

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO NA
REGENERAÇÃO DO NERVO ULNAR EM EQUINOS**

Júlia de Miranda Moraes
Orientador: Luiz Augusto Batista Brito

GOIÂNIA
2012

JÚLIA DE MIRANDA MORAES

**CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO NA
REGENERAÇÃO DO NERVO ULNAR EM EQUINOS**

Tese apresentada para obtenção do
grau de Doutorado em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito – EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof.^a Dr.^a Roberta Ferro de Godoy – FAV/UnB

Prof.^a Dr.^a Veridiana M. B. D. de Moura- EVZ/UFG

GOIÂNIA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

M827c Moraes, Júlia de Miranda.
Células-tronco da medula óssea e do tecido adiposo na regeneração do nervo ulnar em equinos [manuscrito] / Júlia de Miranda Moraes. - 2012.
108 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito; Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Roberta Ferro de Godoy, Prof^a. Dr^a. Veridiana M. B. D. de Moura.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2012.

Bibliografia.

1. Equinos – Neurotomia – Terapia celular. 2. Equinos – Células mesenquimais. 3. Equinos – Células-tronco. I. Título.

CDU: 636.1:616.833-089.85

Dedico, primeiramente, ao meu irmão Valter Assis, pela impossibilidade de prosseguir com seus sonhos; aos meus sobrinhos Antônio Neto e Maria Eduarda, que são a continuidade e a lembrança dele em vida; aos meus pais; Lúcia e Bruno por todo o apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sempre iluminado meu caminho, ter me confortado nos momentos difíceis e ter me dado forças para superar as dificuldades.

Aos meus pais Maria Izeth e Antônio Assis, por todos os ensinamentos e exemplos que me deram, os quais foram os responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional. À minha irmã Lúcia Moraes, pela qual tenho profundo amor e admiração, e que é a minha maior amiga nos momentos mais difíceis.

Aos meus sobrinhos Antônio Neto e Maria Eduarda, pela alegria proporcionada em todos os dias de nossas vidas.

Ao meu amigo e companheiro Bruno Lucas Vieira, por todos esses anos de amor, apoio, dedicação e harmonia. Agradeço imensamente por ter ficado sempre ao meu lado, me confortando e me estimulando para nunca desistir.

À minha família que me deu um segundo lar em Brasília, me dando apoio, conforto e carinho familiar nesses dois anos de estadia. Aos tios e primos Irda Moraes, Áurea Moraes, Jamil Macedo, Juliana e Paulo Cardoso, Lorena e Alexandre Tostes, Lucas e Giovana, meus sinceros agradecimentos, sem os quais eu não teria conseguido executar com êxito minhas metas. Serei eternamente grata a todos os bons momentos de convivência proporcionados. Muito obrigada de todo coração!

A Valácia Lobo e Murilo Lobo, pelo companheirismo e ajuda sempre que necessário.

À minha família, pela união e apoio em todos os anos.

Ao professor Luiz Augusto Batista Brito, por ter me recebido como orientanda, e ter aceitado enfrentar novos desavios e um projeto inteiramente novo para os dois. Agradeço toda a preocupação, paciência e apoio durante os anos de orientação e convivência. Obrigada pelo seu carinho paterno e pelos ensinamentos que tem me transmitido a cada dia.

As minhas coorientadoras Roberta Ferro de Godoy e Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura, por toda a ajuda, carinho, companheirismo e orientação em todos esses anos de curso. À Veridiana, obrigada por todos os momentos de convivência, estreitando os laços de amizade já iniciados desde o mestrado. À Roberta, em especial, agradeço pela oportunidade concedida de realização deste trabalho, além da confiança depositada no dia a dia, transformando nossa convivência em uma respeitosa relação de amizade. Agradeço por todo o carinho e

atenção, esclarecimentos nos momentos de dúvidas e auxílio inigualável para execução deste projeto, fazendo um efetivo trabalho em equipe! Muito obrigada pelos bons momentos de convívio e por muitas vezes ter sido minha voz, meus olhos e em tantas outras, meu esteio.

Aos professores Eduardo Mendes de Lima e Maria Clorinda Soares Fioravanti, por todas as conversas, conselhos e ajuda em todos os momentos em que necessitei. São pessoas que realmente fizeram, e fazem, muita diferença para o meu aprimoramento profissional e também pessoal.

Às minhas queridas amigas, Cinthia Beatriz da Silva Dumont e Renata de Pino Albuquerque Maranhão por toda a imensurável ajuda e os incríveis momentos que tivemos em Brasília. Foi um privilégio conhecê-las como profissionais e amigas!

Aos meus queridos estagiários e alunas de iniciação científica Adriana Marques Faria, Juliana Vieira Flores Sales, Lucas Pereira, Martha de Oliveira Bravo e Pollyanna Cardoso Araújo, que foram simplesmente essenciais durante todas as etapas do experimento. Estiveram comigo em todos os momentos difíceis e cansativos, conciliando as suas atividades de graduação com todas as responsabilidades do projeto e ainda sim, foram extremamente competentes e responsáveis. Vocês se doaram inteiramente para que tudo desse certo e agradeço imensamente toda a colaboração e prestatividade.

