCr (39,43 m/s) ($p > 0.05$). Porém, houve diferença significativa entre o grupo Sham (65,21 m/s) e GPCL (25,50 m/s) ($p = 0.002$) e entre o grupo GA (55,96 m/s) e o GPCL (25,50 m/s) ($p = 0.02$) (Figura 13).

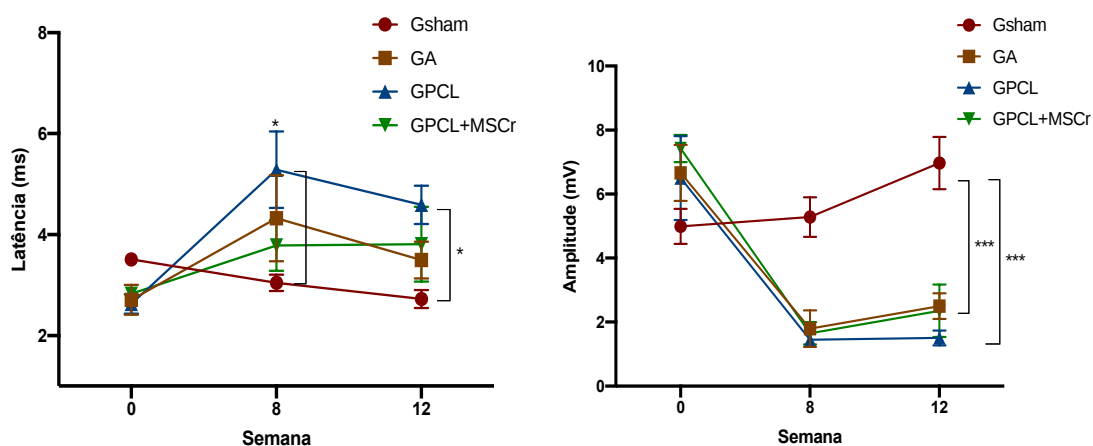


FIGURA 12. Latência e amplitude obtidas nos músculos interósseos na semana 8 e 12 isquiático nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr. **(A)** latência (ms). **(B)** amplitude (mV). Os valores foram representados como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

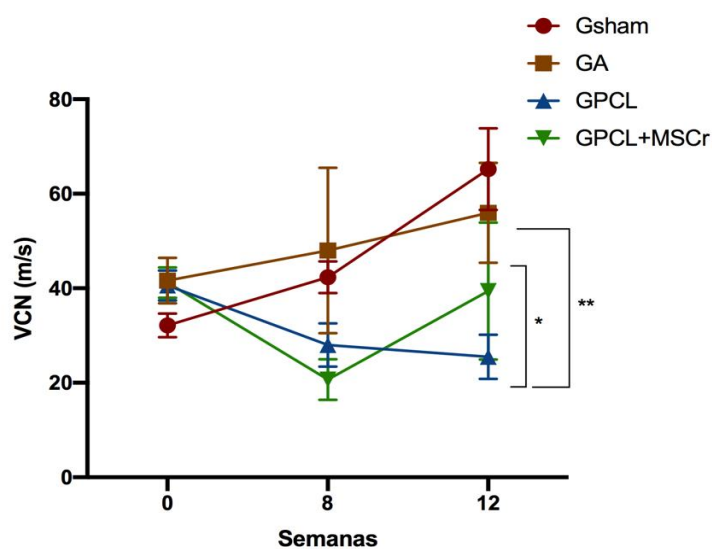


FIGURA 13. Análise da VCN na semana 8 e 12 nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCr. Os valores foram representados como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

6.1.6 Os NGC funcionalizados com AdMSC de rato mostraram tendência a presença de axônios de maior diâmetro

Durante a avaliação macroscópica dos nervos coletados dentro da estrutura interna do NGC o grupo GA apresentou estrutura homogênea entre o coto proximal e distal nas semanas 8 e 12, respectivamente. O grupo GPCL apresentou bordas irregulares, aumento da espessura e cooptação entre o coto proximal e distal nas semanas 8 e 12. O grupo GPCL+MSCr exibiu bordas regulares, diminuição da espessura e cooptação entre o coto proximal e distal na semana 12.

A caracterização morfológica mostrou tendência a recuperação do número de fibras na região central do nervo obtido da região interna da estrutura tubular no grupo GA, seguido do grupo GPCL+MSCr e do GPCL. Além disso, foi observado tendência ao incremento na espessura da bainha de mielina no GA, seguido dos grupos GPCL+MSCr e do GPCL. Na comparação entre o GPCL+MSCr e do GPCL houve similaridade no número de fibras nervosas, entretanto, o GPCL+MSCr mostrou tendência a presença de axônios mielinizados com maior diâmetro e espessura da bainha de mielina (Figura 14 A-D).

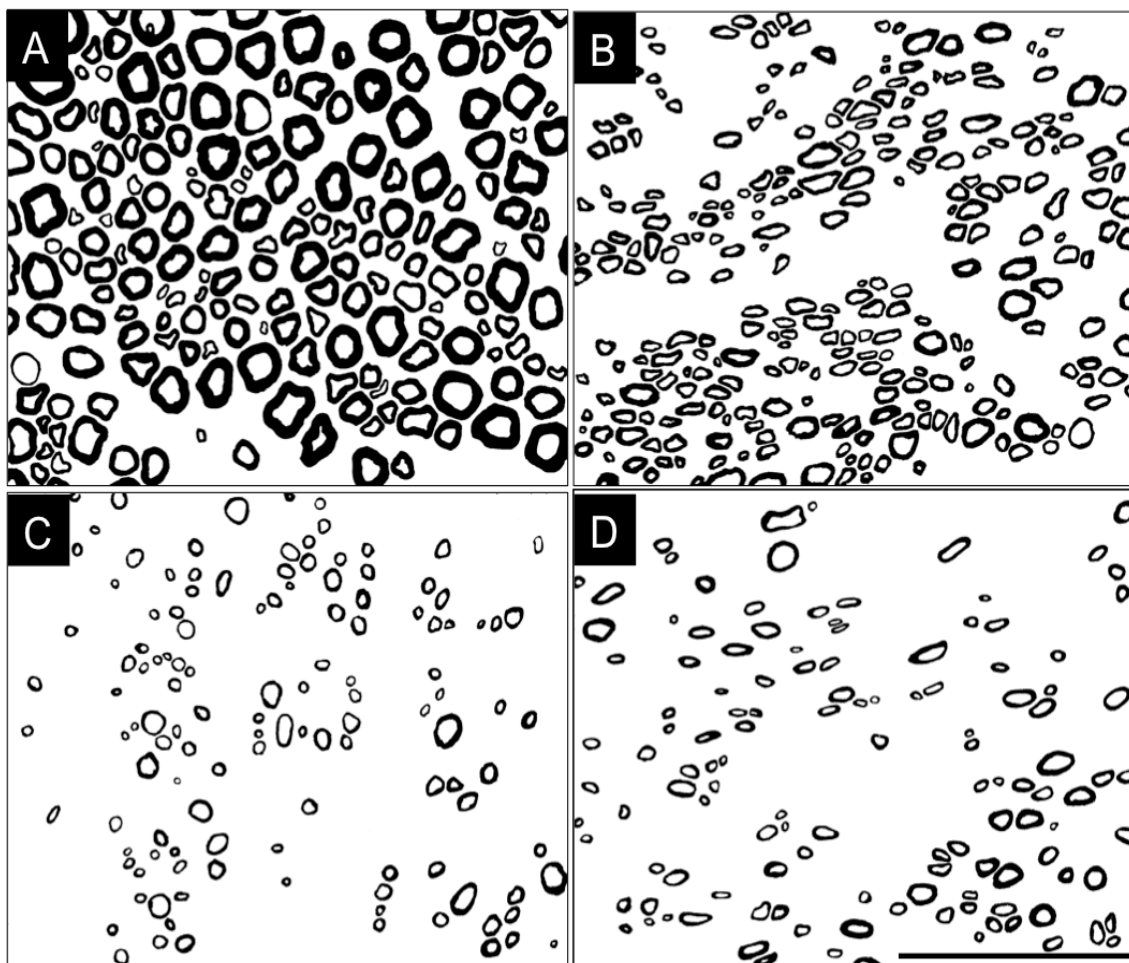


FIGURA 14. Aparência microscópica dos nervos isquiáticos 12 semanas após o reparo. (A) Gsham (B), GA (C) GPCL (D) GPCL+MSCr. Foi observada tendência ao aumento de axônios mielinizados com diâmetros maiores no GA e GPCL+MSCr em comparação com GPCL em 12 semanas. Barra da escala = 50 μ m.

6.2 Resultados do experimento 2

6.2.1 As AdMSC de cão apresentaram características mesenquimais

A população de AdMSC de cão evidenciou características específicas mesenquimais, demonstrado pela morfologia fusiforme e homogênea de células com capacidade de aderência ao plástico (Figura 15A e B), capacidade de

diferenciação em linhagens celulares do mesodermo e expressão de antígenos de superfície ((*clusters differentiation* (CD)) (Figura 15).

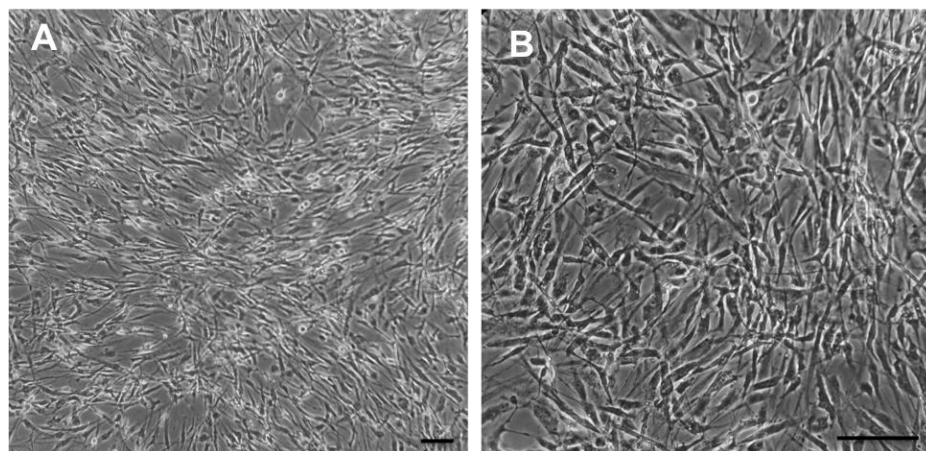


FIGURA 15. Células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo canino. **(A)** As células aderentes ao plástico mostraram confluência de 80%, 7 dias após o início da cultura em P4 (20x). **(B)** Observa-se a presença de células em monocamada com morfologia fusiforme e homogênea (40x). Barra da escala, 20 μ m e 40 μ m, respectivamente.

A multipotencialidade foi detectada *in vitro* pelas colorações *Alizarin red* que revelou em 21 dias a formação de matriz extracelular de cálcio e discreta formação de trabéculas (Figura 16A); a coloração *Oil Red* confirmou a presença de depósitos de lipídios intracitoplasmáticos ou gotículas de lipídeos no dia 14 (Figura 16B) e a coloração hematoxilina-eosina determinou a presença de glicosaminoglicanos dentro da matriz extracelular 21 após (Figura 16C). Os poços para controle mantidos com meio de cultura basal não apresentaram modificações. A análise imunofenotípica das AdMSC de cão confirmou a expressão positiva para o CD 90 (*Thy-1*) e ausência de expressão para os antígenos hematopoiéticos CD45 e CD34 (*transmembrane glycoprotein*) e CD71 (*transferrin receptor*) (Figura 16D-J).

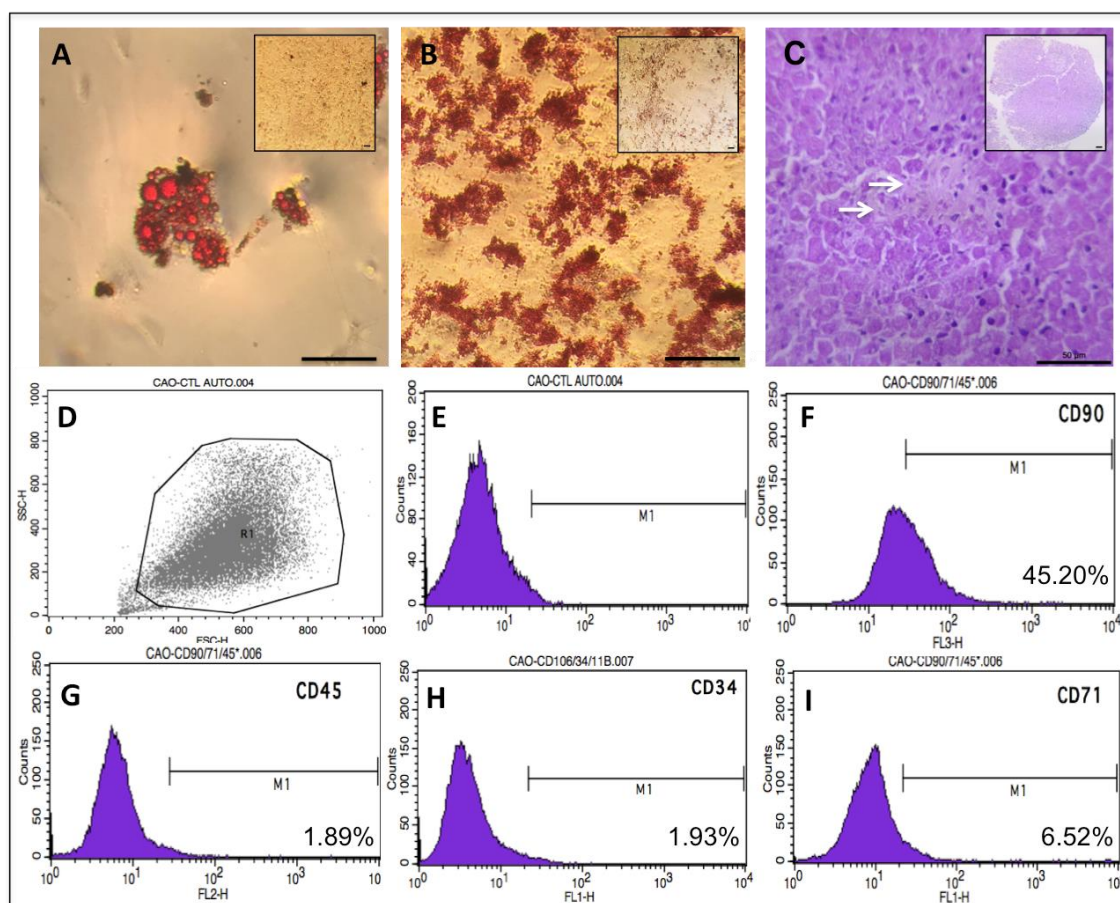


FIGURA 16. Caracterização das AdMSC de cão. **(A)** diferenciação adipogênica e controle positivo (intercalado em A). **(B)** diferenciação osteogênica e controle positivo (intercalado em B). **(C)** Foi observado a presença matriz extracelular cartilaginosa (setas) na diferenciação condrogênica (Intercalado: micromassa celular após a diferenciação). Barra da escala = 50 μ m. **(D)** Gráfico dot plot apontando a delimitação do gate da população analisada. **(E)** marcação negativa do autocontrole. **(F)** CD 90⁺. **(G-I)** CD45⁻ CD34⁻ e CD 71⁻, respectivamente.

6.2.2 A capacidade neurotrófica e anti-inflamatória das AdMSC de cão foi incrementada após a estimulação com IFN- γ

O RNA total de todas as amostras apresentou valores de razão de absorvância 260/280 e 260/230 dentro dos valores ideais. Os genes de referência GAPDH e HPRT apresentaram o Ct médio de $16,64 \pm 0,73$ e $20,679 \pm 0,56$. Os dois genes mostraram-se adequados como genes de referência, pois apresentaram pouca variação entre as amostras.

A expressão gênica dos fatores neurotróficos BDNF, GDNF e HGF foi avaliada nas AdMSC após estimulação com IFN- γ (BDNF $3,94 \pm 0,55$, GDNF $6,7 \pm 0,59$ e HGF $2,5 \pm 0,36$) em comparação ao controle não estimulado (BDNF $1,02 \pm 0,12$, GDNF $1,03 \pm 0,23$ e HGF $0,97 \pm 0,60$) (BDNF $p=0.02$, GDNF $p<0.001$ e HGF $p=0.01$), respectivamente. A IL-10 foi significativamente maior nas AdMSC após estimulação com IFN- γ ($2,66 \pm 0,36$) em comparação as células não estimuladas ($0,93 \pm 0,21$) ($p=0.07$) (Figura 17).

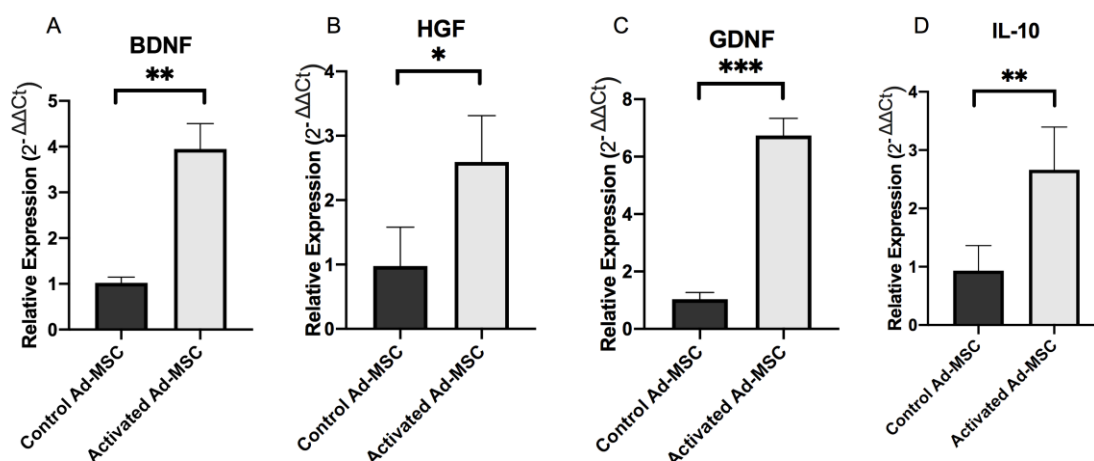


FIGURA 17. Expressão relativa dos genes BDNF, GDNF, HGF e IL-10 após a estimulação direta com IFN- γ . **(A)** BDNF. **(B)** GDNF. **(C)** HGF e **(D)** IL-10. Os dados do BDNF foram representados como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

6.2.3 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão aumentaram a recuperação funcional motora

Foram detectadas diferenças significativas no IFNC na semana 4 entre o grupo GA (IFNC -66,50) comparado ao GPCL (IFNC -81,85) ($p=0.03$) e GPCL+MSCc (IFNC -84,69) ($p=0.007$). O grupo GA evidenciou incremento na recuperação motora funcional.

Na semana 9 não houve diferenças significativas entre o GA (IFNC -60,19) e comparado ao GPCL+MSCc (IFNC -67,06) ($p>0.05$). No entanto, foram

observadas diferenças significativas entre os grupos GA (IFNC -60,19) e GPCL (IFNC -74,98) ($p=0.02$).

Na semana 11 houve diferenças significativas entre o GA (IFNC -52,58) quando comparado ao GPCL+MSCc (IFNC -67,30) ($p=0.02$) e GPCL (IFNC -77,39) ($p<0.001$).

Em 12 semanas, diferenças significativas foram observadas entre o GA (IFNC -50,40) quando comparado ao grupo GPCL+MSCc (IFNC -65,12) ($p=0.03$) e GPCL (IFNC -80,81) ($p<0.001$). Entretanto, o grupo GPCL+MSCc (IFNC -65,12) foi superior ao GPCL (IFNC -80,81) ($p<0.02$). Os grupos GA e GPCL+MSCc apresentaram melhores valores em comparação ao GPCL (Figura 18A).

Na avaliação do IFT, foram detectadas diferenças significativas semana 6 e 7 entre o grupo GA (IFT -66,13 6s; -65,10 7s) e GPCL (IFT -84,00 6s; -84,49 7s) ($p=0.007$ e $p=0,003$). Porém, não houve diferença significativa entre o GA (IFT -66,13 6s; -65,10 7s) e o grupo GPCL+MSCc (IFT -78,40 6s; -77,16 7s) ($p>0.05$).

Na semana 11 não houve diferenças significativa entre os grupos de GA (IFT -60,25) e GPCL+MSCc (IFT -75,98) ($p>0.05$). Além disso, o GA foi superior (IFT -64,25) comparado ao grupo GPCL (IFT -82,81) ($p=0,004$).

Na semana 12, não houve diferença significativa entre o GA (IFT -60,34) e o grupo GPCL+MSCc (IFT -72,69) ($p>0.05$). No entanto, o grupo GA (IFT; -60,34) foi superior ao GPCL (IFT -82,04) ($p<0.001$). O grupo GPCL+MSCc apresentou resultados superiores comparado ao GPCL (Figura 18B).

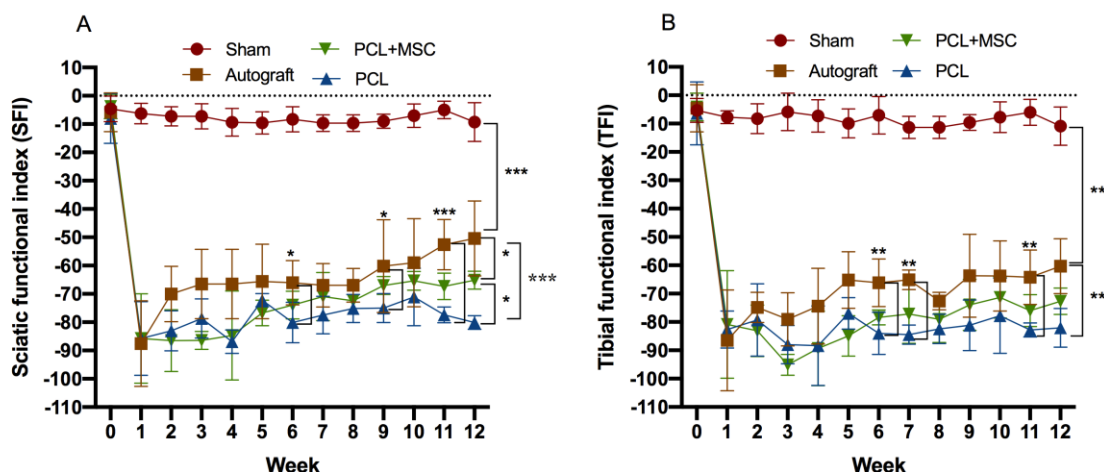


FIGURA 18. Avaliação locomotora através do IFNC e IFT durante 12 semanas nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc. **(A)** índice de funcionalidade do nervo isquiático. **(B)** índice de funcionalidade do nervo tibial. Os valores foram representados semanalmente como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

6.2.4 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão apresentaram efeitos positivos na recuperação da marcha

Durante a locomoção espontânea em 8 semanas, o tempo de suporte (*stand*) mostrou diferenças entre os grupos Sham quando comparado ao GA e GPCL+MSCc ($p > 0.05$). No entanto, foi inferior no GPCL comparado ao Sham ($p = 0.019$). Em 12 semanas, o tempo de suporte (*stand*) foi superior no grupo Sham comparado ao GA ($p = 0.014$), GPCL ($p = 0.006$) e GPCL+MSCc ($p = 0.004$) (Figura 19A).

A área de máximo contato (*maximum contact area*) em 8 e 12 semanas foi superior no Sham do comparado aos grupos GA, GPCL e GPCL+MSCc ($p < 0.001$). O GA apresentou melhores valores em 8 semanas do que GPCL ($p = 0.03$) e GPCL+MSCc ($p = 0.02$) (Figura 19B).

A velocidade do balanço (*swing speed*) (m/s) em 8 e 12 semanas não foram observadas diferenças significativas entre o GA quando comparados ao grupo GPCL+MSCc ($p > 0.05$). Em 8 semanas, o GA foi superior ao grupo GPCL ($p = 0.02$). Além disso, os valores do balanço (*swing*) não mostraram diferenças

significativas na semana 8 e 12 no grupo Sham quando comparados aos grupos GA e GPCL+MSCc, respectivamente ($p>0.01$). No entanto, o balanço de 8 semanas foi significativamente inferior no GPCL comparado ao Sham ($p=0.01$) (Figura 19C e D).