Aos demais participantes do projeto em Brasília, Ceci Ribeiro Leite, Fábio Henrique Bezerra Ximenes, Guilherme Kanciukaitis Tognoli, Hetiella Harumi Hashimoto, Luis Fernando Oliveria Varanda e Mariana Carvalho Rosa, por toda ajuda prestada durante os procedimentos cirúrgicos, coleta de amostras e cultivo celular, sem os quais, indubitavelmente, não seria possível a execução do experimento. Um agradecimento especial aos amigos Fábio, Ceci e Luis Fernando, que participaram de perto de todo o projeto e hoje agradeço não só pela ajuda, mas também por toda a paciência, companheirismo e amizade.

À toda a equipe de professores, alunos e funcionários do Hospital Escola de Grandes Animais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV/UnB); Aos professores Antônio Raphael Teixeira Neto e José Renato Junqueira Borges; aos alunos Ana Maria Guerreiro Braga, Ernane de Paiva, Fernanda Assis Fonseca, João Gabriel C. Palermo, Liana Villela, Lívia Araújo da Fonseca, Lúcio Neves Huaixan, Mariana Damazio Rajão, Paulo César Villa Filho; e aos funcionários Ana Lourdes Arrais de Alencar Mota, Nildes e Paulo Rocha, meus sinceros

agradecimentos pelos dois anos de convivência diária, paciência, disposição e ajuda prestada em todos os momentos.

Às minhas grandes amigas, Aline Maria Vasconcelos de Lima, Ana Clara dos Santos Gumerato, Beatriz Peixoto Ramos, Flávia Gontijo de Lima, Giselle Bonifácio Neves Mendonça, Marina Pacheco Miguel, Liliana Borges de Menezes e Úrsula Nunes Rauecker, pela amizade fiel e sincera e atenção. Agradeço infinitamente toda preocupação que tiveram comigo nas fases tortuosas desses anos, por toda a amizade e pelas palavras de ânimo e entusiasmo que sempre me ofereceram.

Aos professores, amigos e técnico do Setor de Patologia Animal (EVZ/UFG); às professoras Ana Paula Iglesias Santin; Moema Pacheco Chediak Matos e Regiani Nascimento Gagno Porto; aos alunos Adriana Santos, Danilo Rezende, Denise Caroline Toledo, Hugo Henrique Ferreira, Marina Zimmerman, Mariana Batista Faleiro, Yandra Lobato do Prado; e ao técnico Antônio Souza da Silva por toda a amizade e auxílio que prestaram durante esses anos de excelente convivência. A Denise, um agradecimento especial por toda a prestatividade e ajuda em minhas aulas e provas, o que foi essencial nas etapas finais.

À Universidade de Brasília (UnB), ao Hospital Escola de Grandes Animais da FAV/UnB, e ao Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (Instituto de Ciências Biológicas - IC/UnB), pela ajuda prestada à execução deste projeto, tanto com a cessão das instalações como pelo acolhimento e carinho de todos os técnicos, alunos e professores de cada local. Aos professores Carolina Madeira Lucci e Ricardo Titze de Almeida e ao Médico Veterinário Richard da Rocha Filgueiras pela cordialidade, conselhos e ajuda na elaboração e execução do cultivo celular.

À Universidade Federal de Goiás (UFG), à Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ/UFG), e à pós-graduação em Ciência Animal, por permitirem o desenvolvimento deste trabalho. Aos secretários da pós-graduação, Gerson Luiz Barros e Andréia Santana, por terem sempre me recebido com atenção e carinho.

Aos quinze equinos que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida. Ao CNPq e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), pelos financiamentos concedidos para a execução do projeto.

*“Maria, Maria
É um dom, uma certa magia
Uma força que nos alerta
Uma mulher que merece
Viver e amar
Como outra qualquer
Do planeta*

*Maria, Maria
É o som, é a cor, é o suor
É a dose mais forte e lenta
De uma gente que ri
Quando deve chorar
E não vive, apenas aguenta*

*Mas é preciso ter força
É preciso ter raça
É preciso ter gana sempre
Quem traz no corpo a marca
Maria, Maria
Mistura a dor e a alegria*

*Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida...”*

Milton Nascimento

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1 Introdução.....	1
2. Caracterização do problema.....	3
2.1 Origem, fisiologia e classificação das células-tronco.....	3
2.2 Células-tronco adultas.....	7
2.2.1 Células-tronco mesenquimais.....	11
2.2.2 Células-tronco hematopoiéticas.....	12
2.2.3 Plasticidade das células-tronco adultas.....	13
2.3 Alguns componentes estruturais e moleculares do nervo periférico.....	14
2.4 Lesões nervosas periféricas.....	17
2.5 Terapia celular e sua aplicação experimental e terapêutica.....	22
2.6 Biomateriais e técnicas de reparação nervosa periférica.....	25
3 Justificativa e objetivo.....	29
Referências.....	30
CAPÍTULO 2 - REGENERAÇÃO DO NERVO ULNAR DE EQUINOS APÓS TUBULIZAÇÃO E TERAPIA CELULAR COM FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	48
Resumo.....	48
Abstract.....	48
Introdução.....	49
Material e Métodos.....	51
Colheita e isolamento da fração de células mononucleares (FCM) e cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC).....	52
Diferenciação osteogênica.....	55
Diferenciação adipogênica.....	56
Diferenciação condrogênica.....	56
Citometria de fluxo.....	57
Procedimento cirúrgico.....	57
Colheita de material e avaliação histomorfológica.....	59
Resultados.....	60
Formação do cabo de regeneração e marcação com nanocristal.....	60

Diferenciação celular das ADSC e citometria de fluxo.....	62
Hematoxilina e eosina – HE.....	63
Tricrômio de Masson.....	66
Luxol <i>fast blue</i>	67
Discussão.....	69
Conclusão.....	73
Referências	73
CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE NF, S-100, FGF-2 E GDNF NO NERVO ULNAR DE EQUINOS APÓS TUBULIZAÇÃO E TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO.....	79
Resumo.....	79
Abstract.....	79
Introdução.....	80
Material e Métodos.....	81
Colheita e isolamento da fração de células mononucleares (FCM) e cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC).....	82
Procedimento cirúrgico.....	83
Colheita de material e imuno-histoquímica.....	85
Resultados.....	88
Imuno-histoquímica.....	88
Discussão.....	91
Conclusão.....	94
Referências.....	95
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
ANEXOS.....	103

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1– CONSIDERAÇÕES INICIAIS:

FIGURA 1	Representação esquemática da propriedade de divisão das células-tronco, dando origem a células que permanecem indiferenciadas ou células que se diferenciam e amadurecem.....	4
FIGURA 2	Diferenças entre as divisões de célula-tronco (CT) e célula progenitora (CPr).....	5
FIGURA 3	Diferenciação de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais na medula óssea.....	10
FIGURA 4	Representação de diferentes possibilidades de diferenciação das células-tronco adultas (CTA), com plasticidade celular.....	14
FIGURA 5	Representação esquemática do processo de degeneração regeneração nervosa periférica.....	20
FIGURA 6	Representação esquemática da técnica de tubulização para regeneração nervosa com formação da ponte não celular de fibrina para crescimento e orientação axonal.....	26
FIGURA 7	Representação esquemática das características desejáveis em um invólucro utilizado para a tubulização na regeneração nervosa periférica.....	28

CAPÍTULO 2 - REGENERAÇÃO DO NERVO ULNAR DE EQUINOS APÓS TUBULIZAÇÃO E TERAPIA CELULAR COM FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS:

FIGURA 1	Procedimento de tubulização e aplicação do soro fisiológico, FCM e ADSC em nervos periféricos de equinos.....	58
FIGURA 2	<i>Imprint</i> em lâmina histológica do nervo ulnar de equinos no grupo FCM1, após biopsia e retirada do tubo de silicone.....	59
FIGURA 3	Biopsias de nervos ulnares de equinos submetidos à técnica de	

	tubulização e terapia celular, com 13 semanas de biopsia.....	61
FIGURA 4	Fotomicrografia de fluorescência da endocitose do nanocrystal no grupo FCM1, com marcação em vermelho, de forma discreta e moderada.....	61
FIGURA 5	Diferenciação celular de ADSC em linhagens mesenquimais.....	62
FIGURA 6	Análise dos marcadores de células-tronco mesenquimais para ADSCs de equinos por citometria de fluxo.....	63
FIGURA 7	Escores histológicos avaliados pela coloração de HE em nervos ulnares de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular.....	64
FIGURA 8	Fotomicrografia de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular, pela coloração de HE.....	65
FIGURA 9	Fotomicrografia de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular, pela coloração de tricrômio de Masson com diferentes graus de maturação de colágeno tipo I.....	66
FIGURA 10	Escores da maturação de colágeno tipo I avaliados pela coloração de tricrômio de Masson em nervos ulnares de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular.....	67
FIGURA 11	Fotomicrografia de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular, pela coloração de luxol <i>fast blue</i> , com diferentes graus de mielinização.....	68
FIGURA 12	Escores de mielina avaliados pela coloração de luxol <i>fast blue</i> em nervos ulnares de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular.....	69

CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE NF, S-100, FGF-2 E GDNF NO NERVO ULNARE DE EQUINOS APÓS TUBULIZAÇÃO E TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO:

FIGURA 1	Procedimento de tubulização e aplicação do soro fisiológico, FCM e ADSC em nervos periféricos de equinos.....	84
----------	---	----