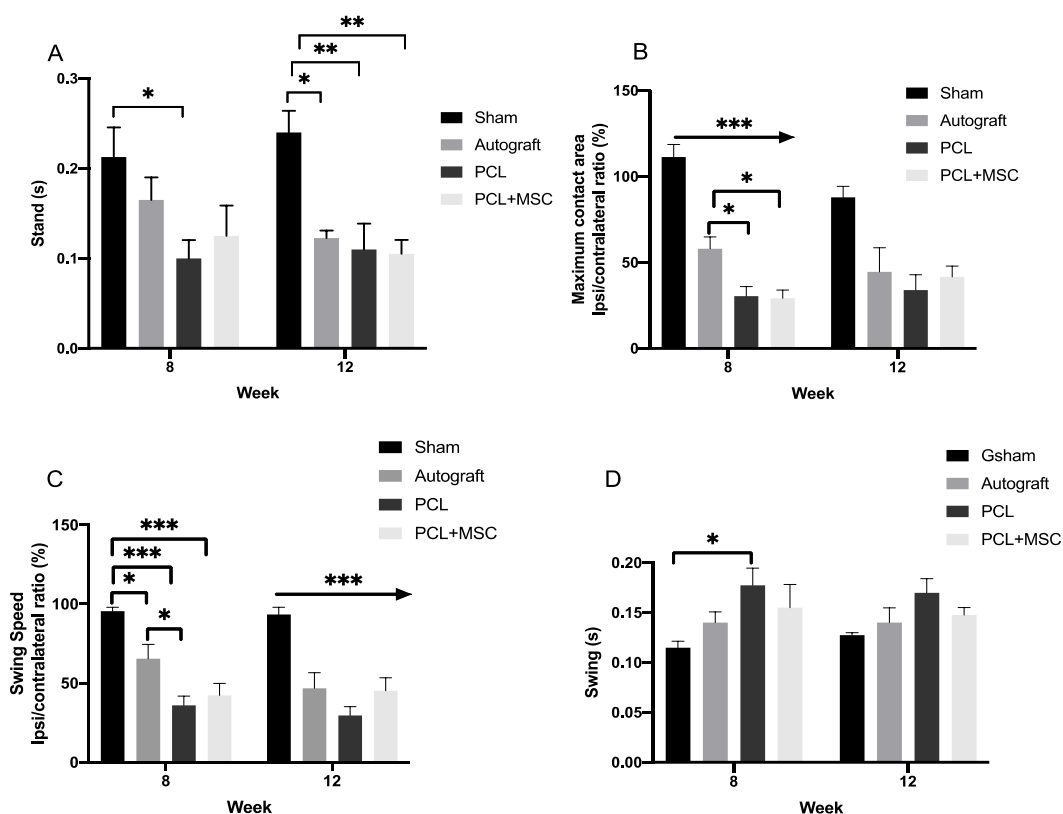


FIGURA 19. Avaliação da marcha (Catwalk) na semana 8 e 12 após a lesão nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc. **(A)** tempo de suporte (stand). **(B)** Área de contato máximo (maximum contact area). **(C)** Velocidade do balanço (swing speed) **(D)** balanço (swing) (s). Os valores obtidos foram representados como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

6.2.5 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão apresentaram efeitos positivos na recuperação eletrofisiológica

Nas medições no músculo tibial cranial não foram detectadas diferenças na latência média na semana 8 e 12 entre o grupo Sham quando comparado ao grupo GA, GPCL, GPCL+MSCc com valores de 1,53 ms, 1,79 ms, 1,85 ms e 1.50 ms, respectivamente ($p>0.05$). Diferenças significativas foram observadas na amplitude média na semana 12 entre o grupo GA e os grupos GPCL (4,08 mV) ($p<0.001$) e GPCL+MSCc (2,97 mV) ($p<0.001$) houve diferença significativa. O GA mostrou resultados superiores na amplitude, seguido do GPCL e GPCL+MSCc.

Nas medições nos músculos interósseos não foram notadas diferenças significativas na latência média na semana 8 entre o grupo Sham quando comparado ao grupo GA e GPCL+MSCc com valores de 3,04 ms, 4,32 ms e 4,5 ms, respectivamente ($p>0.05$) (Figura 20A). Entretanto, houve diferenças entre o grupo Sham quando comparado ao GPCL com valores de 3,04 e 4,59 ms ($p=0.004$), respectivamente (Figura 20A). Por outro lado, na semana 12 foram observadas diferenças significativas entre o grupo GA e os grupos grupo GPCL ($p>0.05$) e GPCL+MSCc ($p>0.05$) com valores de 3,49 ms, 4,59 ms e 4,01 ms, respectivamente.

Foram detectadas diferenças significativas na amplitude média na semana 8 e 12 entre o grupo Sham (16,15 mV 8s; 19,15 mV 12s) e os grupos GA (10,05 mV 8s; 12,80 12s) ($p=0.08$), GPCL (1,82 mV 8s; 4,0 12s) ($p= 0,03$) e GPCL+MSC (2,5 mV 8s; 2,9 mV 12s) ($p<0.001$), respectivamente (Figura 20B).

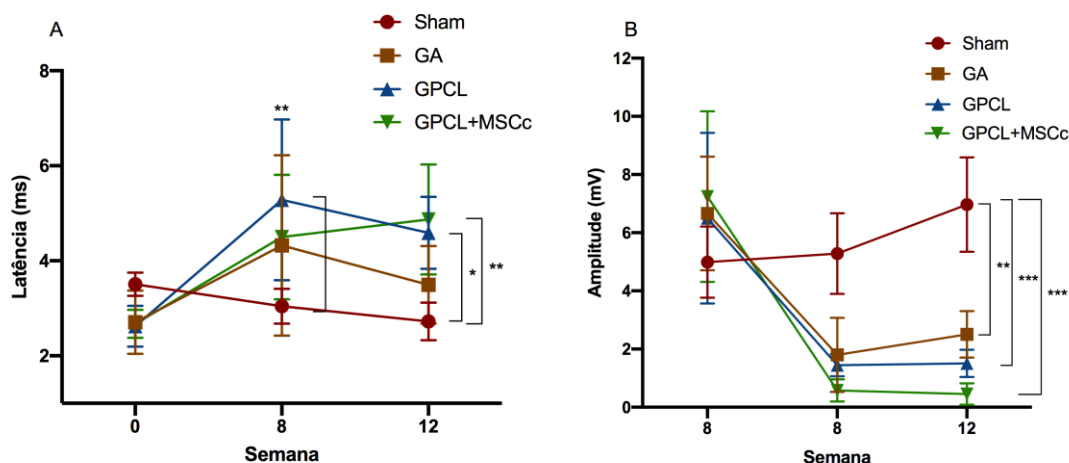


FIGURA 20. Latência e amplitude obtidas nos músculos interósseos nas semanas 8 e 12 após a lesão nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc. **(A)** latência (ms). **(B)** amplitude (mV). Os valores representados obtidos foram representados como média $\pm$ DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

A velocidade de condução nervosa através do nervo regenerado na semana 8 não apresentou diferenças significativas entre o grupo Sham (42,35 m/s) quando comparado aos grupos GA (47,99 m/s), GPCL (28,02 m/s) e GPCL+MSCc (26,98 m/s) ($p > 0.05$). Na semana 12, a VCN não mostrou diferenças significativas entre os grupos Sham (75,08 m/s), GA (55,96 m/s) e GPCL+MSCc (47,37 m/s) ($p > 0.05$). No entanto, a velocidade de condução nervosa foi significativamente reduzida no grupo PCL (25,50 m/s) ($p = 0.001$). Não houve diferenças significativas entre o GA e GPCL+MSCc na décima segunda semana ($p > 0,05$).

6.2.6 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão mostraram tendência a presença de axônios de maior diâmetro

A distribuição de frequência da espessura da mielina com porcentagens superiores em 8 semanas foi: Sham (1,2 a 1,7 μ m, média $1,54 \pm 0,01$), GA (0,4 a 0,7 μ m, média $0,71 \pm 0,01$), GPCL (0,2 a 0,5 μ m, média $0,43 \pm 0,01$) e GPCL+MSC (0,3 a 0,6 μ m, média $0,50 \pm 0,01$). Em 12 semanas foi observado: Sham (1,1 a 1,5 μ m, média $1,35 \pm 0,01$), GA (0,6 a 1,0 μ m, média $1,22 \pm 0,01$),

GPCL (0,4 a 0,7 μm , média $0,59 \pm 0,01$) e GPCL+MSCc (0,4 a 0,7 μm , média de $0,63 \pm 0,01$)

A distribuição de frequência da razão "g" com percentuais superiores em 8 semanas foi: Sham (0,6 a 0,65 μm , média $0,58 \pm 0,01$), GA (0,65 a 0,7 μm , média $0,60 \pm 0,01$), GPCL (0,75 a 0,80 μm , média $0,70 \pm 0,01$) e GPCL+MSC (0,65 a 0,75 μm , média de $0,63 \pm 0,01$) (Figura 21A-D). Em 12 semanas foi observado: Sham (0,65 a 0,70 μm , média $0,60 \pm 0,01$), GA (0,60 a 0,65 μm , média $0,57 \pm 0,01$), GPCL (0,75 a 0,8 μm , média $0,68 \pm 0,01$) e GPCL+MSCc (0,6 a 0,7 μm , média de $0,62 \pm 0,01$) (Figura 21E-H). A correlação entre a razão "g" e o diâmetro dos axônios mielinizados mostrou deslocamento em direção aos axônios de maior diâmetro, mostrando mielinização do GPCL+MSCc próximas ao GA em 12 semanas (Figura 22A-D).

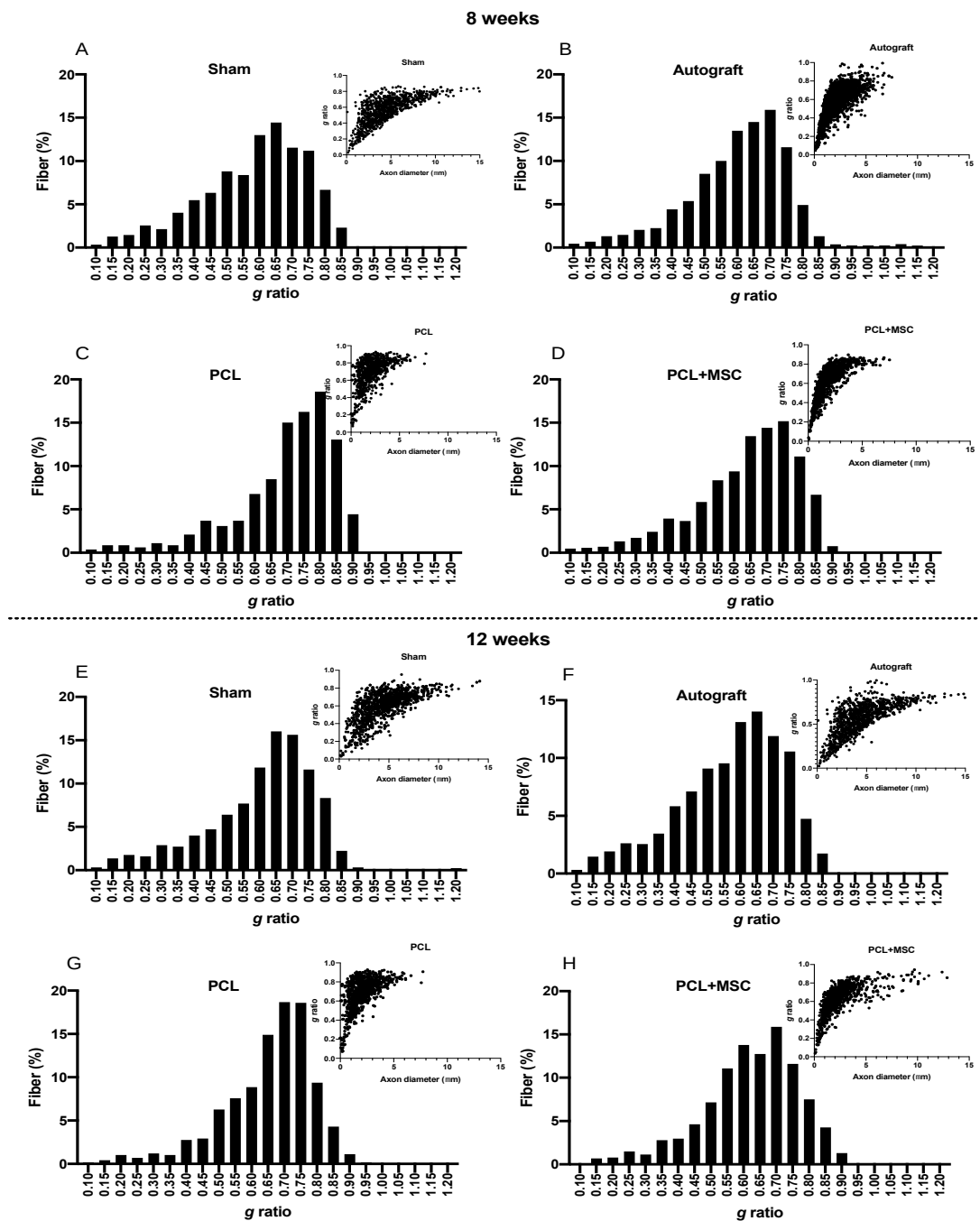


FIGURA 21. Distribuição de frequência da razão "g" e dot plot da razão "g"/diâmetro do axônio. (A, B, C, D) semana 8 após a lesão nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc, respectivamente. (E, F, G, H) semana 12 nos grupos Sham, GA, GPCL e GPCL+MSCc, respectivamente.

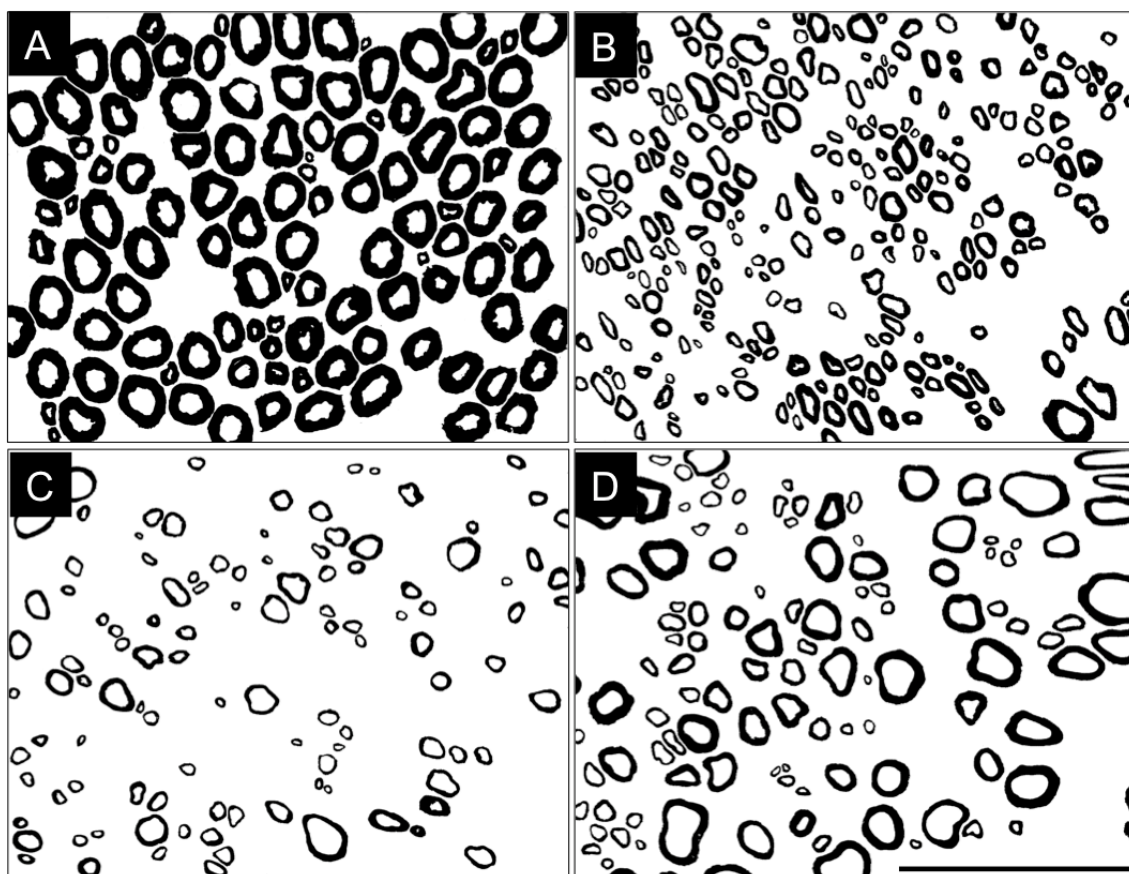


FIGURA 22. Aparência microscópica dos nervos isquiáticos 12 semanas após o reparo. (A) Gsham (B), GA (C) GPCL (D) GPCL+MSCc. Foi observada tendência ao aumento de axônios mielinizados com diâmetros maiores no GA e GPCL+MSCc em comparação com GPCL em 12 semanas. Barra da escala = 50 μm .

6.2.7 Os NGC funcionalizados com AdMSC de cão estimularam a expressão do P75^{NTR} e preservação da reatividade das células de Schwann

Foram realizadas medições da imunoreatividade da proteína S-100, neurofilamento e P75^{NTR} 30 dias após a lesão experimental nos grupos Sham e GPCL+MSCc. A imunoreatividade para o receptor P75^{NTR} foi superior no grupo GPCL+MSCc quando comparado ao Sham ($p=0.03$) (Figura 23A). Não foram observadas diferenças significativas na proteína S-100 entre o Sham e grupo

GPCL+MSCc ($p < 0.05$) (Figura 23B). Por outro lado, a imunomarcagem do NF foi superior no Sham quando comparado ao GPCL+MSCc ($p = 0.001$) (Figura 23C).

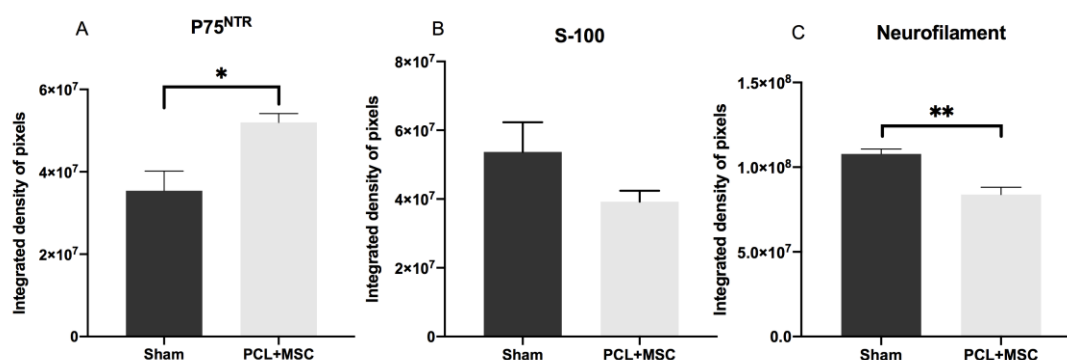


Figura 23. Análise quantitativa da intensidade de fluorescência no nervo isquiático 30 dias após a lesão experimental e reparo. **(A)** receptor P75^{NTR}. **(B)** S-100 **(C)** neurofilamento. Os valores representados obtidos foram representados como média ± DP. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

6.2.8 Os NGC funcionalizados com AdMSC estimularam a expressão de BDNF e GDNF e colágeno tipo IV no nervo isquiático

A análise da imunomarcagem dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF foi caracterizada por microscopia confocal na região proximal e central dos nervos regenerantes dentro do NGC no grupo GPCL+MSCc e no grupo Sham 30 dias após a lesão. Houve imunomarcagem positiva para o BDNF e GDNF nos nervos isquiáticos obtidos da região central e proximal no grupo GPCL+MSCc. Além disso, foi observada maior intensidade na região proximal em comparação ao grupo Sham (Figura 24A e Figura 25A). A análise da imunomarcagem do colágeno tipo IV mostrou incremento na imunomarcagem na região proximal e distal no grupo GPCL+MSCc (Figura 26A).

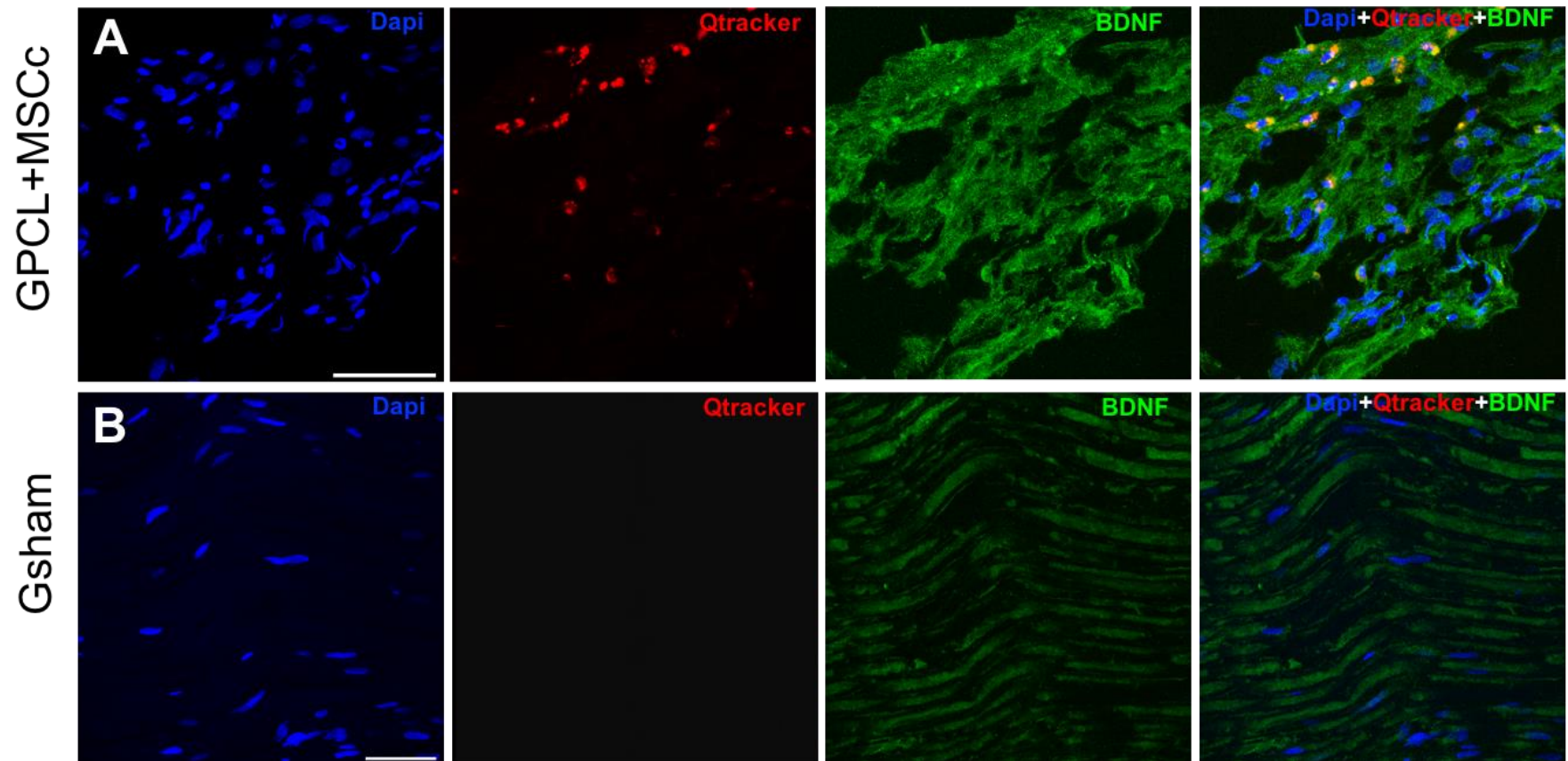


FIGURA 24. Análise qualitativa da imunomarcagem do BDNF no nervo isquiático 30 dias após a lesão. **(A)** Expressão GDNF foi detectada na região proximal (verde). Foi observada a co-localização de células marcadas com Qtracker (vermelho) e núcleos com DAPI, indicando a presença de células vivas dentro da estrutura interna do NGC. **(B)** Expressão do BDNF no grupo Sham. Barra da escala: 25 μ m.