FIGURA 2	Imunomarcação dos anticorpos NF, S-100, GDNF e FGF-2 em nervos ulnares de equinos do grupo FCM1 nas transições de coto proximal para cabo de regeneração, com a coloração em marron pela diaminobenzidinaperoxidase e suas imagens correspondentes em preto e branco convertidas pelo software Image J, para análise por densidade óptica em pixels.....	87
FIGURA 3	Padrão de marcação dos anticorpos NF e S-100 de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular.....	89
FIGURA 4	Padrão de marcação dos anticorpos FGF-2 e GDNF de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADSC -	Células-tronco derivadas do tecido adiposo
AMPc -	Monofosfato de adenosina cíclico
BDNF -	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BSA -	Albumina de soro bovino
CD -	Coto distal
CNTF -	Fator neurotrófico ciliar
CPr -	Célula precursora ou progenitora
CP -	Coto proximal
CR -	Cabo de regeneração
CSc -	Célula de Schwann
CT -	Célula-tronco
CTA -	Célula-tronco adulta
CTE -	Célula-tronco embrionária
CTEH -	Célula-tronco embrionária humana
CTH -	Célula-tronco hematopoiética
CTM -	Célula-tronco mesenquimal
DMEM -	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DW -	Degeneração Walleriana
E-CADERINA -	Molécula de adesão epitelial dependente de cálcio
FCM -	Fração de células mononucleares
FGF -	Fator de crescimento de fibroblastos
FGFr -	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos
GAM -	Glicoproteína associada à mielina
GDNF -	Fator neurotrófico derivado da glia
GGF-2 -	Fator de crescimento da glia ou neuregulina-2
HE -	Hematoxilina e eosina
HSPG -	Proteoglicano de heparam sulfato
hTGFβ3	Fator de crescimento transformador beta 3 recombinante humano
IBMX -	3-isobutil-1-metil-xantina
IL -	Interleucina
L1-CAM -	Molécula de adesão neuronal

LIF -	Fator inibitório de leucina
MBP -	Proteína básica de mielina
MEC -	Matriz extracelular
mL-	Mililitro
mM -	Milimolar
MO -	Medula óssea
NC -	Nanocristal
N-CAM -	Molécula de adesão de células neurais
N-CADERINA -	Molécula de adesão neural dependente de cálcio
NF -	Neurofilamento
Ng -	Nanograma
NGF -	Fator de crescimento neural
NT -	Neurotrofina
PBS -	Tampão fosfato salino
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaquetas
P₀ -	Glicoproteína zero
P2 -	Proteína básica
SCU -	Sangue do cordão umbilical
SFB -	Soro fetal bovino
SNC -	Sistema nervoso central
SNP -	Sistema nervoso periférico
UFC -	Unidade formadora de colônia
μM -	Micromolar
μL -	Microlitro

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a regeneração do nervo ulnar de equinos, submetidos à neurotomia, tubulização com tubo de silicone e terapia celular com fração de células mononucleares da medula óssea (FCM) ou células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (ADSC). Foram utilizados 15 equinos adultos alocados em três grupos, com cinco animais em cada: grupo controle (GC) com utilização de soro fisiológico; grupo com deposição de FCM; e grupo com deposição de ADSC. Foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico em todos os grupos, utilizando-se os dois nervos de cada animal (direito e esquerdo), e estabelecido dois momentos de biopsia: na 13^a semana com biopsia no membro direito (GC1, FCM1 e ADSC1) e na 26^a semana com biopsia no membro esquerdo (GC2, FCM2 e ADSC2). A FCM e a ADSC foram obtidas respectivamente, da medula óssea e tecido adiposo de cada animal, ambos utilizados como implantes autólogos. Após 13 e 26 semanas, realizaram-se as biopsias de todos os grupos e imediatamente, faziam-se *imprints* dos fragmentos para visualização do marcador fluorescente nanocrystal. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10%, para análise histológica, com as colorações de HE, luxol *fast blue*, tricrômio de Masson e imunohistoquímica com os anticorpos neurofilamento (NF), S-100, FGF-2 e GDNF. Microscopicamente avaliou-se a presença de proliferação axonal, tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório, células de Schwann, fatores de crescimento neurais, bainha de mielina, e degeneração walleriana. Para a análise histológica estabeleceram-se escores qualitativos e para a imunohistoquímica realizou-se análise quantitativa com o programa *Image J*. Foi observada diminuição da degeneração walleriana, melhor reorganização fascicular, aumento do colágeno novo, início de formação de bainha de mielina, além de maior marcação do anticorpo NF nos grupos experimentais em relação ao GC. O grupo ADSC apresentou melhores resultados em relação aos demais, enfatizando a eficiência das ADSCs em relação à FCM e ao GC para a regeneração nervosa periférica. Porém, há a necessidade de um tempo maior para ocorrer completa regeneração do tecido nervoso periférico após lesão.

Palavras-chave: células mesenquimais, fração mononuclear, nervo periférico, células-tronco adultas, terapia celular, tubulização com silicone.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the regeneration of equine ulnar nerves submitted to neurotomy, silicone tubing and cell therapy with bone marrow mononuclear cells fraction (MCF) or adipose derived mesenchymal stem cells (ADSC). Fifteen adult horses were divided into three groups with five animals each: control group (CG) with the use of saline solution, group with FCM deposition and group with ADSC deposition. The same surgical procedure was performed in all groups, using both nerves of each animal (right and left), establishing two moments of biopsy: on the 13th week on the right limb (CG1, MCF1 and ADSC1) and on the 26th week on the left limb (CG2, MCF2 and ADSC2). The MCF and ADSC were obtained respectively, from bone marrow and adipose tissue from each animal, both used as an autologous implant. After 13 and 26 weeks, biopsies were performed in all groups and immediately it was made some fragments slide imprints for viewing the nanocrystal fluorescent label. The fragments were fixed in 10% buffered formalin for histological analysis, with HE, luxol fast blue, Masson's trichrome, immunohistochemistry against the antibodies neurofilament (NF), S-100, FGF-2 and GDNF. Microscopically it was observed the presence of axonal growth, connective tissue, inflammatory infiltrate, Schwann cells, neural growth factors, myelin sheath and wallerian degeneration. For histologic analysis, it was established qualitative scores and for immunohistochemistry it was performed quantitative analysis with Image J program. It was observed wallerian degeneration reduction, better fascicular reorganization, new collagen increased, myelin sheath early formation, and NF antibody stronger staining in the experimental groups compared to CG. The ADSC group presented the best results than the other groups, showing ADSCs efficiency compared to MCF and CG for peripheral nerve regeneration. However, it was proved a longer time necessity to occur complete regeneration of peripheral nerve after injury.

Keywords: adult stem cells, cell therapy, mesenchymal cells, mononuclear fraction, peripheral nerve, silicone tubing.

CAPÍTULO 1– CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 Introdução

A tendência atual de pesquisar células-tronco (CT) vem, sobretudo, da esperança dessas células revolucionarem as formas de tratamentos convencionais em enfermidades que cursam com morte celular, principalmente em larga escala. Nesse contexto, alguns ensaios científicos extremamente relevantes indicaram a necessidade de mais estudos no campo da patologia comparada, como o sucesso obtido na clonagem da ovelha Dolly em 1997 pelo Instituto Roslin de Edimburgo. Posteriormente, THOMSON et al. (1998) conseguiram isolar, pela primeira vez, células-tronco embrionárias humanas (CTEH), embora em 1981, o mesmo processo já havia sido realizado em camundongos, no qual identificaram-se as potencialidades de diferenciação de tais células em todos os tipos de tecido. Em seguida, iniciaram-se estudos sobre a plasticidade das células-tronco adultas (CTA), modificando a crença de que CT são apenas linhagens restritas, o que possibilitou outra inestimável e promissora aplicabilidade terapêutica dessas células (RAFF, 2003).

As pesquisas com as CT constituem uma área bastante explorada nos diversos segmentos da biotecnologia moderna, e estão no centro da medicina regenerativa. Este crescente interesse está relacionado às possibilidades que essas células oferecem em terapias celulares, e representam uma revolução nos procedimentos de reparo e regeneração tecidual. Destaca-se ainda seu potencial terapêutico em diversas doenças para as quais ainda não há tratamento eficaz (KUMAR et al., 2005; SCHWINDT et al., 2005).

As descobertas no campo da medicina regenerativa levam a crer que, além de originar as células sanguíneas, as CTA apresentam potenciais e plasticidade para se transformarem em várias outras linhagens celulares ou simplesmente, aumentarem o potencial da regeneração em diversos tipos de tecidos (NARDI & MEIRELLES, 2006).

Desde a década de 1940, sabia-se que na medula óssea (MO) existiam células indiferenciadas capazes de repor as células maduras do sangue. No entanto, o conceito de CT consagrou-se apenas em 1961, a partir dos estudos de Till & McCulloch que demonstraram a reconstituição do sistema hematopoiético de

camundongos irradiados após o transplante de MO de camundongos normais. Isto confirmou a presença de células na MO capazes de originar todos os tipos celulares sanguíneos (NARDI & AFONSO, 2006; COLOMÉ, 2007). Devido à habilidade das células progenitoras da MO em formar colônias de vários tipos celulares sanguíneos, tais células foram primeiramente classificadas como unidades formadoras de colônias (UFC) (SELL, 2004). Desta forma, as primeiras CT caracterizadas foram as progenitoras das células sanguíneas, atualmente denominadas células-tronco hematopoiéticas (CTH) (ZAGO, 2006).

Devido a essa capacidade de reposição e proliferação celular, atualmente as CTA vêm sendo amplamente investigadas como uma fonte alternativa de células para a regeneração do tecido nervoso, por serem capazes de se renovarem com velocidade de crescimento alta e por possuírem propriedades pluri e multipotentes de diferenciação (AQUINO et al., 2006; NIE et al., 2007; KEILHOFF & FANSA, 2011).

A habilidade do sistema nervoso periférico (SNP) de se regenerar e reinervar locais denervados já é conhecida há mais de um século. No entanto, uma completa recuperação funcional raramente é alcançada, mesmo com os conhecimentos atuais sobre os mecanismos de regeneração nervosa e técnicas de microcirurgia. Os processos de regeneração nervosa e reinervação são complexos e envolvem múltiplos fatores relacionados aos neurônios, ao ambiente de crescimento e ao tecido alvo danificado. Primeiro, o neurônio deve sobreviver à lesão e poder elaborar uma resposta metabólica efetiva para iniciar a regeneração. Segundo, o ambiente de crescimento no coto distal ao local lesionado deve propiciar condições suficientes para que o processo regenerativo ocorra. E terceiro, o axônio regenerado deve ser capaz de reinervar o local alvo e este ter habilidade para restaurar esta reinervação e voltar a executar suas funções anteriores (FU & GORDON, 1997; MAKWANA & RAIVICH, 2005).