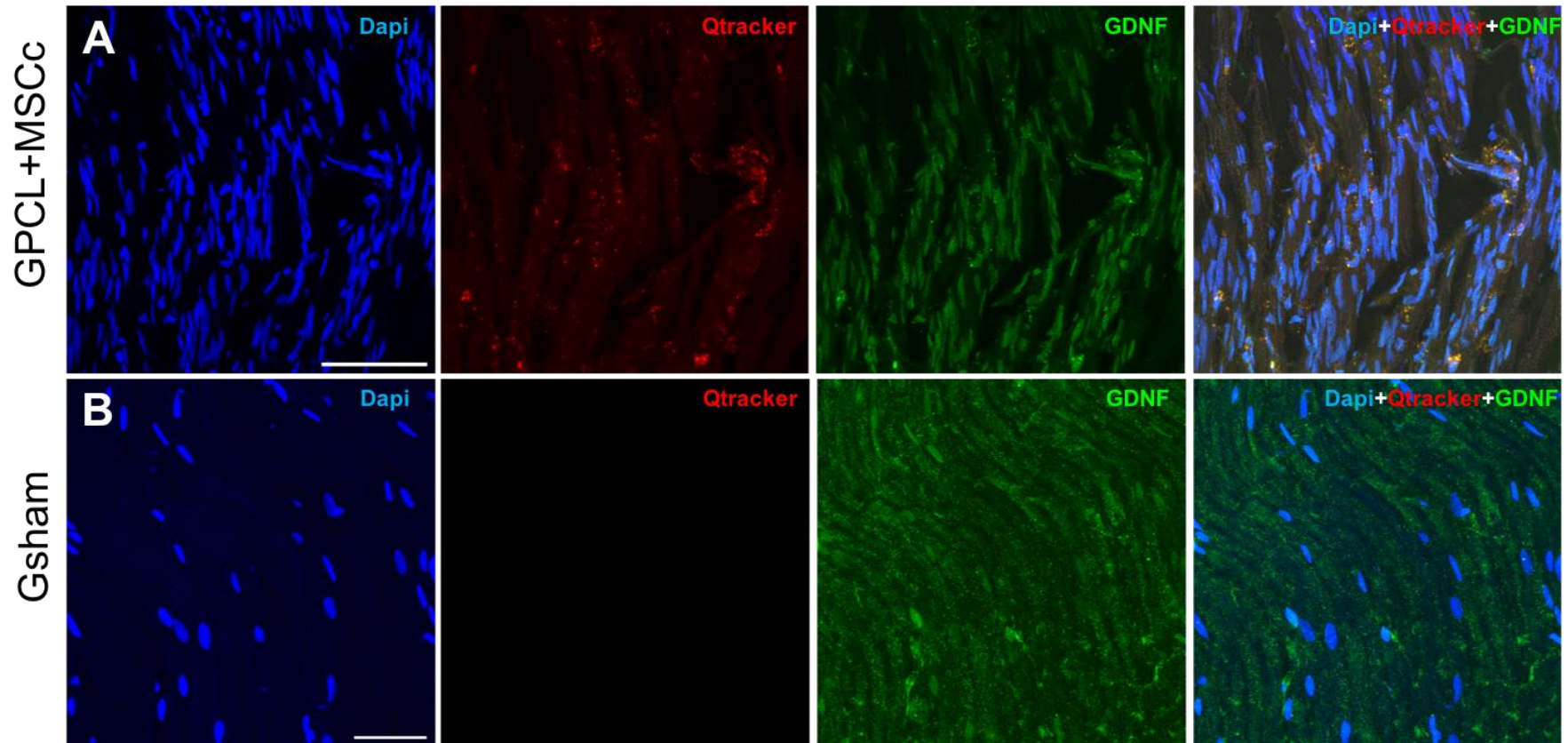


FIGURA 25. Análise qualitativa da imunomarcagem da neurotrofina GDNF no nervo isquiático 30 dias após a lesão. **(A)** Expressão GDNF foi detectada na região proximal (verde). Foi notada a co-localização de células marcadas com Qtracker (vermelho) e núcleos com DAPI, indicando a presença de células vivas dentro da estrutura interna do NGC. **(B)** Expressão do BDNF no Sham. Barra da escala: 25 μ m.

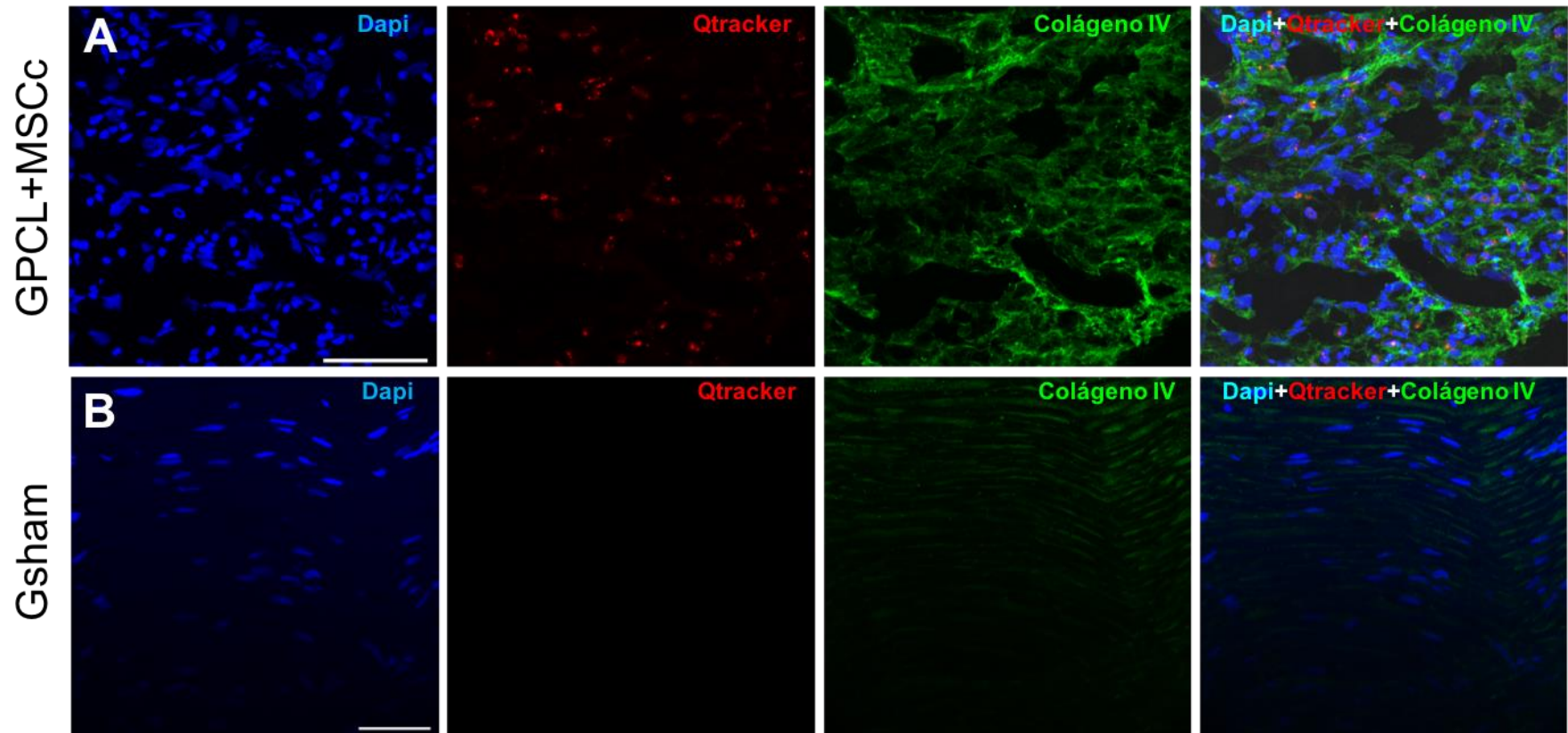


FIGURA 26. Análise qualitativa da imunomarcação do colágeno tipo IV no nervo isquiático 30 dias após a lesão. **(A)** Expressão do colágeno IV na região proximal (verde). Foram observadas células vivas marcadas com Qtracker (vermelho) entre a rede de colágeno na região interna do NGC. **(B)** Expressão do colágeno IV no Sham. Barra da escala: 25 μ m.

6.2.9 Os NGC funcionalizados com AdMSC evidenciaram *up-regulation* de BDNF, GDNF e HGF na medula espinhal lombossacral

A expressão de transcritos para o BDNF, GDNF e HGF foi avaliada 30 dias após o reparo no grupo Sham e GPCL+MSCc. Os fatores neurotróficos BDNF, GDNF e HGF foram significativamente aumentados no grupo GPCL+MSCc quando comparado ao grupo Sham (BDNF; $p=0.006$) (GDNF; $p=0.04$) (HGF: $p=0.04$) (Figura 27A-C). Porém, não foram observadas como não observaram diferenças significativas na expressão de IL-10 e IL-6 no grupo PCL+MSCc quando comparado ao grupo Sham ($p > 0.05$) (Figura 27D e E).

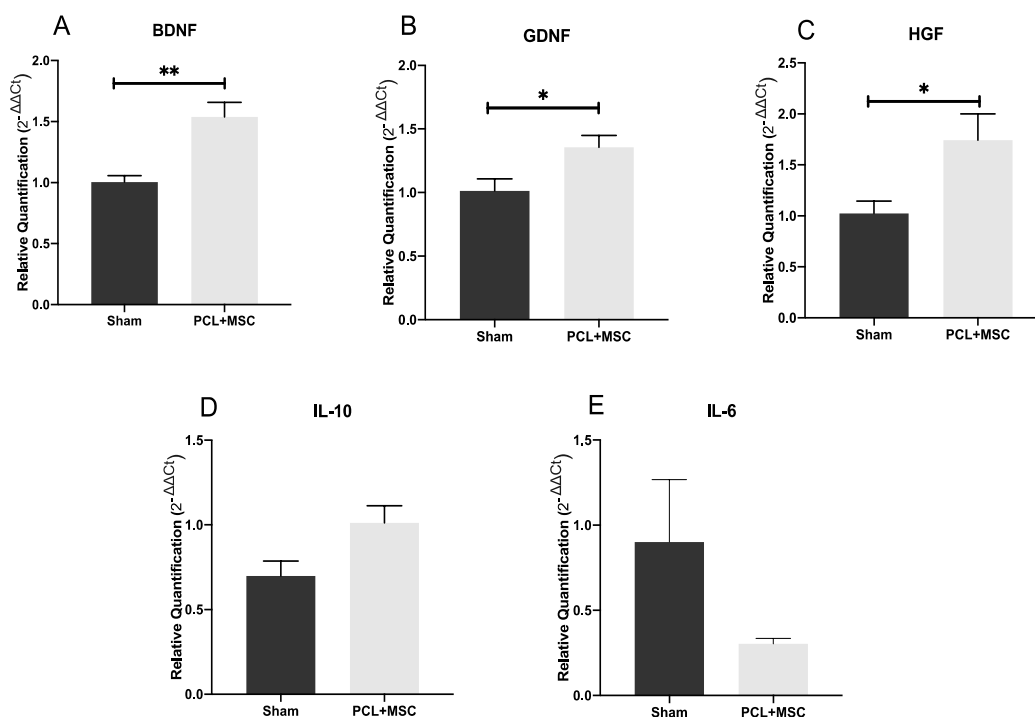


FIGURA 27. Expressão relativa dos genes BDNF, GDNF, HGF e IL-10 na medula espinhal ipsilateral à lesão 30 dias após o reparo nos grupos Sham e GPCL+MSCc. **(A)** BDNF, **(B)** GDNF, **(C)** HGF, **(D)**, IL-10 e **(E)**, IL-6. Os valores da expressão relativa entre grupos foram representados como média $\pm$ SEM. $p > 0.05$; $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

7 DISCUSSÃO

A capacidade regenerativa do SNP é baixa em lesões com *long-gaps* e existem limitações associadas à técnica do autoenxerto (RAY; MACKINNON, 2010; SCHEIB; HÖKE, 2013). A possibilidade do aumento da regeneração nervosa por aplicação exógena de fatores tróficos solúveis para foi abordada em estudos, entretanto, há limitações relacionadas à meia-vida biológica curta, tolerância, alto custo e vazamento após a aplicação na superfície interna de NGC (KLIMASCHEWSKI; HAUSOTT; ANGELOV, 2013; FADIA et al., 2020; TAJDARAN et al., 2019). Para superar tais limitações, estudos indicam que MSC secretam uma mistura complexa de fatores que são capazes de promover a mielinização, regeneração das fibras nervosas, neuroproteção, angiogênese e modulação do ambiente inflamatório (LOPATINA et al., 2011; TOMITA et al., 2012; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

Abordagens de engenharia de tecidos integrando NGC, células e fatores de crescimento que possam imitar o tecido nativo poderiam restaurar o tecido nervoso danificado (DODLA et al., 2019). A impressão 3D tem mostrado potencial no desenvolvimento de NGC com propriedades estruturais biomiméticas (JOHNSON et al., 2015; RAJARAM; CHEN; SCHREYER, 2012b). Nessa perspectiva os NGC deveriam apresentar características como: (1) força mecânica, degradação controlada e flexibilidade; (2) modulação em 3D do ambiente celular; (3) porosidade para permitir a difusão de moléculas; (4) suporte da adesão celular, alongamento axonal e revascularização; (5) baixa imunogenicidade (DODLA et al., 2019; NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012). A maioria de NGC disponíveis no mercado baseados em biomateriais apresentam arquitetura simples mostrando recuperação estrutural e funcional inferior a técnica de autoenxerto (KONOFAOS; VER HALEN, 2013; MOORE et al., 2009; RAY; MACKINNON, 2010), o que estimula o desenvolvimento de NGC (DE RUITER et al., 2009; DODLA et al., 2019).

O polímero PCL tem sido utilizado para fabricar NGC com estruturas porosas ou fibrosas ultrafinas pelo método de fundição com solvente (REID et al., 2013), *eletrospun* (YU et al., 2011), reticulação polimérica (*crosslinking*) (MORODER et al., 2011; SUN et al., 2010; WANG; CAI, 2010). Neste estudo foi avaliada a capacidade neurogenerativa utilizando NGC DE PCL fabricados por impressão 3D e funcionalizados com AdMSC de rato ou de cão em lesão experimental crítica de nervo isquiático em ratos.

7.1 Experimento 1

Neste estudo, as AdMSC de rato foram caracterizadas de acordo aos critérios mínimos propostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular: aderência ao plástico, expressão positiva e ausência de expressão de marcadores específicos CD e capacidade de diferenciação mesodermal (DOMINICI et al., 2006).

Métodos de prototipagem rápida, como impressão 3D FDM para fabricação de NGC, permitem modificações da superfície interna, porosidade, controle de arquitetura e reprodutibilidade (RAJARAM; CHEN; SCHREYER, 2012b). Neste trabalho, foram desenhados NGC e impressos por 3D FDM com arquitetura biomimética, presença de macroporosidade, diâmetro interno adequado e longitude precisa para o tamanho da lesão. Recentemente, foi demonstrado o potencial do uso da impressão 3D usando polímero PCL (LEE et al., 2017b; VIJAYAVENKATARAMAN et al., 2018). Um estudo fabricou NGC em 3D incorporados com NGF e GDNF simulando a bifurcação do nervo isquiático, observando recuperação funcional e histológica 3 meses após o reparo (*gap* 10mm) (JOHNSON et al., 2015). Outro estudo usando NGC de PCL fabricados por impressão 3D observou regeneração sensitiva e motora (*gap* 6 mm) 11 semanas após o reparo nervoso em camundongos, no entanto, não foram realizadas análises morfométricas ou eletrofisiológicas (ZHU et al., 2018).

As propriedades dos NGC de PCL fabricados a partir de malhas impressas em 3D pela técnica de FDM, foram comparáveis aos critérios previamente descritos para a fabricação de NGC (NECTOW; MARRA;

KAPLAN, 2012; VLEGGEERT-LANKAMP et al., 2007). Foi observada espessura da parede, porosidade, arquitetura, diâmetro interno, resistência e rigidez adequados. A porosidade e a espessura da parede podem influenciar na regeneração nervosa permitindo a difusão de nutrientes (NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012). Em lesões nervosas com *long-gaps*, NGC longos com porosidades maiores podem ser necessários para a difusão e troca de nutrientes (DU; JIA, 2019). A presença de macroporos entre 10-230 μm poderiam permitir a neovascularização (DEN DUNNEN et al., 1995). Um estudo evidenciou que a espessura de parede (600 μm) e a porosidade de 80% (tamanho de poro de 10-38 μm) em NGC de PCL foram importantes na manutenção da permeabilidade (KOKAI et al., 2009). Na comparação de NGC de PCL não porosos, microporosos (1-10 μm) e macroporosos (10-230 μm) no modelo de lesão nervosa (*gap* 6 mm) em ratos, foi observada recuperação funcional em presença de microporoso e ausência de recuperação em condutos não porosos (VLEGGEERT-LANKAMP et al., 2007). Por outro lado, há controvérsias se a presença de macroporos permitem a infiltração de tecido conectivo (NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012).

Outra propriedade física dos NGC é a taxa de degradação que deveria ser ajustada de acordo taxa de regeneração nervosa (NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012). Nós observamos ausência de degradação em 8 e 12 semanas após o reparo com NGC. A baixa taxa de degradação do NGC PCL poderia ser uma limitação uma vez que poderia comprimir o nervo após a regeneração. Porém, a velocidade de regeneração varia entre espécies, podendo suportar melhor a regeneração em defeitos longos.

O diâmetro do conduto parece ser relevante para o sucesso da regeneração podendo ser relacionado ao fornecimento e gradientes de concentração de neurotrofinas e a revascularização (NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012). Neste estudo, os NGC foram apresentaram diâmetro interno de ~1.5 mm. Estudos mostram que diâmetros superiores (2 - 3 mm) poderiam permitir o vazamento de moléculas e incrementar a infiltração de tecido conectivo, limitando neovascularização e regeneração (MOORE et al., 2009). Resultados funcionais inferiores foram observados com o uso de NGC de

diâmetros de 2-3 mm após o reparo nervoso em ratos (MOORE et al., 2009; WAITAYAWINYU et al., 2007)

A análise da função locomotora pelo IFNC, IFT e a análise da marcha pelo *Catwalk* são métodos que contribuem na avaliação da recuperação em estudos de regeneração nervosa (BAIN; MACKINNON; HUNTER, 1989; BOZKURT et al., 2011; VAREJÃO et al., 2001). Apesar de o GA apresentar melhores resultados, nós detectamos efeitos positivos na recuperação motora funcional no grupo GPCL+MSCr em 8 e 12 semanas em comparação ao GPCL. O GPCL+MSCr evidenciou incremento no tempo de suporte (*stand*), intensidade máxima de contato, área da impressão e balanço (*swing*). Similarmente, estudos mostraram recuperação motora funcional com o uso de AdMSC autólogas e alogênicas em ratos aplicadas após o reparo nervoso com NGC de PCL em lesões de <10 mm de *gap* (CARTAROZZI et al., 2015; FRATTINI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010). Por outro lado, estudos usando o biomaterial PLA em lesões críticas (>10 mm *gap*) associado às MSC e/ou células de Schwann alogênicas evidenciaram recuperação funcional e eletrofisiológica entre 6-8 semanas, porém, o IFNC e a VCN foram inferiores aos resultados do nosso estudo (DAI; HUANG; HSU, 2013; HSIEH et al., 2016). Outro estudo observou recuperação da VCN em 12 semanas com o uso de MSC aplicadas na superfície interna de aloenxertos de nervo acelular, entretanto, nós observamos valores superiores na VCN (LIU et al., 2011).

Os resultados positivos funcionais e eletrofisiológicos podem estar relacionados aos mediadores parácrinos produzidos pelas AdMSC (ELEUTERI; FIERABRACCI, 2019; NAKAMURA; MIZUNO, 2010; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008). As neurotrofinas são moléculas potentes secretadas pelas AdMSC que por meio de interações complexas com os seus receptores podem criar um microambiente pró-regenerativo com crescimento axonal, proliferação e sobrevivência das células de Schwann e sobrevivência neuronal (BROHLIN et al., 2012; CASEIRO et al., 2016; GU et al., 2010; KINGHAM et al., 2014; LOPATINA et al., 2011; TAKEMURA et al., 2012; TOMITA et al., 2012). Estudos mostram que as MSC alogênicas ou xenogênicas podem estimular as células de Schwann endógenas,

importantes para a ramificação dos axônios (CARTAROZZI et al., 2015; FRATTINI et al., 2012; SANCHEZ et al., 2017; SCHEIB; HÖKE, 2013).

7.2 Experimento 2

As características de linhagem mesenquimal e de multipotencialidade foram observadas nas AdMSC de cão de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006). Embora em medicina veterinária os critérios não estão completamente definidos, nossos achados foram comparáveis a estudos prévios (DE BAKKER et al., 2014; KISIEL et al., 2012; MARTINELLO et al., 2011; VIEIRA et al., 2010).

A resposta inflamatória após o trauma é indispensável para a eliminação da mielina e regeneração axonal, sendo caracterizada pela produção de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ por parte das células de Schwann e macrófagos (BAUER; KERR; PATTERSON, 2007; DEFRANCESCO-LISOWITZ et al., 2015; GILLEN; JANDER; STOLL, 1998; STOLL; MÜLLER, 1999). Neste estudo, as AdMSC expressaram constitutivamente BDNF, GDND, HGF e IL-10. Após a estimulação com IFN- γ , as AdMSC de cão apresentaram *up-regulation* do BDNF, GDNF, HGF e IL-10. No SNP os fatores neurotróficos BDNF e o GDNF estão envolvidos com a formação de sinapses no músculo, sobrevivência neuronal, proliferação das células de Schwann e regeneração axonal (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; WANG et al., 2015). O HGF está associado a angiogênese, aos efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptótico, restauração tecidual, interagindo de forma sinérgica com diversos fatores neurotróficos (KO et al., 2018; NAKAMURA; MIZUNO, 2010; WANG et al., 2015). A IL-10 contribui na restauração tecidual, angiogênese, modulação da resposta inflamatória e regulação da matriz extracelular (ROTSHENKER, 2011; XIAO et al., 2019). Nossos resultados se comparam a estudos prévios, que mostraram incremento na capacidade imunomoduladora de MSC humanas e murinas estimuladas com IFN- γ associado ao incremento na produção de diversos fatores incluindo HGF, IDO, TGF- β e IL-10 (DE WITTE et al., 2016; ENGLISH et al., 2007). Além disso, as MSC incrementaram a expressão do complexo principal de

histocompatibilidade classe I (MHC-I) diminuindo a suscetibilidade a citotoxicidade mediada pelas células natural *killer* (NORONHA et al., 2019).

Em lesões de 10 mm de *gap* a porcentagem de axônios regenerados dentro do NGC é baixa e a retração do nervo pode agravar o *gap* em 1-2 mm após a lesão (NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012; YANNAS; ZHANG; SPILKER, 2007). Lesões críticas refletem melhor o cenário clínico e não são influenciados pela capacidade de regeneração endógena do nervo (NECTOW; MARRA; KAPLAN, 2012). Neste estudo, os NGC de PCL funcionalizados com AdMSC de cão mostraram efeitos positivos na recuperação motora depois da lesão crítica (12 mm *gap*). A avaliação da marcha pelo *Catwalk* mostrou incremento na recuperação motora no GA seguido do GPCL+MSCc. Adicionalmente, os valores do *stand*, *maximum contact area* e *swing* foram superiores na semana 8 nos GPCL+MSCc em comparação ao GPCL (ausência de células + biopolímero de fibrina). Prévios estudos observaram recuperação funcional através do uso de NGC de PCL com MSC alogênicas em lesões traumáticas entre 3-10 mm de *gap* (CARTAROZZI et al., 2015; FRATTINI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010). Adicionalmente, estudos com NGC 3D de silicone em 10 mm de *gap* com geometria bifurcada e complexa mostraram efeitos positivos na recuperação motora, porém, a ausência de degradação do NGC pode ser uma limitação (JOHNSON et al., 2015; ZHU et al., 2018).

A avaliação eletrofisiológica e histológica são técnicas complementares que permitem avaliar a regeneração nervosa. Nós observamos que a VCN foi superior no grupo PCL+MSCc (47,37 m/s) sendo próxima ao GA (55,96 m/s), indicando a presença de axônios mielinizados. Além disso, a análise morfométrica revelou melhora na espessura da mielina no grupo GPCL+MSCc na semana 12. A correlação entre a razão “g” e o diâmetro dos axônios mielinizado mostrou tendência ao incremento de axônios mielinizados de maior tamanho. Diversos estudos mostraram incremento de axônios mielinizados após o uso de MSC dentro de NGC de PCL fabricados por técnicas convencionais em lesões com 5-10 mm de *gap* (CARTAROZZI et al., 2015; FRATTINI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010). Em defeitos de *long-gaps* foi observado incremento na VCN e no número de axônios mielinizados

em 6 semanas usando NGC baseados em polímeros em combinação com MSC ou células de Schwann, entretanto, os valores da VCN foram inferiores quando comparados ao nosso estudo (DAI; HUANG; HSU, 2013; LIU et al., 2011).

A regeneração nervosa é fortemente influenciada pelo microambiente e pela interação de moléculas pró-regenerativas (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012). As neurotrofinas agem seletivamente em receptores trks e P75^{NTR}, expressos nas células de Schwann e nos cones de crescimento no nervo em regeneração (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; BOYD; GORDON, 2003a; SCHEIB; HÖKE, 2013). Neste estudo, a análise da imunomarcação no nervo isquiático 30 dias após o reparo indicou expressão do BDNF, GDNF e o receptor P75^{NTR}, fatores chaves para crescimento e ramificação axonal, proliferação das células de Schwann, mielinização e regeneração do nervo (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; BOYD; GORDON, 2003a). O incremento dos fatores neurotróficos na região proximal do nervo pode estar associado ao incremento na produção destes fatores pelos corpos neuronais da medula espinhal, com consequente transporte anterógrado através dos axônios em regeneração. Nossos resultados são comparáveis aos observados na literatura em que a regeneração do nervo foi frequentemente associada à produção de BDNF e GDNF nas primeiras semanas após o transplante de MSC (KINGHAM et al., 2014; LOPATINA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2015b; RODRIGUES HELL et al., 2009; TAKEMURA et al., 2012; TOMITA et al., 2012). A ligação do BDNF/p75^{NTR} ao invés do Trk, desempenha um mecanismo importante na mielinização (COSGAYA; CHAN; SHOOTER, 2002). O p75^{NTR} pode contribuir para o recrutamento de BDNF no local lesão e incrementar o transporte retrógrado de BDNF, melhorando a mielinização e a regeneração axonal (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; SONG et al., 2006; ZHANG et al., 2000). Estudos anteriores usando NGC de PGA ou PCL (6 e 10 mm de *gap*) em combinação com MSC alogênicas observaram a proliferação de células de Schwann e maior expressão de receptores dos fatores neurotróficos em 2 e 8 semanas, respectivamente (CARTAROZZI et al., 2015; WANG et al., 2009b).