A regeneração axonal é um mecanismo extremamente complexo, e atualmente, apresenta resultados clínicos pouco satisfatórios. Assim, frente aos conceitos aplicáveis das CTA, elas surgem como uma excelente promessa terapêutica na regeneração nervosa periférica, o que vem estimulando as intensas pesquisas na área da medicina regenerativa, para avaliar seu verdadeiro potencial para a terapia celular e sua aplicabilidade clínica (KEILHOFF & FANSA, 2011; LADAK et al., 2011).

2 Caracterização do problema

2.1 Origem, fisiologia e classificação das células-tronco

A formação de tecidos e órgãos funcionais durante o desenvolvimento dos organismos multicelulares depende, em parte, dos padrões específicos de divisão mitótica da célula. Uma série destas divisões celulares é denominada linhagem celular, a qual traça a determinação progressiva das células, e restringe o seu potencial de desenvolvimento e sua diferenciação em tipos celulares especializados. A linhagem celular começa com as CT, que, potencialmente, podem originar novas CT e células especializadas, indefinidamente. Finalmente, a linhagem celular culmina na formação de células diferenciadas, como as da pele, do cérebro, do fígado, entre outras. Geralmente, essa diferenciação é irreversível e, resulta em células altamente especializadas que, muitas vezes, não podem se dividir (LODISH et al., 2005).

A denominação semântica original da expressão “células-tronco” é derivada da imagem de um tronco de planta, que cresce de forma ascendente e, continua a formar mais troncos, enquanto gera novos ramos e folhas (LODISH et al., 2005). Essas células são caracterizadas pela indiferenciação, por não apresentarem função específica nos tecidos e por serem capazes de proliferar, originar outras CT e manterem-se no estado indiferenciado por longos períodos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Esta última propriedade é denominada autorregeneração e permite que a população de CT seja mantida constante ao longo do tempo. Também apresentam capacidade de diferenciar-se em células maduras, e originar unidades especializadas com atividade funcional normal, semelhantes às do tecido original, processo este denominado diferenciação (NARDI & ALFONSO, 2006; COLOMÉ, 2007; GOMPERS & STRIETER, 2007; BYDLOWSKI et al., 2009; NIH, 2009).

Muitas linhagens celulares contêm células intermediárias, denominadas células precursoras ou progenitoras (CPr), cujo potencial de diferenciação é mais limitado que o das CT, das quais se originaram (LODISH, et al., 2005). Desta maneira, é importante distinguir as CT dos muitos tipos de CPr, já que as primeiras se autorrenovam indefinidamente, enquanto as CPr possuem autorrenovação e são potencialmente limitadas (SCHWINDT et al., 2005).

As CT exibem diferentes padrões de divisão celular, denominadas simétricas ou assimétricas. Simetricamente, produzem duas células filhas idênticas a ela e que permanecem indiferenciadas, repondo o *pool* de CT. Alternativamente, podem se dividir assimetricamente para gerar uma célula idêntica a ela e uma CT derivativa ou restrita, especializada de acordo com o microambiente local, como por exemplo, uma célula progenitora (Figura 1). Desse modo, a divisão mitótica das CT preserva uma população de células indiferenciadas, enquanto estabiliza a produção de um fluxo de células diferenciadas (SCHWINDT et al., 2005; ZAGO, 2006, COLOMÉ, 2007; GOMPERTS & STRIETER, 2007; NIH, 2009).

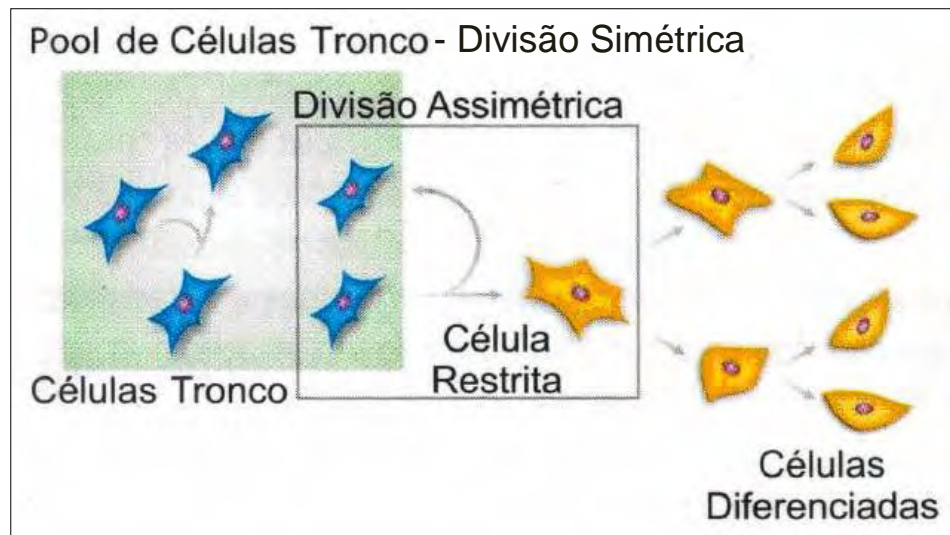


FIGURA 1 - Representação esquemática da propriedade de divisão das células-tronco, dando origem a células que permanecem indiferenciadas ou células que se diferenciam e amadurecem.

Fonte: Adaptado de ZAGO (2006).

Como a CT restrita possui capacidade mais limitada, esta se divide por um período limitado e origina um menor número de tipos celulares na progênie, em comparação à CT mãe. As células filhas originadas por divisão assimétrica se diferenciam desde o início, cada uma herdando partes diferentes da célula mãe. Essas podem diferir em tamanho, forma e/ou composição, ou seus genes podem estar em diferentes estados de atividade ou em atividade potencial (LODISH et al., 2005).

Apesar de alguns tipos de CPr poderem se dividir simetricamente, essas o fazem por períodos limitados. Entretanto, ao contrário da CT, que ao se dividir assimetricamente gera uma célula idêntica a ela e uma distinta, a CPr gera duas células filhas distintas, nenhuma delas idêntica à CPr original (Figura 2) (LODISH et al., 2005).

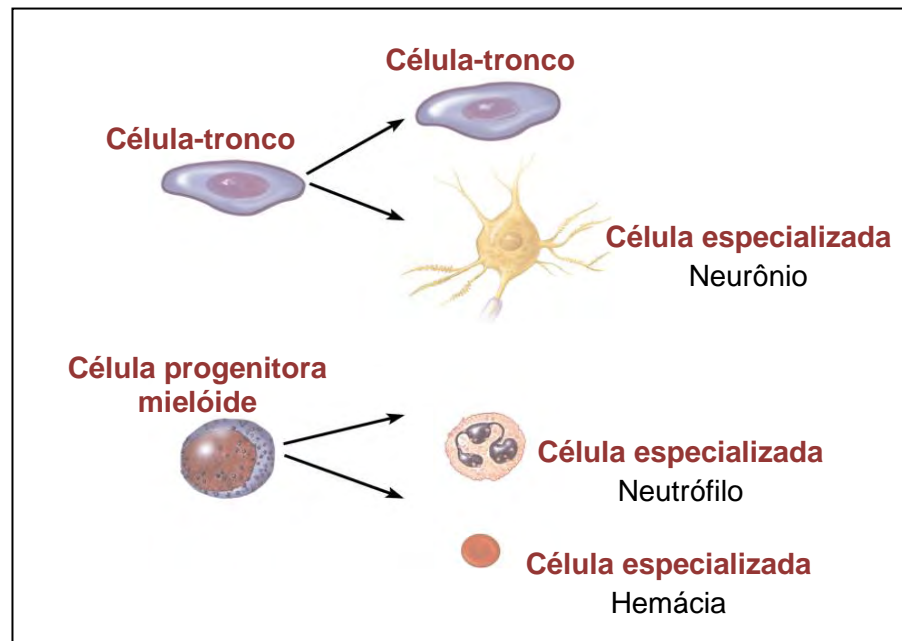


FIGURA 2 - Diferenças entre as divisões de célula-tronco (CT) e célula progenitora (CPr).
Fonte: Adaptado de NIH (2001).

De acordo com sua potencialidade de diferenciação, as CT podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes (ZATZ, 2004; BYDLOWSKI et al., 2009; NIH, 2009). Assim que a célula torna-se mais especializada, seu potencial de diferenciação torna-se limitado (SELL, 2004).

São denominadas de totipotentes as células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários, como o zigoto e o blastômero. A origem das células totipotentes são célula-ovo, óvulo fecundado ou célula obtida a partir da transferência de núcleo somático. Esse tipo celular encontra-se no ápice da hierarquia das CT, pois são as únicas células que conseguem se diferenciar em todos os tipos de tecidos, inclusive placenta e anexos embrionários (ZAGO, 2006; COLOMÉ, 2007).

As células pluripotentes podem se diferenciar em todos os tipos celulares que formam um embrião e indivíduo adulto, com exceção das membranas embrionárias, placenta e anexos embrionários. São provenientes da massa interna do blastocisto, sendo também denominadas de CT embrionárias (CTE) e são capazes de dar origem a mais de 250 tipos de tecidos do adulto. Numa fase mais avançada do desenvolvimento fetal (entre quinta e décima semana), podem ser retiradas células da região da prega gonadal que originarão unidades pluripotentes, geralmente denominadas células embrionárias germinais (SCHWINDT et al., 2005; ZAGO, 2006; COLOMÉ, 2007).

As CT multipotentes são células isoladas de vários órgãos adultos, autorrenováveis e que podem se diferenciar em múltiplos tipos celulares de órgãos específicos. Normalmente, originam células de um subgrupo de linhagens celulares do mesmo folheto embrionário, como as células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco neurais (ZATZ, 2004; MEIRELLES et al., 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006).

Existem, ainda, as células oligopotentes, capazes de gerar células mais restritas a uma linhagem que as multipotentes, e também, as unipotentes, que possuem nenhum ou limitado poder de renovação e originam apenas um único tipo celular maduro. Ambas devem ser consideradas CPr e não propriamente CT (SCHWINDT et al., 2005; COLOMÉ, 2007). As CT oligopotentes ainda carecem de pesquisas, mas é possível inferir que são encontradas no trato intestinal, enquanto as unipotentes estão presentes, por exemplo, no tecido cerebral adulto e na próstata (ZATZ, 2004; ZAGO & COVAS 2004).