Neste estudo, as AdMSC de cão foram marcadas com *Qtracker* quantum dots 655 antes do transplante e foram observadas em co-localização com BDNF, GDNF e colágeno tipo IV 30 dias após a lesão. O colágeno tipo IV é responsável pela interação entre o crescimento axonal e os fatores neurotróficos na regeneração do sistema nervoso. Um estudo avaliou AdMSC humanas no modelo de lesão de raiz nervosa em ratos, observando incremento na sobrevivência neuronal mediada por BDNF e GDNF com presença de células viáveis em 14 dias (RIBEIRO et al., 2015b). Outro estudo observou a coexpressão de BDNF e MSCs alogênicas positivas para a proteína fluorescente verde (GFP) em 60 dias, sugerindo que essas células permaneceram ativas, influenciando as células de Schwann através da secreção de moléculas bioativas (BISCOLA et al., 2016). Nesse sentido, a associação das células com o biopolímero de fibrina poderia atuar sinergicamente e otimizar o efeito terapêutico na regeneração nervosa. O principal mecanismo do biopolímero de fibrina é associado a capacidade de adesão, suporte celular e retenção das células no local da lesão, impedindo o *homing* e mantendo as células viáveis por um período de tempo maior (GASPAROTTO et al., 2014; SPEJO et al., 2018). Prévios estudos no modelo de avulsão e reimplantação das raízes nervosas ventrais usando o biopolímero de fibrina mostraram a capacidade de suporte celular e regeneração axonal (BARBIZAN et al., 2013). A cooptação término-terminal de lesão neonatal de nervo periférico com biopolímero de fibrina promoveu a neuroproteção e a regeneração dos axônios motores e sensoriais (BISCOLA et al., 2016). Com base nos achados da imunofluorescência, foi confirmada a capacidade de suporte, adesão e manutenção das células mediado pelo biopolímero de fibrina. Além disso, a presença das AdMSC em colocalização com o BDNF, GDNF e associado a expressão do receptor p75^{NTR} indicam que a persistência das células viáveis no local da lesão é crucial para a manutenção dos fatores parácrinos liberados por estas células.

A disfunção e a perda do contato entre os neurônios motores e os músculos pode desencadear excitotoxicidade dos neurônios motores, perda de sinapses, morte de interneurônios e formação de cicatriz glial (SPEJO et al., 2018; SPEJO; OLIVEIRA, 2015). A regulação de vários genes

relacionados à sobrevivência celular e ao crescimento axonal indica mudanças para um estado pró-regenerativo em motoneurônios (SPEJO; OLIVEIRA, 2015). Nós detectamos *up-regulation* do BDNF, GDNF e HGF na medula espinhal no grupo GPCL+MSCc. Prévios estudos não observaram expressão de BDNF nos modelos de lesão medular e do funículo ventral após transplante de MSC de rato e humanas (PARK et al., 2010; ROSADO et al., 2017; SPEJO et al., 2018). No modelo de lesão da raiz ventral o transplante de MSC aumentou a expressão de BDNF, 2 semanas após a lesão (RODRIGUES HELL et al., 2009). Nós assumimos que os fatores pró-regenerativos secretados pelas MSC podem criar um gradiente entre o nervo periférico e os corpos neuronais na medula espinhal, contribuindo para a regeneração nervosa (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; BOYD; GORDON, 2003a). A eficácia terapêutica das MSCs não parece depender completamente da proximidade física das células dentro dos tecidos e tem sido associada aos fatores parácrinos secretados em microvesículas (YOUSEFI et al., 2019; ELEUTERI; FIERABRACCI, 2019). Especificamente os exossomos representam um sistema de comunicação celular carregados com múltiplas moléculas bioativas, como lipídios, proteínas, mRNAs, RNA de transferência, microRNAs e DNA mitocondrial capazes de atravessar barreiras orgânicas e manter a homeostase tissular (YOUSEFI et al., 2019; ELEUTERI; FIERABRACCI, 2019). Exossomos derivados de MSC mostram vantagens relacionadas a capacidade de interação com múltiplos tipos celulares locais ou remotos, ativação de diversas vias de imunorregulação, angiogênese e regulação epigenética em ausência de células e com presença de baixa imunogenicidade (ELEUTERI; FIERABRACCI, 2019). Administrações sistêmicas de exossomos promoveram a angiogênese, recuperação funcional a após a lesão cerebral traumática em ratos e neuroproteção após lesão isquêmica cerebral em camundongos em comparação com a terapia com MSC, mostrando potencial translacional (ELEUTERI; FIERABRACCI, 2019).

As células de Schwann desempenham um papel importante na orientação e organização dos axônios em regeneração (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012; SCHEIB; HÖKE, 2013). Nós observamos marcação

positiva do S-100 no grupo GPCL+MSCc 30 dias após a lesão indicando reatividade das células de Schwann. A recuperação motora funcional e eletrofisiológica podem ser relacionadas ao aumento na proliferação intrínseca das células de Schwann (SONG et al., 2006). A maior expressão de S-100 foi observada em ratos tratados com AdMSC alogênicas e xenogênicas após lesão do nervo periférico (FRATTINI et al., 2012; HU et al., 2013; SANCHEZ et al., 2017; WANG et al., 2009b). Nossos achados foram similares aos reportados previamente, com imunomarcção do S-100 ($3,9 \times 10^7$, 30 dias vs $4,6 \times 10^7$, 60 dias) após o reparo nervoso com NGC de PCL e MSC alogênicas (CARTAROZZI et al., 2015). Estudos observaram a co-expressão de S100 e dos receptores específicos das neurotrofinas (P75^{NTR} e trks) nos modelos de axonotmese e neurotmese experimental do nervo isquiático em ratos após o transplante de MSC (CARTAROZZI et al., 2015; WANG et al., 2009b).

8 CONCLUSÕES

8.1 Experimento 1

O processo de manufatura desenvolvido para impressão 3D de NGC funcionalizados internamente com AdMSC embebidas em biopolímero de fibrina permitiu a obtenção de condutos com arquitetura biomimética, personalizável e de baixo custo. Os NGC funcionalizados com AdMSC murinas apresentaram efeitos positivos na recuperação funcional motora e eletrofisiológica durante 8 e 12 semanas após a lesão crítica nervo isquiático em ratos, mostrando potencial para a regeneração do sistema nervoso periférico. A persistência das AdMSC dentro do NGC, promovida pelo uso do biopolímero de fibrina, contribuíram com o processo de neuroregeneração.

8.2 Experimento 2

O uso de bioengenharia tecidual por meio da manufatura por impressão 3D de NGC funcionalizados internamente com AdMSC caninas embebidas em biopolímero de fibrina mostrou efeitos positivos na recuperação motora funcional e eletrofisiológica em 8 e 12 semanas após a lesão crítica de nervo isquiático em ratos. A abordagem multimodal estimulou a reatividade das células de Schwann e produção de fatores neurotróficos no microambiente do nervo isquiático, além da regulação de genes na medula espinhal associados a sobrevivência neuronal e neuroregeneração durante 4 semanas após o reparo. Os efeitos terapêuticos foram associados ao sinergismo entre capacidade parácrina das AdMSC caninas, as características biomiméticas dos NGCs e a persistência das AdMSC no interior dos NGC promovida pelo arcabouço de biopolímero de fibrina. Embora a abordagem multimodal para as lesões SNP sejam promissoras, mais experimentos são necessários usando diversos parâmetros geométricos de impressão/bioimpressão 3D, abordagens de liberação controlada de fatores solúveis e estimulação celular visando promover ainda mais a neuroregeneração.

9 BIBLIOGRAFIA

AGGARWAL, S. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2005.

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

AMORIM, R. M. et al. Placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells: a promising potential cell-based therapy for canine inflammatory brain disease. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 304, 2020.

ANGIUS, D. et al. A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. **Biomaterials**, v. 33, n. 32, p. 8034–9, 2012.

ARAÚJO, M. R. et al. Transgenic human embryonic stem cells overexpressing FGF2 stimulate neuroprotection following spinal cord ventral root avulsion. **Experimental Neurology**, v. 294, p. 45–57, 2017.

ASPLUND, M. et al. Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. **Neuroepidemiology**, v. 32: p. 217-28, 2009.

AUSTIN, P. J.; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **Journal of Neuroimmunology**, v. 229(1-2), p. 26-50, 2010.

BAIN, J. R.; MACKINNON, S. E.; HUNTER, D. A. Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 83, n. 1, p. 129–136, 1989.

BARBIZAN, R. et al. Motor Recovery and Synaptic Preservation after Ventral Root Avulsion and Repair with a Fibrin Sealant Derived from Snake Venom. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–12, 2013.

BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from crotalus durissus terrificus venom: Applications in medicine. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 12, n. 8, p. 553–571, 2009.

BAUER, S.; KERR, B. J.; PATTERSON, P. H. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8(3), p. 221-32, 2007.

BISCOLA, N. P. et al. Long-standing motor and sensory recovery following acute fibrin sealant based neonatal sciatic nerve repair. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016:9028126.

BISCOLA, N. P. et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–11, 2017.

BOLDYREVA, M. et al. Plasmid-based gene therapy with hepatocyte growth factor stimulates peripheral nerve regeneration after traumatic injury. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, p. 682–690, 2018.

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, n. 4, p. 613–626, 2002.

BOYD, J. G.; GORDON, T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. **Molecular neurobiology**, v. 27, n. 3, p. 277–324, 2003a.

BOZKURT, A. et al. Aspects of static and dynamic motor function in peripheral nerve regeneration: SSI and CatWalk gait analysis. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 1, p. 55–62, 2011.

BROHLIN, M. et al. Aging effect on neurotrophic activity of human mesenchymal stem cells. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45052, 2012.

BROWN, R. A.; PHILLIPS, J. B. Cell Responses to Biomimetic Protein Scaffolds Used in Tissue Repair and Engineering. **International Review of Cytology**, v. 262, n. 07, p. 75–150, 2007.

CAMPBELL, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. **Clinical Neurophysiology**, v. 119, n. 9, p. 1951–1965, 2008.

CARTAROZZI, L. P. et al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. **Brain Research Bulletin**, v. 112, p. 14–24, mar. 2015.

CASEIRO, A. R. et al. Neuromuscular Regeneration: Perspective on the Application of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretion Products. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–16, 2016.

CHAMBERLAIN, G. et al. 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, Z.-L.; YU, W.-M.; STRICKLAND, S. Peripheral regeneration. **Annual review of neuroscience**, v. 30, p. 209–233, 2007.

CHU, T.-H.; WU, W. Neurotrophic Factor Treatment After Spinal Root Avulsion Injury. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, 2011.

COLEMAN, M. Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 889–898, 2005.

CONFORTI, L.; GILLEY, J.; COLEMAN, M. P. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 394–409, 2014.

COSGAYA, J. M.; CHAN, J. R.; SHOOTER, E. M. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. **Science**, v. 298(5596), p.1245–8, 2002.

DAI, L. G.; HUANG, G. S.; HSU, S. H. Sciatic nerve regeneration by cocultured schwann cells and stem cells on microporous nerve conduits. **Cell Transplantation**, v. 22, n. 11, p. 2029–2039, 2013.

DE BAKKER, E. et al. Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives

as therapy for dogs and as a model for man. **The Veterinary quarterly**, v. 2176, n. December 2014, p. 1–9, 2014.

DE CASTRO, M. V. et al. Direct Spinal Ventral Root Repair following Avulsion: Effectiveness of a New Heterologous Fibrin Sealant on Motoneuron Survival and Regeneration. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.

DE RUITER, G. C. W. et al. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. **Neurosurgical Focus**, v. 26, n. 2, p. E5, 2009.

DE RUITER, G. C. W. et al. Misdirection and guidance of regenerating axons after experimental nerve injury and repair. **Journal of Neurosurgery**, v. 120, p. 493–501, 2014.

DE WITTE, S. F. H. et al. Toward development of mesenchymal stem cells for immunomodulatory therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 6, p. 648, 2016.

DEFRANCESCO-LISOWITZ, A. et al. The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. **Neuroscience**, v. 302, p. 174–203, 2015.

DEN DUNNEN, W. F. A. et al. Biological performance of a degradable poly(lactic acid- ϵ -caprolactone) nerve guide: Influence of tube dimensions. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 29(6), p. 757–66, 1995.

DEZAWA, M. et al. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 1771–1776, 2001.

DI SUMMA, P. G. et al. Long-term in vivo regeneration of peripheral nerves through bioengineered nerve grafts. **Neuroscience**, v. 181, p. 278–291, 2011.

DODLA, M. C. et al. Peripheral Nerve Regeneration. In: **Principles of Regenerative Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2019. v. 5p. 1223–1236.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315–317, 2006.

DU, J.; JIA, X. Engineering nerve guidance conduits with three-dimensional bioprinting technology for long gap peripheral nerve regeneration. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 12, p. 2073–2074, 2019.

DUBOVÝ, P.; JANČÁLEK, R.; KUBEK, T. Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. **International review of neurobiology**, v. 108, p. 173–296, 2013.

DUBOVÝ, P.; KLUSÁKOVÁ, I.; HRADILOVÁ SVÍŽENSKÁ, I. Inflammatory profiling of Schwann cells in contact with growing axons distal to nerve injury. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ELEUTERI, S.; FIERABRACCI, A. Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4597, 17 set. 2019.

ENGLISH, K. et al. IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunology Letters**, v. 15, n. 110(2), p. 91-100, 2007.

FADIA, N. B. et al. Long-gap peripheral nerve repair through sustained release of a neurotrophic factor in nonhuman primates. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 527, p. eaav7753, 2020.

FORTERRE, F. et al. Iatrogenic sciatic nerve injury in eighteen dogs and nine cats (1997-2006). **Veterinary Surgery**, v. 36, n. 5, p. 464-471, 2007.

FRATTINI, F. et al. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit promote sciatic nerve regeneration and sensory neuron survival after nerve injury. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 19-20, p. 2030-2039, 2012.

FROSTICK, S. P.; YIN, Q.; KEMP, G. J. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. **Microsurgery**, v. 118(7), p. 397-405, 1998.

FU, S. Y.; GORDON, T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 3886-95, 1995.

GASPAROTTO, V. P. O. et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 5, n. 3, 2014.

GEUNA, S. et al. Tissue engineering and peripheral nerve reconstruction: An overview. **International review of neurobiology**, v. 108, p. 35-57, 2013.

GILLEN, C.; JANDER, S.; STOLL, G. Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system: Comparison between immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration. **Journal of Neuroscience Research**, v. 51, n. 4, p. 489-496, 1998.

GLASS, J. D. Wallerian degeneration as a window to peripheral neuropathy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 220, n. 1-2, p. 123-124, 2004.

GÖLZ, G. et al. The cytokine/neurotrophin axis in peripheral axon outgrowth. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 10, p. 2721-2730, 2006.

GORDON, T.; SULAIMAN, O.; BOYD, J. G. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 8, n. 4, p. 236-250, 2003.

GRIFFIN, J. W. et al. Peripheral Nerve Repair and Reconstruction. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 95, n. 23, p. 2144-2151, 2013.

GRIMOLDI, N. et al. Stem cell salvage of injured peripheral nerve. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 2, p. 213-222, 2015.

GU, Y. et al. Neurotrophic actions of bone marrow stromal cells on primary culture of dorsal root ganglion tissues and neurons. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 40(3), p. 332-41, 2010.

HAUSOTT, B.; KLIMASCHEWSKI, L. Membrane turnover and receptor trafficking in

regenerating axons. **European Journal of Neuroscience**, v. 43(3), p. 309-17, 2016.

HÖKE, A. Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 8, p. 448–454, 2006.

HOOD, B.; LEVENE, H. B.; LEVI, A. D. Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects. **Neurosurgical Focus**, v. 26, n. 2, p. E4, 2009.

HSIEH, S. C. et al. Effect of an epineurial-like biohybrid nerve conduit on nerve regeneration. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 3, p. 559–574, 2016.

HSU, M. N. et al. Adipose-derived stem cell sheets functionalized by hybrid baculovirus for prolonged GDNF expression and improved nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 140, p. 189-200, 2017.

HU, N. et al. 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. **Biomaterials**, v. 34, n. 1, p. 100–11, 2013.

JESURAJ, N. J. et al. A systematic evaluation of Schwann cell injection into acellular cold-preserved nerve grafts. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 30, n. 197(2), p. 209-15, 2011.

JOHNSON, B. N. et al. 3D Printed Anatomical Nerve Regeneration Pathways. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 39, p. 6205–6217, 2015.

KALBERMATTEN, D. F. et al. Fibrin matrix for suspension of regenerative cells in an artificial nerve conduit. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 61, n. 6, p. 669–675, 2008.

KEILHOFF, G.; FANSA, H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration-A real hope or just an empty promise? **Experimental Neurology**, v. 232, n. 2, p. 110–113, 2011.

KINGHAM, P. J. et al. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. **Stem cells and development**, v. 23, n. 7, p. 741–54, 1 abr. 2014.

KINNAIRD, T. et al. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. **Circulation Research**, v. 19, n. 94(5), p. 678-85, 2004.

KISIEL, A. H. et al. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 8, p. 1305–1317, 2012.

KLIMASCHEWSKI, L.; HAUSOTT, B.; ANGELOV, D. N. The pros and cons of growth factors and cytokines in peripheral axon regeneration. **International review of Neurobiology**, v. 108, p. 137-171, 2013.

KO, K. R. et al. Hepatocyte Growth Factor (HGF) Promotes Peripheral Nerve

Regeneration by Activating Repair Schwann Cells. **Scientific Reports**, v. 8(1), p. 8316, 2018.

KOEPPEN, A. H. Wallerian degeneration: history and clinical significance. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 220, n. 1–2, p. 115–117, 2004.

KOKAI, L. E. et al. Diffusion of soluble factors through degradable polymer nerve guides: Controlling manufacturing parameters. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2540–2550, 2009.

KONOFAOS, P.; VER HALEN, J. P. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. **Journal of reconstructive microsurgery**, v. 29, n. 3, p. 149–64, mar. 2013.

KOUYOUMDJIAN, J. A. Peripheral nerve injuries: A retrospective survey of 456 cases. **Muscle and Nerve**, v. 34, n. 6, p. 785–788, 2006.

LANGER, R. S.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: the challenges ahead. **Scientific American**, v. 280, p. 86-89, 1999.

LEE, S.-J. et al. Fabrication of a Highly Aligned Neural Scaffold via a Table Top Stereolithography 3D Printing and Electrospinning. **Tissue Engineering Part A**, v. 23, n. 11–12, p. 491–502, 2017a.

LEE, S. J. et al. Development of novel 3-D printed scaffolds with core-shell nanoparticles for nerve regeneration. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 64, n. 2, p. 408–418, 2017b.

LIN, Y.; HOGAN, W. J. Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment and Prevention of Graft-versus-Host Disease. **Advances in Hematology**, v. 2011, p. 1–17, 2011.

LIU, G. et al. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28(4), p. 565-72, 2011.

LOPATINA, T. et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth De Novo. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.

LOPES-FILHO, J. D. et al. Microscopic evidences that bone marrow mononuclear cell treatment improves sciatic nerve regeneration after neurorrhaphy. **Microscopy Research and Technique**, v. 363, p. 355-63, 2010.

LUNDBORG, G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. **The Journal of Hand Surgery**, v. 25, n. 3, p. 391–414, 2000.

MARTINELLO, T. et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 1, p. 18–24, 2011.

MAURMANN, N. et al. Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. **Biomedical Physics and Engineering Express**, v. 3, n. 4, p. 45005, 2017.

MINNONE, G.; DE BENEDETTI, F.; BRACCI-LAUDIERO, L. NGF and its receptors in the regulation of inflammatory response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 18(5), p.1028, 2017.

MOORE, A. M. et al. Limitations of Conduits in Peripheral Nerve Repairs. **HAND**, v. 4, n. 2, p. 180–186, 2009.

MORODER, P. et al. Material properties and electrical stimulation regimens of polycaprolactone fumarate-polypyrrole scaffolds as potential conductive nerve conduits. **Acta Biomaterialia**, v. 7(3), 944-53, 2011.

MURPHY, P. G. et al. Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 12(6), p. 1891-9, 2000.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 14; n. 11(11), p. 723-37, 2011.

NAKAMURA, T.; MIZUNO, S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. **Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences**, v. 86(6), p. 588-610, 2010.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499–3506, 2007.

NAVARRO, X. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration and target reinnervation in animal models: A critical overview. **European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 3, p. 271–286, 2016.

NAVARRO, X.; VERDÚ, E.; BUTÍ, M. Comparison of Regenerative and Reinnervating Capabilities of Different Functional Types of Nerve Fibers. **Experimental Neurology**, v. 129, n. 2, p. 217–224, 1994.

NECTOW, A. R.; MARRA, K. G.; KAPLAN, D. L. Biomaterials for the Development of Peripheral Nerve Guidance Conduits. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 18, n. 1, p. 40–50, 2012.

NOBLE, J. et al. Analysis of Upper and Lower Extremity Peripheral Nerve Injuries in a Population of Patients with Multiple Injuries. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 45, n. 1, p. 116–122, jul. 1998.

NORONHA, N. D. C. et al. Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 132, 17 dez. 2019.

O'BRIEN, C. M. et al. Three-Dimensional Printing of Nanomaterial Scaffolds for Complex Tissue Regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 21, n. 1, p. 103–114, 2015.

OLIVEIRA, A. L. R.; VIDAL, B. D. C.; LANGONE, F. Naturally Supraorganized Collagen Increases Axonal Regeneration After Tubulization Repair. v. 22, n. 3, p. 143–148, 2005.

OLIVEIRA, J. T. et al. 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, n. 4, p. 1295–303, 2010.

OLIVEIRA, J. T. et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for improving nerve regeneration. **Internatinal review of Neurobiology**, v. 108, p. 59–77, 2013.

PARK, W. B. et al. The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats. **BMC Neuroscience**, v. 16, p.11:119, 2010.

PEDDE, R. D. et al. Emerging Biofabrication Strategies for Engineering Complex Tissue Constructs. **Advanced Materials**, v. 29, n. 19, 2017.

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, n. 11, p. 2896–2902, 2007.

POLACEK, M. et al. The secretory profiles of cultured human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells: Implications for autologous cell transplantation strategies. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 9, p. 1381–1393, 2011.

POLCHERT, D. et al. IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 6, p. 1745–1755, 2008.

RAJARAM, A.; CHEN, X.-B.; SCHREYER, D. J. Strategic Design and Recent Fabrication Techniques for Bioengineered Tissue Scaffolds to Improve Peripheral Nerve Regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 18, n. 6, p. 454–467, 2012.

RAY, W. Z.; MACKINNON, S. E. Management of nerve gaps: Autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. **Experimental Neurology**, v. 223, n. 1, p. 77–85, 2010.

REID, A. J. et al. Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis. **Neuroscience**, v. 199, p. 515–522, 2011.

REID, A. J. et al. Long term peripheral nerve regeneration using a novel PCL nerve conduit. **Neuroscience Letters**, v. 544, p. 125–130, 2013.

REN, G. et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 2(2), p.141–50, 2008.

RIBEIRO, J. et al. Evaluation of biodegradable electric conductive tube-guides and mesenchymal stem cells. **World journal of stem cells**, v. 7, n. 6, p. 956–75, 2015a.

RIBEIRO, T. B. et al. Neuroprotection and immunomodulation by xenografted human mesenchymal stem cells following spinal cord ventral root avulsion. **Scientific Reports**, v. 5, n. November 2014, p. 1–12, 2015b.

RODRIGUES HELL, R. C. et al. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root

avulsion. **Neurobiology of Disease**, v. 33, n. 2, p. 290–300, 2009.

ROSADO, I. R. et al. Immunomodulatory and neuroprotective effect of cryopreserved allogeneic mesenchymal stem cells on spinal cord injury in rats. **Genetics and Molecular Research**, 2017.

ROTSCHENKER, S. Wallerian degeneration: The innate-immune response to traumatic nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 30, n. 8, p.109, 2011.

SALTZMAN, E. B. et al. A Comparison Between Two Collagen Nerve Conduits and Nerve Autograft: A Rat Model of Motor Nerve Regeneration. **Journal of Hand Surgery**, v. 44(8), p. 700.e1-700.e9, 2019.

SANCHEZ, D. N. R. et al. Effects of Canine and Murine Mesenchymal Stromal Cell Transplantation on Peripheral Nerve Regeneration. **International Journal of Stem Cells**, p. 1–10, 30, 2017.

SCHEIB, J.; HÖKE, A. Advances in peripheral nerve regeneration. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 12, p. 668–676, 2013.

SONG, X. Y. et al. Knockout of p75NTR impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 3, p. 833–842, 2006.

SPEJO, A. B. et al. Neuroprotection and immunomodulation following intraspinal axotomy of motoneurons by treatment with adult mesenchymal stem cells. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2018.

SPEJO, A. B.; OLIVEIRA, A. L. R. Synaptic rearrangement following axonal injury: Old and new players. **Neuropharmacology**, v. 96, n. PA, p. 113–123, 2015.

STOLL, G.; MÜLLER, H. W. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. **Brain pathology**, v. 9, n. 2, p. 313–25, 1999.

STRATTON, S. et al. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 1, n. 2, p. 93–108, 2016.

SULAIMAN, O. A. R.; GORDON, T. Role of Chronic Schwann Cell Denervation in Poor Functional Recovery After Nerve Injuries and Experimental Strategies To Combat It. **Neurosurgery**, v. 65, p. A105–A114, 2009.

SUN, M. et al. In vitro and in vivo testing of novel ultrathin PCL and PCL/PLA blend films as peripheral nerve conduit. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 93, n. 4, p. 1470–1481, 2010.

TAJDARAN, K. et al. Matrices, scaffolds, and carriers for protein and molecule delivery in peripheral nerve regeneration. **Experimental Neurology**, v. 319, p. 1–16, 2019.

TAKEMURA, Y. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor from Bone Marrow-Derived Cells Promotes Post-Injury Repair of Peripheral Nerve. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 4–11, 2012.

TASKINEN, H. S. et al. Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN- γ , IL-10 and TNF- α mRNA. **Journal of Neuroimmunology**, v. 3, n. 102(1), p. 17–25, 2000.

TAYLOR, C. A. et al. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 87(5), p. 381-5, 2008.

TOFARIS, G. K. et al. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **Journal of Neuroscience**, v. 1, n. 22, p.6696-703, 2002.

TOMITA, K. et al. Differentiated adipose-derived stem cells promote myelination and enhance functional recovery in a rat model of chronic denervation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, n. 7, p. 1392–1402, 2012.

TYNER, T. R. et al. Effects of collagen nerve guide on neuroma formation and neuropathic pain in a rat model. v. 193, p. 6–11, 2007.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726–736, set. 2008.

VALERO-CABRÉ, A.; NAVARRO, X. H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair. **Brain Research**, v. 919, n. 2, p. 302–312, 2001.

VAN SOENS, I. et al. Magnetic stimulation of the radial nerve in dogs and cats with brachial plexus trauma: A report of 53 cases. **Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 108–113, 2009.

VAREJÃO, A S. et al. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. **Journal of neuroscience methods**, v. 108, n. 1, p. 1–9, 2001.

VIEIRA, N. M. et al. Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 279–289, 1 mar. 2010.

VIGO, T. et al. IFN β enhances mesenchymal stromal (Stem) cells immunomodulatory function through STAT1-3 activation and mTOR-associated promotion of glucose metabolism. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 2, 2019.

VIJAYAVENKATARAMAN, S. et al. Electrohydrodynamic Jet 3D Printed Nerve Guide Conduits (NGCs) for peripheral Nerve Injury Repair. **Polymers**, v. 10, n. 7, p. 1–26, 2018.

VLEGGEERT-LANKAMP, C. L. A. M. et al. Pores in synthetic nerve conduits are beneficial to regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 80A, n. 4, p. 965–982, 15 mar. 2007.

WAITAYAWINYU, T. et al. A Comparison of Polyglycolic Acid Versus Type 1 Collagen Bioabsorbable Nerve Conduits in a Rat Model: An Alternative to Autografting. **Journal of Hand Surgery**, v. 32(10), p.1521-9, 2007.

WANG, A. et al. Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 4, n. 6, p. 659–669, 2015.

WANG, G. et al. Preparation of cross-linked carboxymethyl chitosan for repairing

sciatic nerve injury in rats. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 1, p. 59–66, 2009a.

WANG, J. et al. 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, 25 mar. 2009b.

WANG, S.; CAI, L. Polymers for fabricating nerve conduits. **International Journal of Polymer Science**, v. 2010, 2010.

WU, R. et al. Evaluation of artificial nerve conduit and autografts in peripheral nerve repair in the rat model of sciatic nerve injury. **Neurological Research**, v. 38, n. 5, p. 461–466, 2016.

XIAO, S. et al. IL-10 Gene-modified human amniotic mesenchymal stem cells augment regenerative wound healing by multiple synergistic effects. **Stem Cells International**, v. 2019, 2019.

YANNAS, I. V.; ZHANG, M.; SPILKER, M. H. Standardized criterion to analyze and directly compare various materials and models for peripheral nerve regeneration. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 18, n. 8, p. 943–966, 2007.

YAO, M. et al. Repair of rat sciatic nerve defects by using allogeneic bone marrow mononuclear cells combined with chitosan/silk fibroin scaffold. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 5, p. 983–993, 2016.

YOUSEFI, F. et al. Novel approaches using mesenchymal stem cells for curing peripheral nerve injuries. **Life Sciences**, v. 221, p. 99–108, 2019.

YU, W. et al. Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(ϵ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate. **BMC Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 68, 2011.

ZHANG, J. Y. et al. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. **European Journal of Neuroscience**, 2000.

ZHANG, Y. et al. A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 20, p. 5312–24, jul. 2010.

ZHU, W. et al. Rapid continuous 3D printing of customizable peripheral nerve guidance conduits. **Materials Today**, v. 21, n. 9, p. 951–959, nov. 2018.

10 TRABALHO CIENTÍFICO A SER ENVIADO PARA A REVISTA “*STEM CELL RESEARCH AND THERAPY*”.

3D-printed nerve guidance conduits functionalized with canine multipotent mesenchymal stromal cells promote neuroregeneration after sciatic nerve injury in rats

Sánchez DNR¹, Pinto GBA¹, Cartarozzi LP², de Oliveira ALR², Bovolato AC³, de Carvalho M¹, da Silva JVL⁴, Dernowsek JA⁴, Golim MA⁵, Barraviera B⁶, Ferreira RS⁶, Deffune E³, Bertanha M³, Amorim RM¹.

¹Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, 18618-681-Botucatu, SP, Brazil.

²Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

³Blood Transfusion Center, Cell Engineering Laboratory, Botucatu Medical School, São Paulo State University 18618-687-Botucatu, SP, Brazil.

⁴Information Technology Center Renato Archer (CTI), Division of Three-dimensional Technologies, Campinas, SP, Brazil.

⁵Hemocenter division of Botucatu Medical School, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

⁶Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author

E-mail address of authors:

*Corresponding Author: Rogério Martins Amorim. Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Prof Doutor Walter Mauricio Correia Street, UNESP Campus de Botucatu, 18618-681-Botucatu, SP, Brazil. Fax: +55 1438152343. E-mail address: rogerio.amorim@unesp.br

Abstract

Background: Nerve injuries are debilitating, leading to long-term motor deficits. Remyelination and axonal growth are supported and enhanced by growth factor and cytokines. The combination of nerve guidance conduits (NGCs) with adipose-tissue-derived multipotent mesenchymal stromal cells (AdMSCs) is a promising strategy for nerve regeneration.

Methods: 3D printed polycaprolactone (PCL)-NGCs were fabricated. Wistar rats subjected to critical sciatic nerve damage (12-mm gap) were divided into sham, autograft, PCL (empty NGC), and PCL+MSC (NGC multi-functionalized with 10^6 canine AdMSC embedded in fibrin biopolymer) groups. *In vitro*, the cells were characterized and directly stimulated with interferon-gamma to evaluate their neuroregeneration potential. *In vivo*, the sciatic and tibial functional indices were evaluated for 12 weeks. Gait analysis and nerve conduction velocity were analyzed after 8 and 12 weeks. Morphometric analysis was performed after 8 and 12 weeks following lesion development. Real-time PCR was performed to evaluate the neurotrophic factors BDNF, GDNF, and HGF, and the cytokines IL-6 and IL-10. Immunohistochemical analysis for the p75^{NTR} neurotrophic receptor, S100, and neurofilament was performed with the sciatic nerve.

Results: The inflammatory environment *in vitro* increased the expression of neurotrophins BDNF, GDNF, HGF, and IL-10 in canine AdMSCs. Nerve guidance conduits multi-functionalized with canine AdMSCs embedded in fibrin biopolymer improved functional motor and electrophysiological recovery compared with PCL group after 12 weeks. However, the results were not significantly different than those obtained using autografts. These findings were associated with a shift in the regeneration process towards the formation of myelinated fibers. Increased immunostaining of BDNF, GDNF, and growth factor receptor p75^{NTR} was associated with the upregulation of BDNF, GDNF, and HGF in the spinal cord of the PCL+MSC group. A trend demonstrating higher reactivity of Schwann cells and axonal branching in the sciatic nerve was observed, and canine AdMSCs were engrafted at 30 days following repair.

Conclusions: 3D-printed NGCs multi-functionalized with canine AdMSCs embedded in fibrin biopolymer exerted neuroregenerative effects. Our multimodal approach, support the trophic microenvironment, resulting in a pro-regenerative state after critical sciatic nerve injury in rats.

Keywords: canine mesenchymal stem cells, nerve regeneration, sciatic nerve injury, cell-based therapy, myelin sheath, tissue engineering, nerve guidance conduits, 3D printing

Background

The peripheral nervous system (PNS) injuries are debilitating, which result in long-term sensorimotor defects, leading to a negative impact in quality of life [1,2]. In dogs, injuries of brachial plexus or sciatic nerve are more common [2–4]. In human, PNS injury incidence rate was 13.9 individuals per 100,000 inhabitants per year and approximately 2–5% of patients admitted to level I trauma centers might have PNS injuries [5,6]. Complete regeneration of nerves does not occur in critical lesions with long gaps (>5 mm in rats and 2 to 3 cm in humans), and direct anastomosis is not possible without producing tension [7,8]. The distal segment in lesions with long-gap defects does not respond to trophic support from proximal segment, resulting in poor nerve regrowth [9]. This regenerative response is associated with a complex interaction between the Wallerian degeneration process, immunological response, Schwann cells, and proregenerative molecules such as neurotrophic factors and cytokines [9]. Autografting is the current standard treatment for nerve injuries resulting in long-gap defects [10]. However, this procedure has disadvantages such as the requirement of additional surgery, additional damage to donor nerves, and insufficient revascularization [10]. These limitations have directed the development of nerve guidance channels (NGCs) for nerve repair to support vascularization and increase the concentration of trophic factors [11,12].

Types of NGCs, synthetic (e.g., polyglycolic acid [PGA], and polycaprolactone [PCL]) and biological (e.g., veins, arteries, or collagen) have been studied. However, the functional results of such channels were not superior to those of autograft in long-gap defects [10,13–17]. Typically, conventional fabrication techniques can only result in the development of NGCs with simple architectures and dimensions [18]. Inferior results obtained using hollow NGCs were associated with the insufficient migration of Schwann cells and lack of proregenerative molecules [19].

Three-dimensional (3D) printing is a robotics-based biomanufacturing approach used for the development of biocompatible tissue repair constructs [20,21]. Additive manufacturing involving the fabrication of specifically designed 3D constructs offers the control of architecture using biocompatible polymers [18]. NGCs manufactured by 3D printing vary in complexity and size [21–23]. The advantages of 3D printing over conventional methods include mechanical stability, pore interconnectivity, customizability, and adaptability to polymers [18,23].

Polycaprolactone (PCL) is a thermoplastic, non-toxic, biodegradable, and hydrophobic polymer widely used as a scaffold biomaterial *in vivo* and can be adapted to 3D printing [11,24–27]. *In vitro*, PCL proved to be an adequate substrate for the survival and differentiation of Schwann cells, mesenchymal stromal cells (MSC), and fibroblasts [27,28]

The interactions of NGCs, extracellular matrix, cells, and growth factors could be potential tools for restoring damaged nerve tissue [11,12]. The efficiency of Schwann cells has been demonstrated; however, certain limitations are associated, including isolation and expansion under *ex vivo* conditions [29]. Due to their easy accessibility AdMSCs exhibit the potential to translate [30–33]. Previous studies have demonstrated the potential to secrete powerful neurotrophic factors as well as anti-inflammatory and immunomodulatory molecules, thereby favoring the development of a microenvironment to support the growth of axons, Schwann cell proliferation, remyelination, and angiogenesis [30,34–36].

The paracrine activity of AdMSCs is dependent on the viability, and the capacity of engraftment into the local inflammatory microenvironment [31,37]. In our study, a scaffold composed of fibrin biopolymer was used as vehicle to maintain AdMSCs and for improving their therapeutic potential as have shown on the spinal cord and nerve root injuries [38–41]. We hypothesized that the functionalization of PCL-NGCs manufactured by 3D printing with canine AdMSCs influences nerve regeneration following the repair of critical nerve injury in rats.

Methods

Experimental design

Female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with weights in the range of 200–300 g were used for experimental procedures. The rats were maintained under controlled humidity, temperature, and light/dark cycle. All procedures were performed in accordance with the ethical principles set forth by the National Council of Animal Experimentation (CONCEA) and with the approval of the Ethics Committee in Animal Experimentation of São Paulo State University (CEUA/FMB, UNESP, protocol no. 1243–2017). The animals were divided into four groups. In the sham (n = 5) group, the sciatic nerve was surgically exposed without any changes. The proximal and distal segments were resected, forming a gap of 12 mm, and resutured in the autograft group

(n = 5). In the PCL group, a gap of 12 mm was formed with nerve resection, and a hollow NGC was fixed (n = 5). In the PCL+MSC – group, a gap of 12 mm was formed with nerve resection, and NGC was fixed and functionalized with AdMSCs (n = 5). Sciatic functional index (SFI) and tibial functional index (TFI) were evaluated *in vivo* for 12 weeks after injury. Gait analysis was evaluated using the CatWalk system and nerve conduction velocity (NCV) were measured at 8 and 12 weeks. Morphometric analysis was performed after 8- and 12-weeks post injury. To evaluate the production of neurotrophic factors and cytokines in the spinal cord, real-time PCR (RT-qPCR) was performed along with the immunohistochemical analysis of the sciatic nerve in both sham and PCL+MSC groups (n = 3).

Isolation, differentiation, and characterization of canine AdMSCs

Subcutaneous canine adipose tissue was obtained from healthy young dogs following a previously published protocol [42]. Adipose tissue was digested in 0.04% type 1A collagenase (1 mg/mL, Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil) for 1 hour at 37°C with gentle shaking. Digested tissue was blocked, centrifuged, and filtered (BD falcon cell strainer, 70 µm, San Jose, CA, USA). Canine AdMSCs were isolated based on their inherent property of plastic adherence in culture media containing 90% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL) (all from Gibco, Grand Island, NY, USA). The cellular expansion was continued until the third passage, and the cells were cryopreserved to induce differentiation and perform immunophenotypic analysis and transplantation.

Canine AdMSCs were tested for their ability to differentiate into lineages of adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes using StemPro differentiation kits (Gibco, Grand Island, NY, USA) following the manufacturer's recommendations. The cells were fixed in paraformaldehyde (4%, pH 7.34) 2 weeks following stimulation, and the evaluation of osteogenic and adipogenic differentiation was performed using histological stains, Alizarin red (2%, pH 4.2) and Oil red (0.5% in isopropanol) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MA, USA), respectively. Three weeks after chondrogenic differentiation, the cells cultured in micromass were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin-eosin. Samples were

analyzed and photographed under an inverted light microscope using LAS 4.0 software (DM IRB; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Canine AdMSCs were characterized by the presence of the surface marker CD90 or absence of surface markers CD45, CD34, and CD71 [43,44]. The concentration of cells in third passage were counted and adjusted to 10^5 cells. Subsequently, the cells were incubated with a primary conjugated antibody with CD 90-PERCP (BD Pharmigen™, San Diego, CA, USA) and CD 71-FITC (BD Pharmigen™) along with CD 45-PE (BD Pharmigen™) and CD 34-FITC (BD Pharmigen™) for 30 min at room temperature. Cells were washed with phosphate buffer solution and analyzed with a flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson Company, San Jose, CA, USA). Cells incubated without primary antibodies were used as controls for verifying autofluorescence. Non-labeled cells were fixed and used to generate a graph analyzing size versus granularity and establish the cell population to be analyzed. Data were analyzed using Cell Quest Pro software (Becton Dickinson Company, San Jose, CA, USA).

Stimulation of Canine Ad-MCSs with interferon-gamma

Canine AdMSCs were activated via direct stimulation to evaluate neurotrophic and anti-inflammatory proprieties using a recombinant inflammatory mediator relevant in nerve injury, following described protocol [45]. Cells were stimulated with canine interferon-gamma (IFN- γ) in third passage. Triplicates were obtained with 2.10^5 cells/cm² per well in a 24-well plate (costar®, TC-treated, Corning, NY, USA). Subsequently, cells were stimulated with 0.75 mL of basal medium containing IFN- γ (50 ng/mL, IFN- γ canine recombinant; Kingfisher Biotech, Saint Paul, USA) during 96 hours. At this point, the cells were collected using TRIzol reagent (TRIzol™; Invitrogen, São Paulo, Brazil) and stored at -80°C for RNA extraction and analysis of gene expression. For control, cells were cultured in basal culture medium containing DMEM and 10% FBS (all from Gibco).

Gene expression of neurotrophic (BDNF, GDNF and HGF) and anti-inflammatory molecules (IL-10) were quantified. Cells were lysed and homogenized with Trizol reagent, and RNA extraction was performed using the Mini RNAeasy kit (Qiagen, São Paulo, Brazil). The RNA was quantified by spectrophotometry using NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA). The absorbance

ratios were determined to be 260/280 and 260/230. cDNA was synthesized using High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, USA), followed by amplification using Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific). The cDNA samples were cryopreserved and used as templates for PCR reactions.

The reactions were performed in triplicate, using the cDNA produced in previous steps as a template, with PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania), RNA-free water, and canine primers (all of Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil) (Additional file 1: Table S1). The samples were tested with two reference genes, namely, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*). The qPCR reaction was performed with QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System thermocycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with the following parameters: 50°C for 2 min, 95°C for 2 min, and 45 cycles of 95°C for 1 s and 60°C for 30 min. The relative quantification of expression of the genes of interest was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method [46].

Fabrication and assembly of NGCs

NGCs were assembled with PCL membranes. Membranes were fabricated by filament deposition modeling (FDM) technology using 3Dprinter FAB@CTI (Renato Archer CTI; Information Technology Center, São Paulo, Brazil) [47]. Previously, filament extrusion head was adapted to different diameters and melting temperatures for thermoplastic polymers [48]. Previous studies have evaluated interactions between MSCs and 3D-printed PCL matrices [49]. The printing parameters were defined using the FAB@Home software (Information Technology Center Renato Archer, São Paulo, Brazil). The following parameters were set: jog speed 2,400 Hz, deposition rate 0.07, path speed 8.8 mm/s, path width 0.3 mm, path height 0.3 mm, and temperature of 80°C. The 3D-printed membranes were sputter-coated with gold (MED 010; Balterz Union) and visualized using a scanning electron microscope (ESEM Quanta 200; Fei Company, Oregon, USA). The geometric parameters were evaluated using image analysis software (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda). During the assembly of NGCs, membranes were wrapped around a 1.5-mm support and sealed

with controlled heating. The NGCs were sterilized by washing with 70% ethanol solution for 10 s, followed by washing with distilled water. After drying at room temperature, the NGCs were subjected to UV irradiation (200–280 nm) for 2 hours.

Experimental injury and repair with NGCs combined with canine AdMSCs

Sciatic nerve experimental injury was induced in rats under anesthesia with isoflurane (Isoforine®; Cristalia, São Paulo, Brazil) using a microsurgical microscope (DF vasconcelos, São Paulo, Brazil). The experimental lesion consisted of a gap of 12 mm, which is considered to be above the experimental critical level in rats [50]. In the sham group, the nerves were exposed without modifications. In the autograft group, was induce a gap of 12 mm and resutured with perineural stitches (9/0 nylon; Shalon, Brazil). In the PCL group, nerve stumps were introduced and fixed 1 mm into the NGC (9/0 nylon; Shalon). In the PCL+MSC group, nerve stumps were introduced and fixed 1 mm into the NGC (9/0 nylon; Shalon). Thereafter, NGCs were functionalized with 1×10^6 canine AdMSCs embedded in fibrin biopolymer (Stated in patents BR1020140114327 and BR1020140114360, Center for the Study of Venoms and Venomous Animals, CEVAP, São Paulo, Brazil). The fibrin biopolymer has been previously tested as a cell scaffold [51].

Fibrin polymerizes rapidly following the mixing of three components, namely, fibrinogen, 25 mM calcium chloride, and thrombin-like protein [52]. First, the cell solution containing fibrinogen was prepared by mixing 10^6 AdMSCs and 25 μ L of fibrinogen. In the PCL+MSC group, NGC was loaded slowly and homogeneously with fibrinogen + cell solution using a microsyringe (50 μ L, 22s-gauge, point style 2; Hamilton, Nevada, USA). Subsequently, 25 μ L of thrombin solution was administered, resulting in a final suspension with a volume of 50 μ L. This process allowed the formation of a homogeneous cell/fibrinogen suspension into NGC, which was microcoagulated after contact with thrombin within the NGC. Following surgical procedures, musculature was co-opted in layers. Rats were administered with tramadol during intraoperative (20 mg/kg) and postoperative periods (2.5 mg/day in water for 5 days).

Sciatic and tibial nerve functional indices

Functional indices were evaluated preoperatively and weekly during the 12-week in sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups. The rats walked with standard walk trace on a sheet of white paper where the footprints were recorded. Subsequently, the distance was measured between the third toe and the hind limb pads (print length, PL), the first and the fifth toes (toe spread, TS), and the second and the fourth toes (intermediary toe spread, ITS). These parameters were evaluated with the right (lesioned) and left (unlesioned) hind limbs, and the values were calculated using the following formulas described by Bain et al., 1989 [53]: Sciatic functional index: $-38.3 ([EPL-NPL]/NPL) + 109.5 ([ETS-NTS]/NTS) + 13.3 ([EIT-NIT]/NIT) - 8.8$ (30, 31); IFP = $174.9 (EPL-NPL/NPL) + 80.3 (ETS-NTS/NTS) - 13.4$; Tibial functional index: $-37.2 ([EPL-NPL]/NPL) + 104.4 ([ETS-NTS]/NTS) + 45.6 ([EIT-NIT]/NIT) - 8.8$. Sciatic and tibial functional indices equal to -100 indicated total impairment of the sciatic and the posterior tibial nerves, whereas values oscillating around 0 reflected a normal function of the three nerves. The mean $\pm$ SEM was calculated with three gait cycles for each experimental group each week.

Gait analysis

Functional locomotor recovery was evaluated using Catwalk System (Noldus, Wageningen, Netherlands). Catwalk analysis was performed preoperatively and after 8 and 12 weeks in sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups. The CatWalk walkway consisted of a glass roof (100 $\times$ 15 $\times$ 0.6 cm). Rats were placed on the CatWalk walkway and allowed to walk freely. The contact areas were captured by a high-speed video camera positioned underneath the glass plate connected to a computer running Catwalk software v10.5 (Noldus). The camera was calibrated, and the signals were digitized, frame by frame, by the PCImage-SG video card (Matrix vision GmH, Oppenheimer, Germany) and sent to the matrix for classification. Three runs were performed and classified by each animal, and the ipsilateral (left) /contralateral (right) ratio was obtained with the parameters evaluated for each animal at each time point. The following parameters were recorded: stand time (s), maximum contact area (cm²), maximum contact intensity, swing speed (m/s), and swing (s).

Nerve conduction velocity

NCV was calculated preoperatively and after 8 and 12 weeks in sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups, according to a previously published protocol [54,55]. Under anesthesia, the sciatic nerve was stimulated with single electrical pulses (200- μ s duration) and supramaximal stimulation that ensured maximal amplitude. Using needle-electrodes, the sciatic nerve was percutaneously stimulated proximal to the lesion site at the level of sciatic notch and distal to the lesion at the level of the ankle. Compound muscle action potentials of the plantar muscles were recorded utilizing monopolar needles inserted into the muscle bellies and displayed with the oscilloscope (Sapphire II 4ME; Teca medelec, USA). Motor NCV was calculated by dividing the distance between stimulation sites by average latency evoked from two sites (sciatic notch and ankle). The mean $\pm$ SEM was calculated for each experimental group and at each evaluated timepoint.

Specimen preparation and morphometric analysis

Nerves were harvested after 8 and 12 weeks from sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups. Under general anesthesia with isoflurane (Isoforine®; Cristalia, Brasil), rats were euthanized with barbiturate overdose (Thiopentax, Cristalia, São Paulo, Brazil). The vascular system was rinsed by transcardial perfusion with saline phosphate-buffered saline (PBS) (0.1 M, pH 7.4). Fixation was performed in 2% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in PBS (0.2 M, pH 7.34), and nerves containing NGC were immersed in the same solution for 24 hours at 4°C. The sciatic nerve segment in the NGC was dissected and divided into two parts: proximal and distal. Nerves were washed with saline PBS (0.1 M, pH 7.4) and postfixed for 3 hours in 1% osmium tetroxide solution mixed with PB (pH 7.4). The specimens were dehydrated and embedded in glycol methacrylate resin (Leica microsystems, Heidelberg, Germany). The blocks were trimmed, and semi-thin sections (1–2 μ m) were obtained with an ultramicrotome (Leica RM 2265; Leica Microsystems CMS), which were stained with toluidine blue (0.25%). The morphometric analysis was performed by sampling at least 30% of the cross-section of each nerve using a bright-field microscope (Leica DM 4000 B-M; Leica Microsystems CMS) [56]. The analysis was performed with two sampled fields of each nerve (magnification of 100x) using Adobe Photoshop CC 2019. Morphometric parameters included myelinated axon

diameter, myelinated fiber diameter, myelin thickness (fiber diameter - axon diameter/2), and "g" ratio (axon diameter/fiber diameter). The mean $\pm$ SEM was calculated for each experimental group and at each evaluated time point.

Immunohistochemical in sciatic nerve and RT-qPCR analyses of spinal cord samples

Immunohistochemical analysis (S-100, neurofilament, BDNF, GDNF and p75^{NTR}) of sciatic nerves samples and qPCR of the spinal cord samples (BDNF, GDNF, HGF, IL-6 and IL-10) were performed for sham and PCL+MSC (n = 3) groups after 4 weeks. Rats were euthanized with barbiturate overdose (Thiopentax; Cristália). Fresh spinal cord tissue ipsilateral to the lesion was harvested, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Fixation was performed in 4% paraformaldehyde in PB (0.1 M, pH 7.34), and the regenerated nerve was dissected and immersed in the same solution for 12 hours at 4 °C. Specimens were immersed in 10%, 20%, and 30% sucrose solutions (0.1 M PB, pH 7.4) for 12 hours, mixed with Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, USA), and frozen at -80 ° C.

Longitudinal cryostat sections (12 μ m) of the sciatic nerves were acclimatized, washed, and incubated in 3% bovine serum albumin solution or 3% donkey serum in PB (0.1 M, pH 7.4) for 1 hour, followed by incubation in a moist chamber with primary antibodies against S100, neurofilament H (NF), BDNF, GDNF and p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) for 4 hours (Additional file 2: table S2). After rinsing with PB, the sections were incubated with Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, or CY2-conjugated secondary antiserum for 45 min at room temperature. The sections were then mounted in a mixture of glycerol/PB (3:1) for quantitative measurements or glycerol/DAPI for qualitative analysis. Representative images were obtained using the fluorescence microscope (BX51; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a camera (DP 72; Olympus Corporation). Four images of each sample were imported for the determination of the integrated pixel density that represented the intensity of labeling using ImageJ software (version 1.33u, National Institutes of Health, USA), according to a previously published protocol [57,58]. The mean intensity $\pm$ SEM was calculated for each group.

For RT-qPCR, the spinal cord was finely pricked and homogenized in TRIzol reagent (TRIzol™, Invitrogen™) and chloroform. The samples were vigorously

shaken for 30 s using Precellys Lysing Kit® (Uniscience, São Paulo, Brazil) with the Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneuz, France). Total RNA was extracted, quantified, and reverse-transcribed to cDNA, which was amplified as described previously in the RT-qPCR assay procedure performed with cells. Assays analyzing the levels of BDNF, GDNF, HGF, IL-10, and IL-6 were performed (all of Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil) (Additional file 3: table S3). Samples were tested with two reference genes, β 2-microglobulin and *HPRT*. The qPCR reaction was performed with the QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System thermocycler (Applied Biosystems™, Thermo Fischer Scientific) with the following parameters: 50°C for 2 min, 95°C for 2 min, and 45 cycles of 95°C for 1 s and 60°C for 30 min. The relative quantification of expression of the genes of interest was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method [46].

Statistical analysis

Variables, namely, sciatic and tibial functional indices, Catwalk analysis, and NCV were assessed for normality with statistical tests (Shapiro-Wilk or Kolmogorov-Smirnov), descriptive statistics, and graphic analyses (QQ plot). An analysis of variance test (two-way ANOVA multiple comparisons) was performed followed by the Tukey's test to verify the difference in the means of the variables between each group and time of the experiment. Other variables (integrated pixel density and relative quantification) were assessed for normality using statistical tests (Shapiro-Wilk), descriptive statistics, and graphic analysis. For parametric data, the t-test was performed with unpaired samples. For non-parametric data, the Mann-Whitney test was performed for unpaired samples. The data are represented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM) and the level of significance between the groups was $p < 0.05$ denoted by a single asterisk ($p < 0.033$), two asterisks ($p < 0.002$) and three asterisks ($p < 0.001$) (GraphPad Prism version 8 for Mac, San Diego, CA, USA).

Results

Canine AdMSC showed mesenchymal fate and differentiation potential

Following isolation, AdMSCs demonstrated a homogeneous appearance and fusiform morphology. Multipotentiality was detected in vitro via tri-lineage differentiation into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes. Alizarin red staining demonstrated the

formation of an extracellular calcium matrix after 21 days. Oil Red staining confirmed the presence of the deposits composed of intracytoplasmic lipids after 14 days. Staining with toluidine blue demonstrated the deposition of the extracellular matrix after 21 days (Additional file 4: Figure S1). Immunophenotypic analysis of AdMSCs by flow cytometry confirmed the positive expression of *CD 90* (Thy-1) and the absence of expression of hematopoietic and endothelial antigens *CD45* and *CD34* (transmembrane glycoproteins) and *CD71* (transferrin receptor) (Additional file 4: Figure S1). Although criteria are not fully defined to canine AdMSCs characterization, the cells used in this study exhibited a comparable *in vitro* profile in line with previously published studies [31,43,44].

Canine AdMSCs enhanced their trophic and anti-inflammatory potential after in vitro stimulation assay

Gene expression of neurotrophic factors BDNF, GDNF and HGF in AdMSCs was higher following stimulation with IFN- γ (BDNF 3.94 ± 0.55 , GDNF 6.7 ± 0.59 , and HGF 2.5 ± 0.36) than in unstimulated AdMSCs (BDNF 1.02 ± 0.12 , GDNF 1.03 ± 0.23 , and HGF 0.97 ± 0.60) (BDNF $p = 0.02$; GDNF $p < 0.001$, and HGF $p = 0.01$). The expression of cytokine *IL-10* was significantly higher in AdMSCs following stimulation with IFN- γ (2.66 ± 0.36) than in unstimulated AdMSCs (0.93 ± 0.21) ($p = 0.07$) (Figure 1).

Ultrastructural analysis of 3D-printed NGCs

NGCs were manufactured by 3D printing with PCL membranes using the FDM technique. PCL filaments (thickness of $396 \pm 74 \mu\text{m}$) were continuously deposited in a square geometry along the vertical direction for the first layer and the lateral direction for the second layer, resulting in the formation of a bilayer membrane with a thickness of $386 \pm 41 \mu\text{m}$, width 15 mm x 15 mm, and an area of 225 mm^2 . The air gaps between the filaments (areas without polymer) formed pores with a height of $312 \pm 58 \mu\text{m}$ and a length of $300 \pm 51 \mu\text{m}$, as depicted in Figure 2. Membranes were rolled and sealed with controlled heating.

3D-printed NGCs functionalized with canine AdMSCs showed positive functional motor recovery

No significant differences were observed between autograft (SFI, -60.19) and PCL+MSC groups (SFI, -67.06) ($p > 0.05$) in SFI analysis performed after 9 weeks. However, significant differences were observed between autograft (SFI, -60.19) and PCL groups (SFI, -74.98) ($p = 0.02$). After 11 weeks, significant differences were observed upon comparison with the autograft (SFI, -52.58) group than PCL (SFI, -77.39) group ($p < 0.001$).

Significant differences were observed upon comparison of the results of the autograft (SFI, -50.40) group with those of PCL+MSC (SFI, 65.12) ($p = 0.03$) and PCL (SFI, -80.81) groups ($p < 0.001$) after 12 weeks. However, after 12 weeks, the analysis demonstrated superior results with the PCL+MSC group (SFI, 65.12) than those with the PCL (SFI -80.81) group ($p < 0.02$). Thus, the autograft and PCL+MSC groups showed a better functional motor recovery than that of the PCL group (Figure 3).

On TFI evaluation, no significant differences were observed in TFI analysis performed after 11 weeks between autograft (TFI, -60.25) and PCL+MSC groups (TFI, -75.98) ($p > 0.05$) (Figure 3). However, the autograft group demonstrated better results (TFI, -64.25) than those by the PCL group (TFI, -82.81) ($p = 0.004$). Similarly, after 12 weeks, no significant differences were observed between autograft (TFI, -60.34) and PCL+MSC groups (TFI, -72.69) ($p > 0.05$) (Figure 3). However, the autograft group (TFI, -60.34) demonstrated superior results than those by the PCL (TFI, -82.04) group ($p < 0.001$). The PCL+MSC group demonstrated a superior functional motor recovery than that by the PCL group.

During gait analysis by Catwalk, no significant differences were observed during the analysis of spontaneous locomotion after 8 weeks with respect to the stand time (s) among sham, autograft, and PCL+MSC groups ($p > 0.05$). However, the sham group demonstrated a better stand than PCL group ($p = 0.019$). After 12 weeks, the sham group demonstrated an improved stand compared with autograft ($p = 0.014$), PCL ($p = 0.006$), and PCL+MSC ($p = 0.004$) groups.

After 8 and 12 weeks, the sham group demonstrated an improved maximum contact area (cm²) in comparison with the contact area demonstrated by the autograft,

PCL, and PCL+MSC groups ($p < 0.001$). The autograft group showed better values after 8 weeks than those by PCL ($p = 0.03$) and PCL+MSC ($p = 0.02$) groups.

After 8 and 12 weeks, no significant differences were observed in maximum contact intensity between autograft and PCL+MSC groups ($p > 0.05$). However, the autograft group demonstrated superior results to those of the PCL group ($p = 0.03$). After 12 weeks, was significantly higher in the PCL+MSC group than in the PCL group ($p = 0.04$).

After 8 and 12 weeks, no significant differences were observed in the swing speed (m/s) between autograft and PCL+MSC groups ($p > 0.05$). After 8 weeks, the autograft demonstrated superior results to those by the PCL group ($p = 0.02$).

After 8 and 12 weeks, no significant differences were observed in swing (s) values of the sham group upon comparison with autograft and PCL+MSC groups ($p > 0.01$). However, after 8 weeks, the swing values of the sham group were superior to those of the PCL group ($p = 0.01$) (Figure 4).

3D-printed NGCs functionalized with canine AdMSCs showed electrophysiological recovery

After 8 weeks, no significant differences were observed in the conduction velocity of regenerated nerves among sham (42.35 m/s), autograft (47.99 m/s), PCL (28.02 m/s), and PCL+MSC (26.98 m/s) groups ($p > 0.05$). After 12 weeks, no significant differences in the NCV were observed among sham (75.08 m/s), autograft (55.96 m/s), and PCL+MSC (47.37 m/s) groups ($p > 0.05$). However, the NCV was significantly reduced in the PCL group (25.50 m/s) ($p = 0.001$). No significant differences were observed among autograft, PCL+MSC, and PCL groups after the twelfth week ($p > 0.05$). The findings demonstrate an increase in NCV in autograft and PCL+MSC groups as shown in Figure 4.

Morphometric analysis of regenerated nerves

Myelin thickness results with superior percentages after 8 weeks are listed as follows: sham (1.2 to 1.7 μm , mean 1.54 ± 0.01), autograft (0.4 to 0.7 μm , mean 0.71 ± 0.01), PCL (0.2 to 0.5 μm , mean 0.43 ± 0.01), and PCL+MSC (0.3 to 0.6 μm , mean 0.50 ± 0.01). After 12 weeks are listed as follows: sham (1.1 to 1.5 μm , mean 1.35 ± 0.01),

autograft (0.6 to 1.0 μm , mean 1.22 ± 0.01), PCL (0.4 to 0.7 μm , mean 0.59 ± 0.01), and PCL+MSC (0.4 to 0.7 μm , mean 0.63 ± 0.01) as showed in the Figure 5.

Measures of “g” ratio with superior percentages after 8 weeks are listed as follows: sham (0.6 to 0.65 μm , mean 0.58 ± 0.01), autograft (0.65 to 0.7 μm , mean 0.60 ± 0.01), PCL (0.75 to 0.80 μm , mean 0.70 ± 0.01), and PCL+MSC (0.65 to 0.75 μm , mean 0.63 ± 0.01). After 12 weeks are listed as follows: sham (0.65 to 0.70 μm , mean 0.60 ± 0.01), autograft (0.60 to 0.65 μm , mean 0.57 ± 0.01), PCL (0.75 to 0.8 μm , mean 0.68 ± 0.01), and PCL+MSC (0.6 to 0.7 μm , mean 0.62 ± 0.01). Correlation between “g” ratio and myelinated axon diameter showed a shift towards a higher number of axons exhibiting close to normal myelination in autograft and PCL+MSC groups after 12 weeks as showed in Figure 6.

Myelinated fiber diameter and myelinated axon diameter values with presence of greater percentages was improved for the autograft group upon comparison to PCL and PCL+MSC groups after 8 and 12 weeks. Similar values in the frequency distribution of myelinated fiber diameter and myelinated axon diameter were observed for PCL and PCL+MSC groups after 8 and 12 weeks (Additional file 5: Figure S2 and Additional file 6: Figure S3).

3D-printed NGCs functionalized with canine AdMSCs enhanced P75^{NTR} expression and preservation of Schwann cells reactivity

Immunoreactivities of the pan-neurotrophic receptor (P75^{NTR}), Schwann cells (S-100 expression), and neurofilament were evaluated 30 days after the lesion in both sham and PCL+MSC groups. Immunoreactivity of P75^{NTR} receptor was higher in the PCL+MSC group ($5.1 \times 10^7 \pm 0.37 \times 10^7$) than in the sham group ($3.5 \times 10^7 \pm 0.83 \times 10^7$) ($p = 0.03$) (Figure 7A). No significant differences in the immunoreactivity of S-100 were observed between sham ($5.3 \times 10^7 \pm 0.14 \times 10^7$) and PCL+MSC groups ($3.9 \times 10^7 \pm 0.55 \times 10^7$) ($p < 0.05$) indicating that the reactivity of Schwann cells was preserved (Figure 7B). Immunoreactivity of NF was more superior in the sham group ($10.7 \times 10^7 \pm 0.07 \times 10^7$) than in the PCL+MSC group ($8.3 \times 10^7 \pm 0.1 \times 10^8$) ($p = 0.001$) (Figure 7C).

3D-printed NGCs functionalized with canine AdMSCs stimulate expression of neurotrophic factors

Immunoreactivity against BDNF and GDNF was characterized in regenerating nerves obtained inside NGC in the sham group and PCL+MSC group 30 days after the lesion. The positive immunoreactivity of BDNF and GDNF is shown in Figures 8 and 9. An increase in the intensity of the immunostaining was observed from the proximal region of the nerve in the PCL+MSC group compared with the sham group. Canine AdMSCs were labeled with qdot655. Serial histological sections were obtained 30 days following nerve repair with NGC for detection of the labeled cells.

Cells labeled with qdot655 were observed inside NGC, confirming the survival of AdMSCs for at least 4 weeks in vivo (Figure 8 and 9). Cells were not observed in the distal or the proximal stumps or the regions not located in the proximity of NGC, indicating that the cells were possibly retained around the application site. In addition, the labeled cells showed colocalization with the regions that demonstrated positive immunostaining for BDNF and GDNF (Figure 8 and 9). The intensity was stronger in the proximal region, indicating that the PCL biomaterial functionalized with MSCs positively influenced the production of neurotrophins BDNF and GDNF.

3D-printed NGCs functionalized with canine AdMSCs enhanced upregulation of the expression of BDNF, GDNF and HGF in the spinal cord

Gene expression corresponding to neurotrophins BDNF, GDNF, HGF and cytokines IL-6 and IL-10 was evaluated 30 days after nerve repair in both sham and PCL+MSC groups. The expression of *BDNF* was significantly higher in the PCL+MSC group (1.53 ± 0.11) than in the sham group (1.00 ± 0.05) ($p = 0.006$). The expression of *GDNF* was significantly higher in the PCL+MSC group (1.35 ± 0.09) than in the sham group (1.01 ± 0.09) ($p = 0.04$). The expression of *HGF* was significantly higher in the PCL+MSC group (1.74 ± 0.25) than in the sham group (1.02 ± 0.12) ($p = 0.04$), as shown in Figure 10. No significant differences in *IL-10* expression were observed in the PCL+MSC group (1.01 ± 0.10) upon comparison with the sham group (0.69 ± 0.17) ($p > 0.05$). No significant differences in *IL-6* expression were observed in the PCL+MSC group (0.30 ± 0.03) upon comparison with the sham group (0.90 ± 0.36) ($p > 0.05$) (Figure 10).

Discussion

Peripheral nerve injury is a common neurosurgical problem that leads to severe motor and sensorial defects [2,3,5,6]. A tissue engineering approach that integrates NGCs, cells, and growth factors mimicking native tissues shows promise for restoring the damage in nervous tissue [12]. Accordingly, 3D printing has shown the potential to develop NGCs with characteristics similar to those of native nerve [20,21]. Enhancing nerve regeneration by exogenous application of growth-promoting molecules has been evaluated [60,61]. However, soluble growth factors might have limited applications owing to short biological half-life, low tolerance, and high costs [62]. To overcome these limitations studies indicated that AdMSCs secrete a complex mix of paracrine neuroprotective and anti-inflammatory factors [34–36]. Neuroprotective effects mediated by MSCs are primarily associated with the production of BDNF, GDNF, nerve growth factor (NGF), insulin-like growth factor (IGF), transforming growth factor (TGF), fibroblast growth factor 2 (FGF2), and HGF [30,34,35,63–66]. Angiogenesis is associated with angiopoietin factors such as angiopoietin-1, basic fibroblast growth factor (bFGF), and vascular endothelial growth factor (VEGF) [30,64,67]. It is also influenced by immunoregulatory mechanisms associated with interleukin 10 (IL-10), prostaglandin E2 (PGE2), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), HGF, transforming growth factor-beta (TGF- β) [36,68–70]. Here, we evaluated the neurogenerative capacity of NGCs fabricated by 3D printing and functionalized with canine AdMSCs in restoring the damage caused by critical sciatic nerve injury in rats.

The inflammatory environment during the Wallerian degeneration process is indispensable for axonal regeneration and is characterized by a significant production of cytokines including tumor necrosis factor alfa (TNF- α), and IFN- γ by Schwann cells and fibroblasts during the first 14 days [71–74]. This leads to the recruitment of inflammatory cells to a rapid clearance of myelin and facilitate nerve regeneration [75]. In our study, canine AdMSCs demonstrated a constitutive expression of *BDNF*, *GDNF*, *HGF*, and *IL-10*. Furthermore, direct stimulation with IFN- γ resulted in the upregulation of the expression of *BDNF*, *GDNF*, *HGF*, and *IL-10*. Neurotrophic factors BDNF and GDNF are powerful molecules that influence nerve-muscle synapsis, neuronal survival, proliferation of Schwann cells, and axonal regeneration [76,77]. HGF is a potent angiogenic and anti-inflammatory factor with antioxidant

functions and is capable of reducing glial scarring and acting synergistically with neurotrophic factors [68,77,78]. IL-10 is a cytokine involved in the restoration of tissues via the regulation of inflammatory responses, extracellular matrix, fibroblast functions, and angiogenesis [79,80]. Hence, an inflammatory environment might be essential to improve the regenerative capacity of cells [37]. Studies have shown that IFN- γ is a key player in activating the immunomodulatory function of murine and human MSCs through the production of several factors, including HGF and IL-10, which is consistent with the results of our study [81,82]. Importantly, through inflammation enriched with proinflammatory cytokines such as IFN- γ , MSCs could be activated or primed, and the upregulation of major histocompatibility complex class I (MHC-I) and class II (MHC-II) leads to improved survival [37].

Versatile NGCs should demonstrate modulation of the cellular environment that permits axonal branching, and revascularization [11]. Several biocompatible biomaterials have been approved for clinical use [11]. However, complete clinical data are scarcely available, and the recovery of long-gap defects is limited [11]. PCL polymer has been used for the fabrication of hollow NGCs via conventional manufacturing methods, showing positive regeneration in rats [27,28,83]. However, rapid-prototyping methods such as FDM 3D printing for NGC fabrication enable control of porosity, architecture, and reproducibility [20]. In our study, 3D-printed NGCs showed characteristics such as mechanical strength, macroporosity, and adequate geometry, besides biocompatibility. Recently, the fabrication of NGC with customized architecture has been demonstrated using 3D-printing technology with PCL polymer [22,84].

Long-gap sciatic lesions in rats of 10 mm of gap are considered critical, with only 10% axons effectively regenerating into the NGC [11,50]. In our study, NGC functionalized with canine AdMSCs showed positive results for functional motor recovery. After 8 weeks, the autograft group showed better results, following the PCL+MSC group. In addition, Catwalk analysis demonstrated an increase in the duration of the support phase (stand time), contact intensity, swing time, and velocity after 8 weeks in the PCL+MSC group compared with the PCL group. Previous studies have demonstrated functional motor recovery after a combination of allogeneic MSCs and PCL NGCs implanted in short gaps of 3–10 mm [26,85,86]. In contrast, allogeneic Schwann cells, MSCs, and polylactide acid (PLA) NGCs demonstrated functional

recovery after 8 weeks with gaps of 15 mm. However, the SFI was lower than that observed in our study [87]. Using the 3D approach, NGCs were customized using composite material to be implanted in a short gap of 4 mm in mice. However, only sensitive function of the nerve was evaluated compared to our study [23]. Silicone NGC 3D printed with bifurcation of sciatic nerve was implanted in a 10 mm of gap and demonstrated recovery of only gait duty cycle after 12 weeks, however, biodegradable alternatives are desirable [21]. In our study, although the results were inferior to those of the autograft group, our critical level of lesion reflects better clinical setting without. Moreover, a retraction of stumps and contractures in the limbs could negatively influence functional recovery [11,50].

Electrophysiological and histological evaluations are complementary techniques used for the examination of nerve regeneration. In our study, PCL+MSC and autograft groups showed better results with NCV after 12 weeks, indicating the presence of myelinated axons. In addition, the morphometric analysis demonstrated improvements in myelin thickness in the PCL+MSC group compared with the PCL group after 8 and 12 weeks. Correlation between the “g” ratio and myelinated axon diameter showed a shift towards a higher number of axons demonstrating almost normal myelination after 12 weeks. Previous studies have shown improvements in histological parameters of short-gap defects after a combination of MSCs plus PCL implanted in gaps of 5–10 mm [26,85,86]. In long-gap defects, recovery of NCV and presence of the highest number of myelinated axons were observed with allogeneic MSCs plus PLA-NGC after 6 weeks [88]. However, NCV was lower (about 40 m/s) than that observed in our study [88]. Other studies have demonstrated NCV and morphometric recovery after 8 and 12 weeks following the use of MSCs and Schwann cells applied in PLA-NGC or an acellular nerve allograft. Despite positive functional recovery, NCVs (12.45 and 17 m/s, respectively) were slower than those of the PCL+MSC group observed in our study (47.37 m/s) [87,89].

Nerve regeneration is strongly influenced by a proregenerative microenvironment [76]. Neurotrophins act selectively in high-affinity tropomyosin receptor kinases (trks) or low-affinity neurotrophin receptors P75 (P75^{NTR}) expressed in Schwann cells, and growth cones in regenerating nerves [9,76,90]. Immunolabeling results indicated a positive expression of BDNF and GDNF in association with P75^{NTR} in the PCL+MSC group after 30 days. Our results are comparable to those observed in

previous studies in which nerve regeneration was frequently associated with the production of BDNF and GDNF during the first weeks after MSC transplantation [34,35,64,66,70,91]. BDNF and GDNF activate several *in vivo* and *in vitro* pathways associated with nerve regeneration, formation of nerve-muscle synapses, neuronal survival, and Schwann cells proliferation [76,90]. Activation of the BDNF/p75^{NTR} pathway instead of BDNF/trkB plays an important role in the activation and differentiation of Schwann cells as well as in myelination [76,90,92]. Previous studies conducted with polymeric NGC (6 and 10 mm of gaps) plus allogeneic MSCs demonstrated the proliferation of Schwann cells and increased expression of neurotrophic receptors after 2 and 8 weeks, respectively [85,93].

Schwann cells are crucial for axonal branching and myelin production [9,76]. The reactivity of Schwann cells and the organization of the cytoskeleton were evaluated using S-100 and neurofilament markers. Reactivity of S-100 was increased after 30 days following nerve repair with NGC plus MSCs. NF immunostaining showed values that were close to those of the Sham group. Previous studies observed S-100 expression in rats treated with allogeneic and xenogenic MSC-TA after nerve injury [59,93,94]. Coexpression of S100 and neurotrophin receptors (P75^{NTR} and trks) was detected in axonotmesis or neurotmesis experiments after MSC transplantation in rats [85,93].

Paracrine and regenerative effects depend on AdMSC engraftment [31,37,69]. In our study, AdMSCs combined with fibrin biopolymer scaffold survived for 30 days after transplantation into the NGC and were colocalized with BDNF and GDNF. Similarly, human AdMSCs transplanted after root avulsion in rats survive in the lesion area for at least 14 days and increased neuronal survival mediated by BDNF, GDNF, and HGF [70]. The results of another study demonstrated the coexpression of BDNF and allogeneic MSCs positive for green fluorescent protein (GFP) after 60 days [25]. In our study, the application of fibrin biopolymer acted as a therapeutic vehicle for maintaining MSCs and enhancing proregenerative effects, thereby contributing to nerve regeneration [39–41].

Degeneration, loss of inhibitory and excitatory synapses, formation of glial scarring, and excitotoxicity are observed in neuronal bodies following peripheral nerve injury [95,96]. Regulation of several genes related to cell survival and axonal growth indicates changes in the proregenerative status of motoneurons [95]. Herein, the

upregulation of the expression of *BDNF*, *GDNF*, and *HGF* was detected after 30 days in the PCL+MSC group, indicating a proregenerative response in the ventral horn of the spinal cord. In a ventral root injury model, MSC transplantation increased *BDNF* expression after 2 weeks following injury [91]. The results of previous studies did not demonstrate the expression of neurotrophic factors in spinal cord lesions following AdMSC transplantation in rats or humans [96–98]. We assumed that the paracrine production of proregenerative factors by MSCs might result in the formation of a gradient of molecules secreted throughout peripheral nerves and influence the spinal cord to contribute to nerve regeneration.

Conclusions

The tissue engineering approach for nerve regeneration based on 3D-printed NGCs multi-functionalized with canine AdMSCs embedded in fibrin biopolymer showed positive functional and electrophysiological locomotor recovery after 8 and 12 weeks following critical experimental injury. In addition, it shifted to a pro-regenerative profile mediated by neurotrophic factors during the first 4 weeks in the microenvironment of nerves and the spinal cord, thereby improving functional recovery. Although combinatorial approaches for the treatment of PNI injuries are highly desirable, further studies are necessary to overcome the autograft technique analyzing several geometric parameters with 3D printing, as well as direct priming of MSCs and neurotrophic factors to enhance nerve regeneration.

Abbreviations

PNS: Peripheral nervous system; NGC: nerve guidance channels; PGA: polyglycolic acid; PCL: polycaprolactone; 3D: Tridimensional; MSC: mesenchymal stromal cells; Ad-MSC: mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue; Sham: Sham group; PCL+MSC: polycaprolactone nerve guidance channel plus canine Ad-MSC SFI; Sciatic functional index; TFI: tibial functional index; NCV: Nerve conduction velocity; RT-qPCR: real time PCR; DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium; FBS: fetal bovine serum bovine; INF- γ : interferon gamma; BDNF: brain derived neurotrophic factor; GDNF: glial cell-derived neurotrophic factor; HGF: hepatocyte growth factor; IL-10: interleukin 10; GAPDH: glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase; HPRT: hypoxanthine phosphoribosyltransferase; FDM: filament

deposition modeling; p75^{NTR}: p75 neurotrophin receptor; CY: Cyanine; PB: phosphate buffer; S100: calcium binding protein; IL-6: interleukin 6; NGF: nerve growth factor; IGF: insulin-like growth factor; TGF: transforming growth factor; FGF-2: fibroblast growth factor 2; bFGF: basic fibroblast growth factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; IL-10: interleukin 10; IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase; TGF- β : transforming growth factor beta; TNF- α : tumor necrosis factor alfa; MHC-I: major histocompatibility complex class I; MHC-II: major histocompatibility complex class II; trk: high affinity tropomyosin receptor kinases; GFP: green fluorescent protein;

Acknowledgments

We would like to thank the Experimental Research Unit of Botucatu Medical School (UNIPEX/ FMB) and Cell Engineering Laboratory (Blood transfusion center/FMB/UNESP) for infrastructural and technical support. We are grateful to the Nerve Regeneration Laboratory (LRN) of the University of Campinas for technical support and collaboration and to CTI Renato archer for support in 3D printing.

Authors' contributions

DNRS and RMA contributed to the conception and design of the research project, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, and manuscript writing. GBA, LPC, ALRO, ACB, MC, MAG, ED, and MB contributed to the collection and interpretation of the data. RSF produced and provided the fibrin biopolymer sealant. JVLS and JAD contributed to modeling and 3D printing of nerve guidance conduits. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The authors are thankful to São Paulo Research Foundation (FAPESP) for providing the financial support (2016/14364-2).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon request.

Ethics approval and consent to participate

All procedures were performed with the approval of the Ethics Committee in Animal Experimentation of São Paulo State University (CEUA/ UNESP, protocol no. 1243–2017), and in accordance with the ethical principles set forth by the National Council of Animal Experimentation (CONCEA).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Campbell WW. Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin. Neurophysiol.* 2008;119:1951–65.
2. Forterre F, Tomek A, Rytz U, Brunnberg L, Jaggy A, Spreng D. Iatrogenic sciatic nerve injury in eighteen dogs and nine cats (1997-2006). *Vet. Surg.* 2007;36:464–71.
3. Van Soens I, Struys MM, Polis IE, Bhatti SF, Van Meervenne SA, Martlé VA, et al. Magnetic stimulation of the radial nerve in dogs and cats with brachial plexus trauma: A report of 53 cases. *Vet. J.* 2009;182:108–13.
4. Steinberg HS. Brachial plexus injuries and dysfunctions. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1988; 18(3):565-80.
5. Asplund M, Nilsson M, Jacobsson A, Von Holst H. Incidence of traumatic peripheral nerve injuries and amputations in Sweden between 1998 and 2006. *Neuroepidemiology.* 2009; 32(3):217-28.
6. Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 2008; 87(5):381-5.
7. Terzis J, Faibisoff B, Williams HB. The nerve gap: Suture under tension vs. graft. *Plast. Reconstr. Surg.* 56(2):166-70. 1975.
8. Griffin JW, Hogan M V., Chhabra AB, Deal DN. Peripheral Nerve Repair and Reconstruction. *J. Bone Jt. Surg.* 2013;95:2144–51.
9. Scheib J, Höke A. Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat. Rev. Neurol.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;9:668–76.
10. Ray WZ, Mackinnon SE. Management of nerve gaps: Autografts, allografts, nerve transfers, and end-to-side neurorrhaphy. *Exp. Neurol.* Elsevier Inc.; 2010;223:77–85.
11. Nectow AR, Marra KG, Kaplan DL. Biomaterials for the Development of Peripheral Nerve Guidance Conduits. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2012;18:40–50.
12. Dodla MC, Alvarado-Velez M, Mukhatyar VJ, Bellamkonda R V. Peripheral Nerve Regeneration. *Princ. Regen. Med.* Elsevier; 2019. p. 1223–36.
13. Konofaos P, Ver Halen JP. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J. Reconstr. Microsurg.* 2013;29:149–64.
14. Wu R, Wang L, Chen F, Huang Y, Shi J, Zhu X, et al. Evaluation of artificial nerve conduit and autografts in peripheral nerve repair in the rat model of sciatic nerve injury. *Neurol. Res.* 2016;38:461–6.
15. Waitayawinyu T, Parisi DM, Miller B, Luria S, Morton HJ, Chin SH, 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.

16. Saltzman EB, Villa JC, Doty SB, Feinberg JH, Lee SK, Wolfe SW. A Comparison Between Two Collagen Nerve Conduits and Nerve Autograft: A Rat Model of Motor Nerve Regeneration. *J. Hand Surg. Am.* 2019;44(8):700.e1-700.e9.
17. Moore AM, Kasukurthi R, Magill CK, Farhadi HF, Borschel GH, Mackinnon SE. Limitations of Conduits in Peripheral Nerve Repairs. *HAND.* 2009;4:180–6.
18. Pedde RD, Mirani B, Navaei A, Styan T, Wong S, Mehrali M, et al. Emerging Biofabrication Strategies for Engineering Complex Tissue Constructs. *Adv. Mater.* 2017;29.
19. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: Evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J. Hand Surg. Am.* 2000;25:391–414.
20. Rajaram A, Chen XB, Schreyer DJ. Strategic design and recent fabrication techniques for bioengineered tissue scaffolds to improve peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng. - Part B Rev.* 2012;18:454–67.
21. Johnson BN, Lancaster KZ, Zhen G, He J, Gupta MK, Kong YL, et al. 3D Printed Anatomical Nerve Regeneration Pathways. *Adv. Funct. Mater.* 2015;25:6205–17.
22. Vijayavenkataraman S, Zhang S, Thaharah S, Sriram G, Lu WF, Fuh JYH. Electrohydrodynamic Jet 3D Printed Nerve Guide Conduits (NGCs) for peripheral Nerve Injury Repair. *Polymers (Basel).* 2018;10:1–26.
23. Zhu W, Tringale KR, Woller SA, You S, Johnson S, Shen H, et al. Rapid continuous 3D printing of customizable peripheral nerve guidance conduits. *Mater. Today. Elsevier Ltd;* 2018;21:951–9.
24. Wang S, Cai L. Polymers for fabricating nerve conduits. *Int. J. Polym. Sci.* 2010;2010.
25. Biscola NP, Cartarozzi LP, Ferreira R.S. J, Barraviera B, De Oliveira ALR. Long-standing motor and sensory recovery following acute fibrin sealant based neonatal sciatic nerve repair. *Neural Plast.* 2016;2016.
26. Frattini F, Pereira Lopes FR, Almeida FM, Rodrigues RF, Boldrini LC, Tomaz MA, et al. Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit promote sciatic nerve regeneration and sensory neuron survival after nerve injury. *Tissue Eng. Part A.* 2012;18:2030–9.
27. Carrier-Ruiz A, Evaristo-Mendonça F, Mendez-Otero R, Ribeiro-Resende VT. Biological behavior of mesenchymal stem cells on poly- ϵ -caprolactone filaments and a strategy for tissue engineering of segments of the peripheral nerves. *Stem Cell Res. Ther. Stem Cell Research & Therapy;* 2015;6:128.
28. Yu W, Zhao W, Zhu C, Zhang X, Ye D, Zhang W, et al. Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(ϵ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate. *BMC Neurosci. BioMed Central Ltd;* 2011;12:68.
29. Hood B, Levene HB, Levi AD. Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects. *Neurosurg. Focus.* 2009;26:E4.

30. Caseiro AR, Pereira T, Ivanova G, Luís AL, Maurício AC. Neuromuscular Regeneration: Perspective on the Application of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretion Products. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1–16.
31. Kisiel a H, McDuffee L a, Masaoud E, Bailey TR, Esparza Gonzalez BP, Nino-Fong R. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *Am. J. Vet. Res.* 2012;73:1305–17.
32. Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo a., Sampaolesi M, Mascarello F, et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res. Vet. Sci.* 2011;91:18–24.
33. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. *Cell Transplant.* [Internet]. 2010;19:279–89.
34. Tomita K, Madura T, Mantovani C, Terenghi G. Differentiated adipose-derived stem cells promote myelination and enhance functional recovery in a rat model of chronic denervation. *J. Neurosci. Res.* 2012;90:1392–402.
35. Lopatina T, Kalinina N, Karagayur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth De Novo. *PLoS One.* 2011;6.
36. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:726–36.
37. Noronha NDC, Mizukami A, Caliári-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, et al. Correction to: Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res. Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2019;10:132.
38. Araújo MR, Kyrylenko S, Spejo AB, Castro MV, Ferreira Junior RS, Barraviera B, et al. Transgenic human embryonic stem cells overexpressing FGF2 stimulate neuroprotection following spinal cord ventral root avulsion. *Exp. Neurol. Elsevier Inc.*; 2017;294:45–57.
39. De Castro MV, Barbizan R, Ferreira RS, Barraviera B, De Oliveira ALR. Direct Spinal Ventral Root Repair following Avulsion: Effectiveness of a New Heterologous Fibrin Sealant on Motoneuron Survival and Regeneration. *Neural Plast.* 2016;2016.
40. Barbizan R, Castro M V., Rodrigues AC, Barraviera B, Ferreira RS, Oliveira ALR. Motor Recovery and Synaptic Preservation after Ventral Root Avulsion and Repair with a Fibrin Sealant Derived from Snake Venom. *PLoS One.* 2013;8:1–12.
41. Biscola NP, Cartarozzi LP, Ulian-Benitez S, Barbizan R, Castro MV, Spejo AB, et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. Journal of Venomous Animals and Toxins including*

Tropical Diseases; 2017;23:1–11.

42. Araña M, Mazo M, Aranda P, Pelacho B, Prosper F. Cellular Cardiomyoplasty: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. Kao RL, editor. Totowa, NJ: Humana Press; 2013.

43. Ivanovska A, Grolli S, Borghetti P, Ravanetti F, Conti V, De Angelis E, et al. Immunophenotypical characterization of canine mesenchymal stem cells from perivisceral and subcutaneous adipose tissue by a species-specific panel of antibodies. *Res. Vet. Sci. Elsevier Ltd*; 2017;114:51–8.

44. Russell KA, Chow NHC, Dukoff D, Gibson TWG, LaMarre J, Betts DH, et al. Characterization and Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. Kerkis I, editor. *PLoS One*. 2016;11:e0167442.

45. Amorim RM, Clark KC, Walker NJ, Kumar P, Herout K, Borjesson DL, et al. Placenta-derived multipotent mesenchymal stromal cells: a promising potential cell-based therapy for canine inflammatory brain disease. *Stem Cell Res. Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2020;11:304.

46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001; 402-408.

47. Lixandrão Filho AL, Noritomi PY, Da Silva JVL, Inforçatti Neto P, Cheung PYC, Colangelo N, et al. Construction and adaptation of an open source rapid prototyping machine for biomedical research purposes - A multinational collaborative development. *Innov. Dev. Des. Manuf. - Adv. Res. Virtual Rapid Prototyp*. 2010;2959:469–73.

48. Inforçatti Neto P, Lixandrão Filho AL, Pereira FDAS, Silva JVL, Silveira ZC. Thermoplastic filament extruder head for desktop Additive Manufacturing machines. *Innov. Dev. Virtual Phys. Prototyp. - Proc. 5th Int. Conf. Adv. Res. Rapid Prototyp*. 2012.

49. Maurmann N, Pereira DP, Burguez D, Pereira FDADS, Neto PI, Rezende RA, et al. Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. *Biomed. Phys. Eng. Express. IOP Publishing*; 2017;3:45005.

50. Yannas I V., Zhang M, Spilker MH. Standardized criterion to analyze and directly compare various materials and models for peripheral nerve regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*. 2007;18:943–66.

51. Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga FC, Oliveira ALR, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2014;5.

52. Ferreira RS, de Barros LC, Abbade LPF, Barraviera SRCS, Silveiras MRC, de Pontes LG, et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside – an

- overview. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2017;23:21.
53. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat. *Plast. Reconstr. Surg.* 1989;83:129–36.
 54. Valero-Cabré A, Navarro X. H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair. *Brain Res.* 2001;919:302–12.
 55. Navarro X, Verdú E, Butí M. Comparison of Regenerative and Reinnervating Capabilities of Different Functional Types of Nerve Fibers. *Exp. Neurol.* 1994;129:217–24.
 56. Mayhew TM, Sharma a K. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J. Anat.* 1984;139:59–66.
 57. Oliveira ALR, Thams S, Lidman O, Piehl F, Hokfelt T, Karre K, et al. From The Cover: A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004;101:17843–8.
 58. Cartarozzi LP, Perez M, Kirchhoff F, Oliveira ALR de. Role of MHC-I Expression on Spinal Motoneuron Survival and Glial Reactions Following Ventral Root Crush in Mice. *Cells.* 2019;8:483.
 59. Sanchez DNR, Bertanha M, Fernandes TD, de Lima Resende LA, Deffune E, Amorim RM. Effects of Canine and Murine Mesenchymal Stromal Cell Transplantation on Peripheral Nerve Regeneration. *Int. J. Stem Cells.* 2017;1–10.
 60. Tajdaran K, Chan K, Gordon T, Borschel GH. Matrices, scaffolds, and carriers for protein and molecule delivery in peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol. Elsevier*; 2019;319:1–16.
 61. Fadia NB, Bliley JM, DiBernardo GA, Crammond DJ, Schilling BK, Sivak WN, et al. Long-gap peripheral nerve repair through sustained release of a neurotrophic factor in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* 2020;12:eaav7753.
 62. Klimaschewski L, Hausott B, Angelov DN. The pros and cons of growth factors and cytokines in peripheral axon regeneration. *Int. Rev. Neurobiol. Elsevier Inc.*; 2013; 108: 137-171.
 63. Brohlin M, Kingham PJ, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Aging effect on neurotrophic activity of human mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2012;7:e45052.
 64. Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev.* 2014;23:741–54.
 65. Gu Y, Wang J, Ding F, Hu N, Wang Y, Gu X. Neurotrophic actions of bone marrow stromal cells on primary culture of dorsal root ganglion tissues and neurons. *J. Mol. Neurosci.* 2010; 40(3):332-41.
 66. Takemura Y, Imai S, Kojima H, Katagi M, Yamakawa I, Kasahara T, et al. Brain-Derived

Neurotrophic Factor from Bone Marrow-Derived Cells Promotes Post-Injury Repair of Peripheral Nerve. *PLoS One*. 2012;7:4–11.

67. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circ. Res.* 2004; 19;94(5):678-85.

68. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2010; 86(6):588-610.

69. Eleuteri S, Fierabracci A. Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:4597.

70. Ribeiro TB, Duarte ASS, Longhini ALF, Pradella F, Farias AS, Luzo ACM, et al. Neuroprotection and immunomodulation by xenografted human mesenchymal stem cells following spinal cord ventral root avulsion. *Sci. Rep.* 2015;5:1–12.

71. Stoll G, Müller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.* 1999;9:313–25.

72. Bauer S, Kerr BJ, Patterson PH. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; 8(3):221-32.

73. DeFrancesco-Lisowitz A, Lindborg JA, Niemi JP, Zigmond RE. The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. *Neuroscience. IBRO*; 2015;302:174–203.

74. Gillen C, Jander S, Stoll G. Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system: Comparison between immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration. *J. Neurosci. Res.* 1998; 51(4):489-96.

75. Dubový P, Klusáková I, Hradilová Sviženská I. Inflammatory profiling of Schwann cells in contact with growing axons distal to nerve injury. *Biomed Res. Int.* 2014;2014.

76. Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. *Prog. Neurobiol. Elsevier Ltd*; 2012;98:16–37.

77. Wang A, Brown EG, Lankford L, Keller BA, Pivetti CD, Sitkin NA, et al. Placental Mesenchymal Stromal Cells Rescue Ambulation in Ovine Myelomeningocele. *Stem Cells Transl. Med.* 2015;4:659–69.

78. Ko KR, Lee J, Lee D, Nho B, Kim S. Hepatocyte Growth Factor (HGF) Promotes Peripheral Nerve Regeneration by Activating Repair Schwann Cells. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):8316.

79. Rotshenker S. Wallerian degeneration: The innate-immune response to traumatic nerve

injury. *J. Neuroinflammation*. 2011; 8:109.

80. Xiao S, Huang G, Wei Z, Nie K, Liu Z, Deng C, et al. IL-10 Gene-modified human amniotic mesenchymal stem cells augment regenerative wound healing by multiple synergistic effects. *Stem Cells Int*. 2019; 2019:9158016.

81. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN- γ and TNF- α differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett*. 2007; 110(2):91-100.

82. De Witte SFH, Franquesa M, Baan CC, Hoogduijn MJ. Toward development of mesenchymal stem cells for immunomodulatory therapy. *Front. Immunol*. 2016;6.

83. Reid AJ, de Luca AC, Faroni A, Downes S, Sun M, Terenghi G, et al. Long term peripheral nerve regeneration using a novel PCL nerve conduit. *Neurosci. Lett*. 2013;544:125–30.

84. Lee SJ, Zhu W, Heyburn L, Nowicki M, Harris B, Zhang LG. Development of novel 3-D printed scaffolds with core-shell nanoparticles for nerve regeneration. *IEEE Trans. Biomed. Eng*. 2017;64:408–18.

85. Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira RS, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, et al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Res. Bull. Elsevier Inc.*; 2015;112:14–24.

86. Oliveira JT, Almeida FM, Biancalana A, Baptista AF, Tomaz MA, Melo PA, et al. 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;170:1295–303.

87. Dai LG, Huang GS, Hsu SH. Sciatic nerve regeneration by cocultured schwann cells and stem cells on microporous nerve conduits. *Cell Transplant*. 2013;22:2029–39.

88. Hsieh SC, Chang CJ, Cheng WT, Tseng TC, Hsu SH. Effect of an epineurial-like biohybrid nerve conduit on nerve regeneration. *Cell Transplant*. 2016;25:559–74.

89. Liu G, Cheng Y, Guo S, Feng Y, Li Q, Jia H, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair. *Int. J. Mol. Med*. 2011; 28(4):565-72.

90. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol. Neurobiol*. 2003;27:277–324.

91. Rodrigues Hell RC, Silva Costa MM, Goes AM, Oliveira ALR. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol. Dis. Elsevier Inc.*; 2009;33:290–300.

92. Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science (80-.)*. 2002; 298(5596):1245-8.

93. 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. Elsevier B.V.*; 2009;1262:7–15.

94. Frattini F, Pereira Lopes FR, Almeida FM, Rodrigues RF, Boldrini LC, Tomaz MA, et al. Mesenchymal Stem Cells in a Polycaprolactone Conduit Promote Sciatic Nerve Regeneration and Sensory Neuron Survival after Nerve Injury. *Tissue Eng. Part A*. 2012;18:2030–9.

95. Spejo AB, Oliveira ALR. Synaptic rearrangement following axonal injury: Old and new players. *Neuropharmacology. Elsevier Ltd*; 2015;96:113–23.

96. Spejo AB, Chiarotto GB, Ferreira ADF, Gomes DA, Ferreira RS, Barraviera B, et al. Neuroprotection and immunomodulation following intraspinal axotomy of motoneurons by treatment with adult mesenchymal stem cells. *J. Neuroinflammation*. 2018;15:1–18.

97. Park WB, Kim SY, Lee SH, Kim HW, Park JS, Hyun JK. The effect of mesenchymal stem cell transplantation on the recovery of bladder and hindlimb function after spinal cord contusion in rats. *BMC Neurosci*. 2010; ;11:119.

98. Rosado IR, Carvalho PH, Alves EGL, Tagushi TM, Carvalho JL, Silva JF, et al. Immunomodulatory and neuroprotective effect of cryopreserved allogeneic mesenchymal stem cells on spinal cord injury in rats. *Genet. Mol. Res*. 2017; 16(1).

Figure Legends

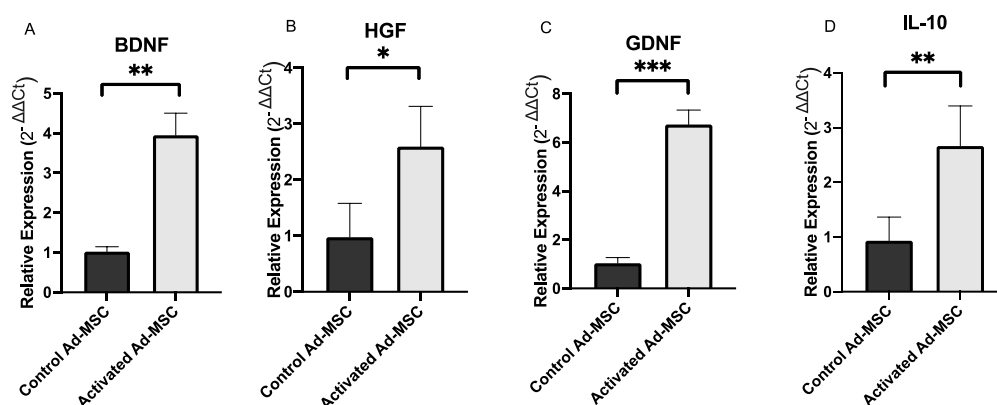


Fig 1. Relative gene expression after 96 hours following stimulation. (a) Relative expression of *BDNF*, (b) *GDNF*, (c) *HGF*. (d) *IL-10*. Data are represented as mean $\pm$ SEM. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

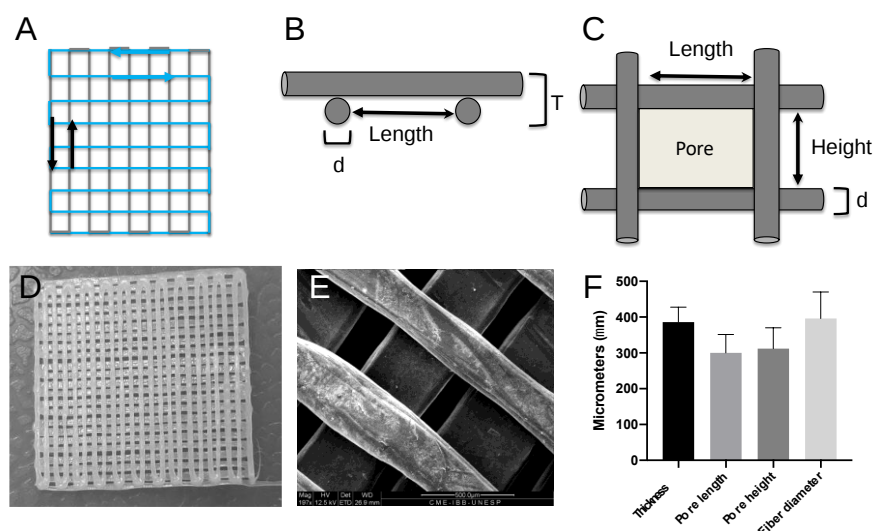


Fig 2. Geometric characterization of NGG-PCL 3D printed. (a) Height and length path of the first- and second-layers during 3D printing. (b) Lateral view of the two layers of PCL membranes. (c) Dorsal view of the PCL membranes. (d) 3D-printed PCL membrane. (e) Scanning microscopy electronic images of 3D-printed PCL membranes with different pores, filament lengths, and deposition of two layers. (f) Geometric parameters of PCL membranes ($n = 5$). Values are represented as mean $\pm$ SEM. Scale bar: 500 μm .

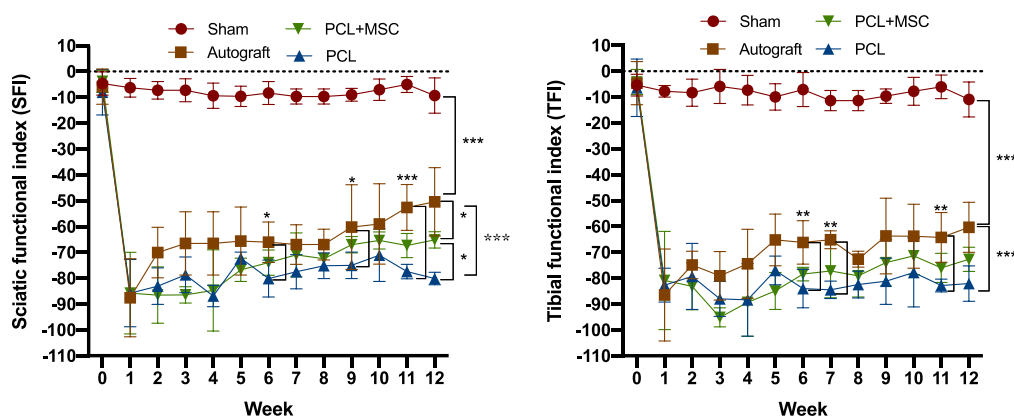


Fig 3. Analysis of locomotor functions based on sciatic nerve functionality index (SFI) and tibial functionality index (TFI) after 12 weeks in the sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups. The values obtained by weekly and are represented as mean $\pm$ SEM. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

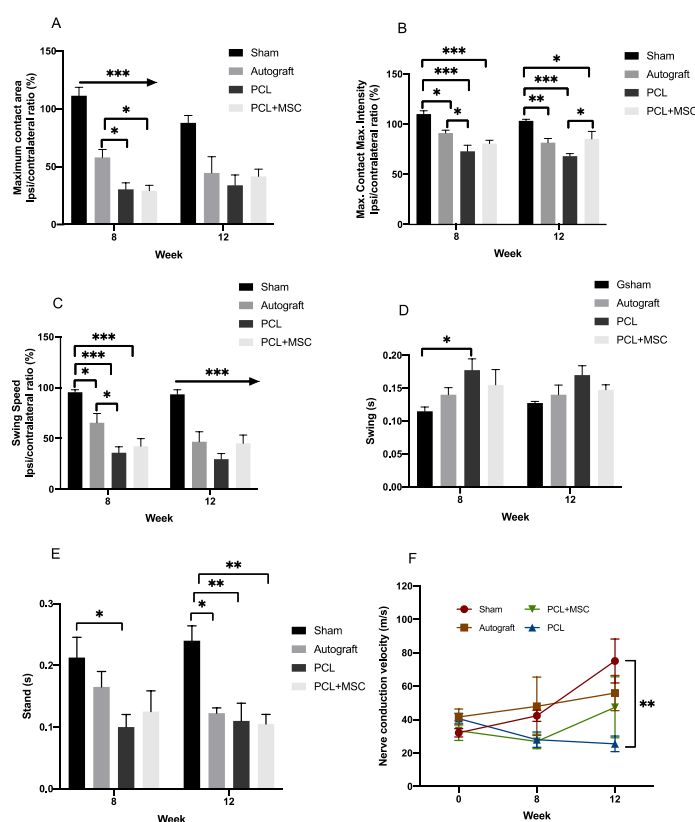


Fig 4. Gait analysis using the Catwalk platform and nerve conduction velocity (NCV) after 8 and 12 weeks in sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups. (a) maximum contact area, (b) Maximum contact intensity, (c) swing speed, (d) swing, (e) stand time, and (f) NCV (m/s). The values obtained are represented as mean $\pm$ SEM. $p > 0.05$; $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$.

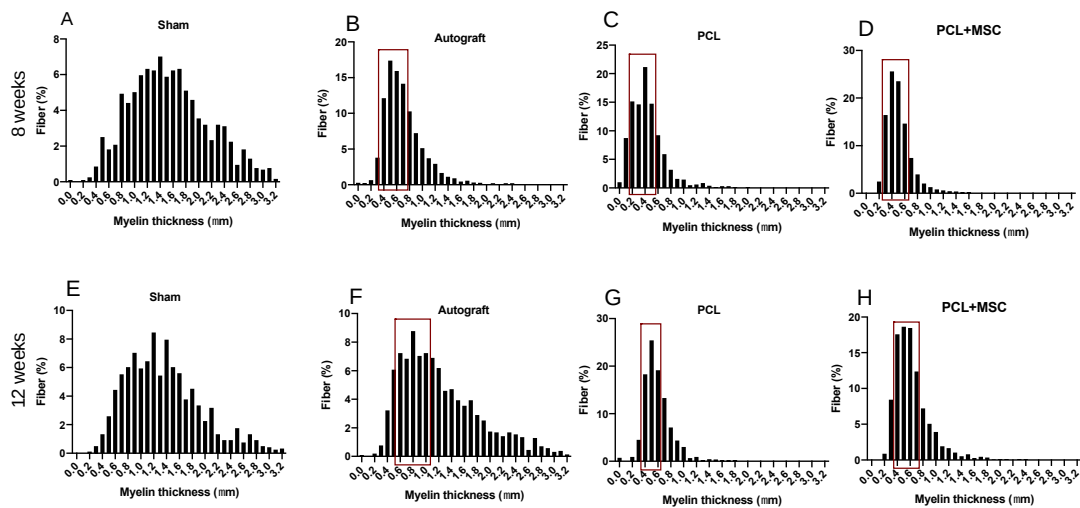


Fig 5. Frequency distribution of myelin thickness after 8 and 12 weeks following the repair of the sciatic nerve. **(a, b, c, d).** Values were obtained after 8 weeks following the lesion in sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups. **(e, f, g, h)** Values were obtained after 12 weeks following the lesion in sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups. After 12 weeks, the myelin thickness was superior in the PCL+MSC group compared with the PCL group. Red boxes highlight frequency intervals with better percentages among autograft, PCL, and PCL+MSC groups.

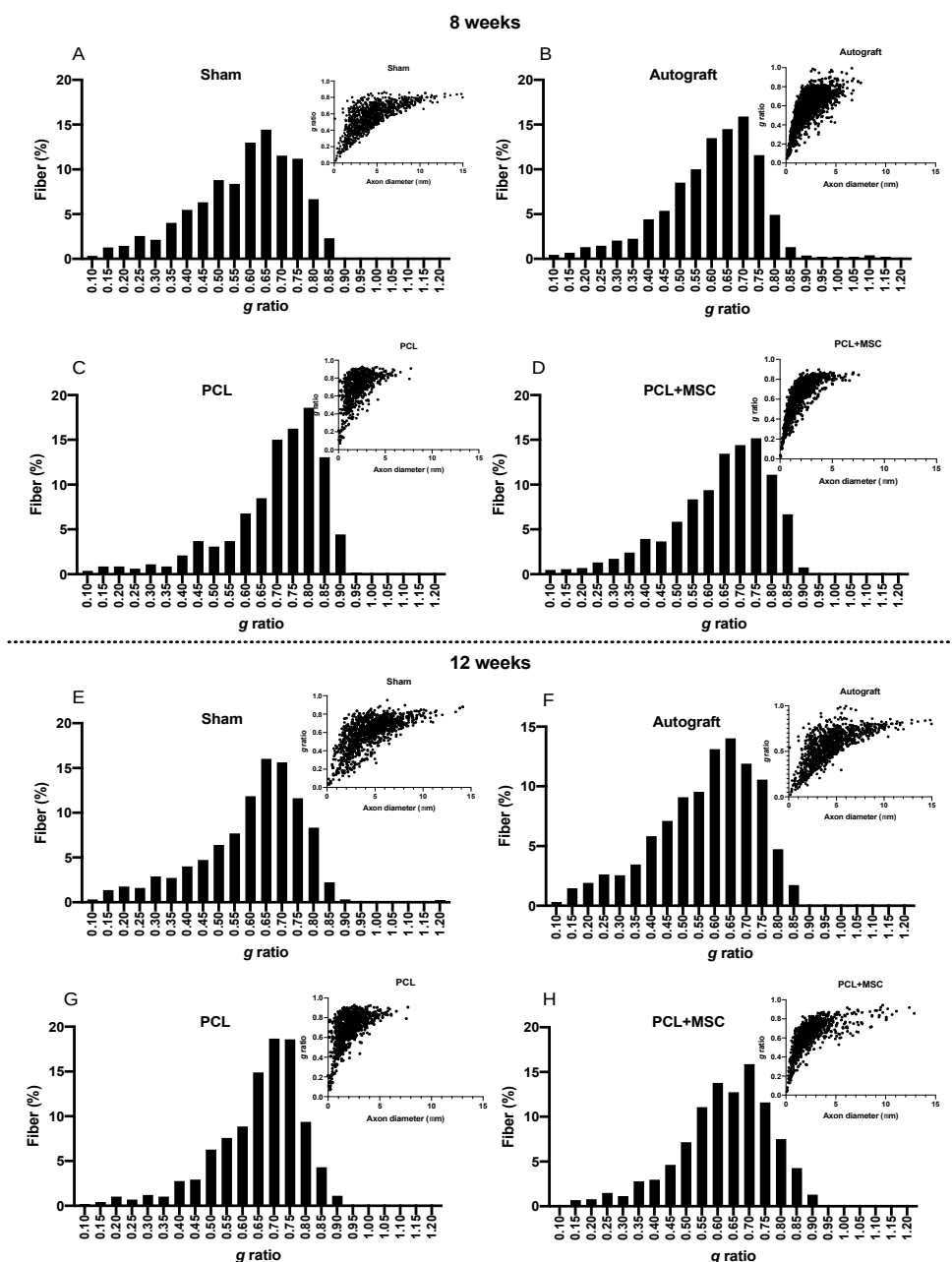


Fig 6. Frequency distribution of g ratio and dot plot of g ratio/axon diameter after 8 and 12 weeks. (**a, b, c, d**) 8 weeks after lesion in sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups. (**e, f, g, h**) 12 weeks after lesion in sham, autograft, PCL, and PCL+MSC groups. Note the shift towards an increase of diameter of myelinated axon in the autograft and PCL+MSC groups when compared to the PCL group after 8 and 12 weeks.

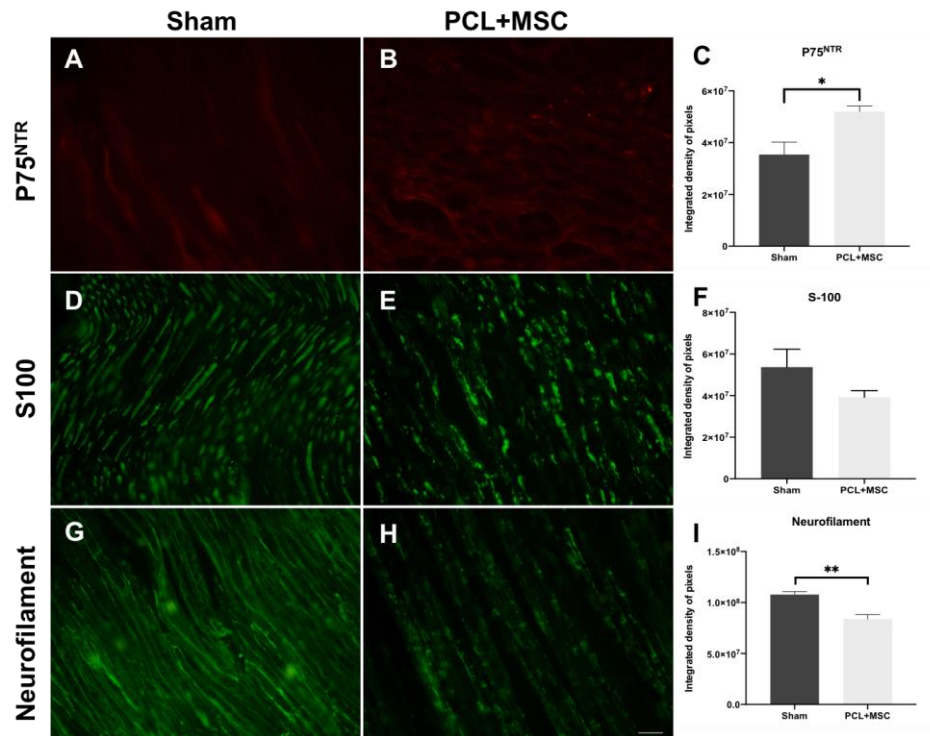


Fig 7. Quantitative analysis of the fluorescence intensity of p75^{NTR}, S100, and neurofilament in the sciatic nerve 30 days after the experimental injury and repair. (a, b) expression of the receptor P75^{NTR} in the proximal region of the nerve. (c) integrated pixel density of the P75^{NTR} receptor. (d, e) expression of the Schwann cell marker S-100 in the proximal region of the nerve. (f) integrated pixel density of S-100. (g, h) expression of neurofilament in the proximal region of the nerve. (i) integrated pixel density of neurofilament. The values of the integrated pixel density are represented as mean $\pm$ SEM. $p > 0.05$. $p < 0.033^*$; $p < 0.002^{**}$; $p < 0.001^{***}$. Scale bar: 50 μ m.

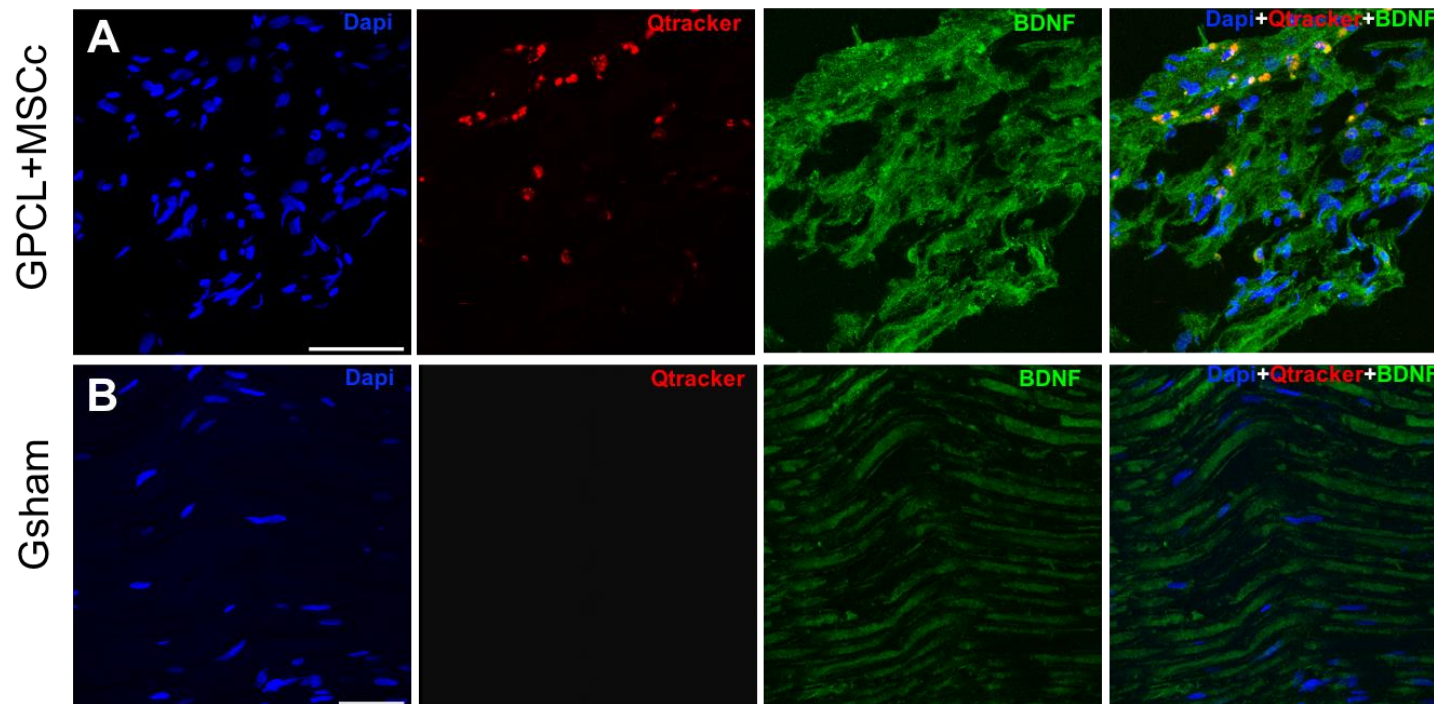


Fig 8. Qualitative analysis of BDNF immunostaining in the sciatic nerve 30 days after the lesion. **(a)** Representative images of triple labeling with anti-BDNF (green), DAPI (blue), and Qtracker® qdot655 (red) in the proximal region of the nerve. Colocalization of cells marked with qdot655 and nuclei with DAPI was observed, indicating the presence of living cells within the internal structure of the NGC. **(b)**. BDNF immunostaining in the sham group. Cells labeled with qdot655 are absent. Scale bar: 25 μ m.

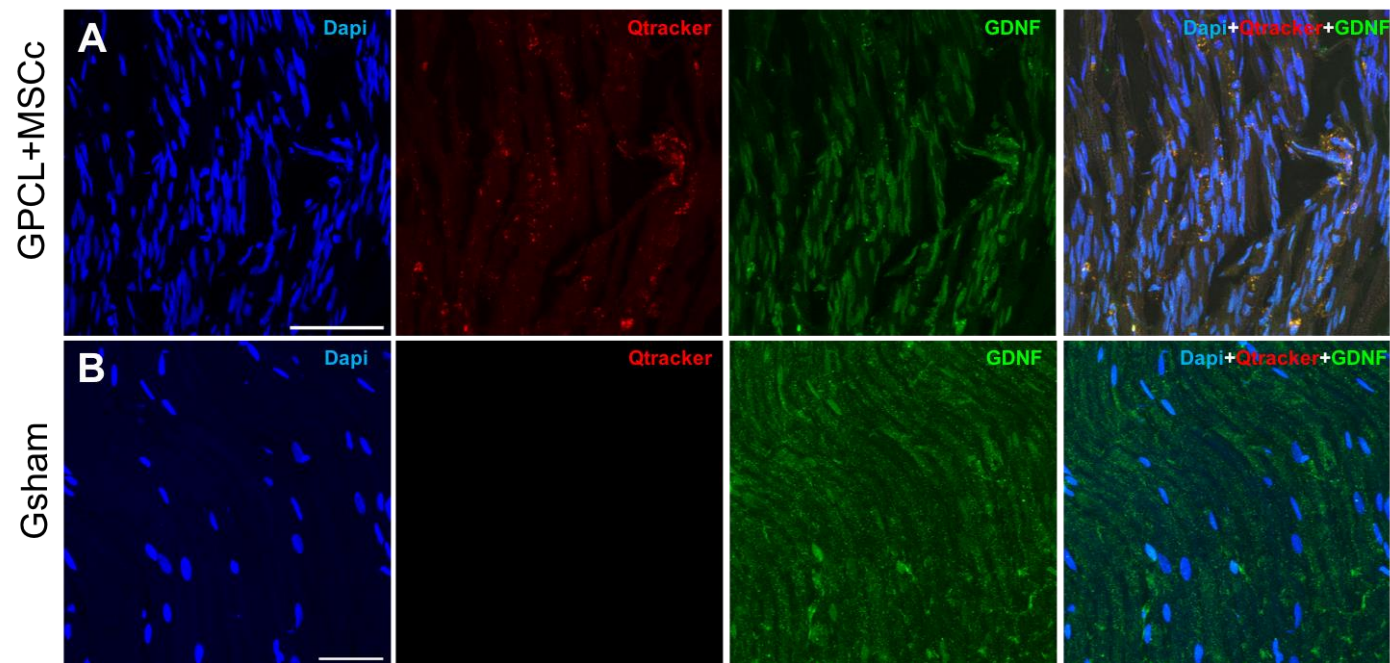


Fig 9. Qualitative analysis of GDNF immunostaining 30 days after the lesion. (a) Representative images of triple labeling with anti-GDNF (green), DAPI (blue), and Qtracker® qdot655 (red) in the proximal region of the nerve. It is important to note the reactivity of GDNF close to canine AdMSCs (b). GDNF in the sham group. Scale bar: 25 μ m.

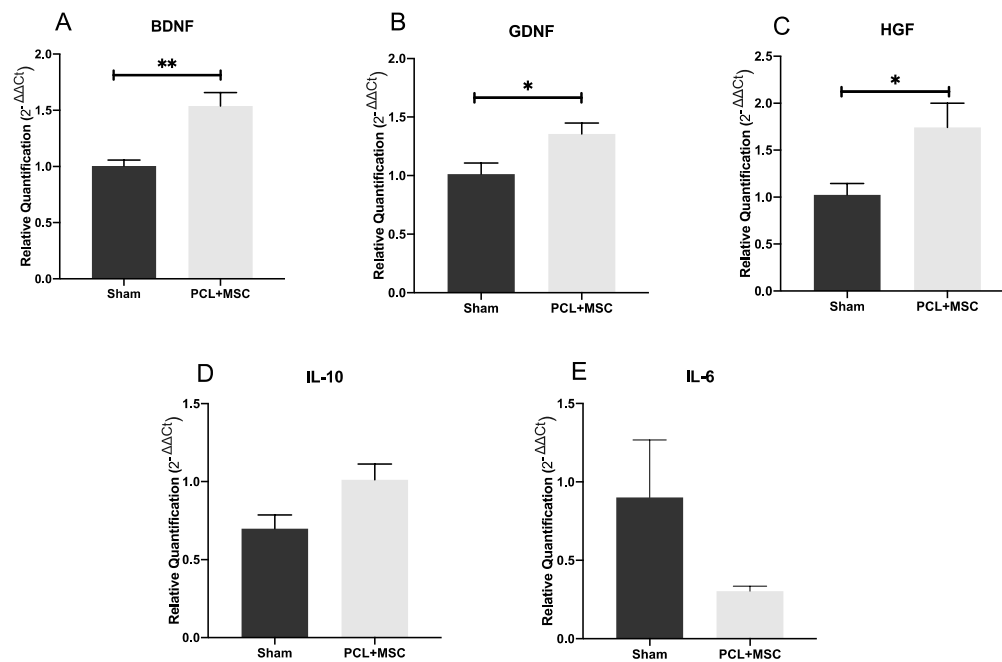


Fig 10. Gene expression in the spinal cord region ipsilateral to the lesion 30 days after nerve repair. (a-e) relative quantification of neurotrophic factors and anti-inflammatory cytokines by qPCR in sham and PCL+MSC groups. (a) *BDNF*, (b) *GDNF*, (c) *HGF*, (d) *IL-10*, and (e) *IL-6*.

ADDITIONAL FILES

Additional file 1: table S1. Primers used for qPCR. (DOCX)

Additional file 2: table S2. Primary antibodies used for Immunohistochemistry. (DOCX)

Additional file 3: table S3. Primers used for qPCR in spinal cord. (DOCX)

Additional file 4: Figure S1. Differentiation and immunophenotypic analysis of canine Ad-MSC. **(a)** Adipogenic differentiation at 14 days. Positive controls of adipogenic differentiation (insert in A). **(b)** Osteogenic differentiation at 21 days. Positive control of osteogenic differentiation (insert in B). **(c)** Chondrogenic differentiation at 21 days. Cellular micromass after differentiation. (insert in C). Dot plot graph showing the gate delimitation of the analyzed population. **(e and i)** Histograms of average fluorescence intensity versus the number of events (counts). **(e)** negative autocontrol. **(f)** CD 90+; **(g)** CD45- **(h)** CD34- and **(i)** CD 71-, respectively. Scale bar at 20x = 20 μ m; chondrogenic differentiation scale bar, 50 μ m. (PDF 48.3 MB).

Additional file 5: Figure S2. Frequency distribution of myelinated fiber diameter at eighth and twelfth week after repair of sciatic nerve. **(a, b, c, d)** Eighth week after lesion, groups Sham, autograft, PCL and PCL+MSC, respectively. **(e, f, g, h)** Twelfth week after lesion, groups Sham, autograft, PCL and PCL+MSC, respectively. Red boxes highlight frequency intervals with better percentages among autograft, PCL and PCL+MSC groups.

Additional file 6: Figure S3. Frequency distribution of myelinated axon diameter at eighth and twelfth week after repair of sciatic nerve. **(a, b, c, d)** Eighth week after lesion, groups Sham, autograft, PCL and PCL+MSC, respectively. **(e, f, g, h)** Twelfth week after lesion, groups Sham, autograft, PCL and PCL+MSC, respectively. Red boxes highlight frequency intervals with better percentages among autograft, PCL and PCL+MSC groups.

ANEXOS

Para mais informações sobre as normas da Revista “*Stem Cell Research and Therapy*” dirigir-se ao link abaixo:

<https://stemcellres.biomedcentral.com/submission-guidelines>