Quanto à natureza, as CT podem ser caracterizadas em embrionárias, fetais e adultas (SANTOS et al., 2004; ZAGO & COVAS, 2004; ZATZ, 2004; KUMAR et al., 2005; SCHWINDT et al., 2005; BYDLOWSKI et al., 2009; NIH, 2009), cuja definição está a seguir:

- a) Embrionárias – só podem ser encontradas nos embriões e são classificadas como totipotentes ou pluripotentes, dado seu alto poder de diferenciação. Podem-se utilizar os embriões congelados ou considerados inviáveis para implantação que são descartados nas clínicas de reprodução assistida ou podem ser produzidos pela clonagem para fins terapêuticos (clonagem terapêutica).
- b) Fetais – estão presentes em abundância por todo o organismo em desenvolvimento e possuem maior potencial de autorrenovação. Teoricamente,

podem ser isoladas de qualquer tecido, desde que a extração celular ocorra durante a sua formação no período fetal. No entanto, há importantes questões éticas envolvidas na extração dessas células em fetos humanos. As CT fetais, sendo mais comprometidas a determinadas linhagens celulares, são consideradas multipotentes, com exceção das encontradas recentemente no líquido amniótico, que são pluripotentes.

c) Adultas – são extraídas dos diversos tecidos, como medula óssea, sangue, tecido adiposo, fígado, cordão umbilical e placenta, estas duas últimas consideradas células adultas devido a sua limitada capacidade de diferenciação. Também são encontradas no sistema nervoso, epitélio e outros tecidos. Entretanto, estudos demonstram que a capacidade de diferenciação das células, nesses últimos, é limitada e a maioria dos tecidos não pode ser obtida a partir delas.

Desde a última década, muitas pesquisas vêm sendo direcionadas para o isolamento e caracterização fenotípica das CT, como as descobertas dos marcadores celulares específicos e diferentes possibilidades de identificação celular. De forma geral, as CT expressam, em sua superfície, muitas moléculas associadas a interações célula-célula e célula-matriz, com as quais os mecanismos de sinalização celular são de fundamental importância no processo de diferenciação e divisão celular (SCHWINDT et al., 2005; NIH, 2009).

Neste contexto, inserem-se também as pesquisas de caracterização de CT em diversos tecidos; o reconhecimento de que estas células, principalmente da MO, possuem importante grau de plasticidade; e a averiguação de que algumas CTA em tecidos de humanos e de camundongos se assemelham à CTE (KUMAR et al., 2005).

2.2 Células-tronco adultas

Em muitos tecidos de animais adultos, há reservatórios de CT, chamadas de CTA. Na espécie humana, a primeira a ser descrita e melhor identificada foi a CTH. Enquanto as CTE são totipotentes ou pluripotentes e podem gerar quase todos os tipos celulares de um indivíduo adulto, as CTA possuem menor duração de plasticidade e capacidade mais restrita de diferenciação, sendo assim multipotentes e usualmente de linhagens específicas. Suas funções primárias são de manutenção

da homeostase tecidual e de substituição de células mortas do próprio tecido, agindo diferentemente em cada tecido em que se encontra (KUMAR et al., 2005; MEIRELLES et al., 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006).

Ao contrário das CTE, as CTA não são capazes de manter suas propriedades por longos períodos em cultura, mas também podem ser induzidas à diferenciação com a administração de fatores de crescimento apropriados ou outros sinais externos (NIH, 2001; NIH, 2009). As populações de CTA são encontradas em pequenas quantidades nos tecidos. Exemplo disso ocorre na MO, onde aproximadamente uma a cada 10.000 ou 15.000 células são consideradas CTH. Por isso, atualmente muitas pesquisas vem sendo direcionadas para o desenvolvimento de técnicas de cultura que propiciem o número de células adequado para terapias celulares com CTA (NIH, 2001; ARAÚJO et al., 2005; KUMAR et al., 2005).

A possibilidade de utilização das CTA recoloca a questão da aplicação terapêutica das CT em embasamentos totalmente novos, pois deixam de existir obstáculos importantes em relação às CTE. Por serem operacionalmente mais simples, não apresentam os problemas ético-religiosos que bloqueiam a utilização das CTE no homem, e de rejeição imunológica, ao se utilizar CT do próprio paciente adulto na regeneração de tecidos ou órgãos lesionados (SANTOS et al., 2004). Além disso, são células embriologicamente mais evoluídas e, por isso, possuem um caminho menor até a diferenciação, o que diminui o risco de desvios ontogênicos e de outros efeitos colaterais (ARAÚJO et al., 2005).

Uma grande variedade de CT e CPr vem sendo descrita como “*pools* de CT órgão-específicos” localizados em diversos tecidos, também descritos como CT teciduais ou nichos celulares, porém se conhece muito menos sobre sua origem e manutenção *in vivo*. Diferentemente das CTE, que tem sua origem definitivamente conhecida da massa interna do blastocisto, as CTA não possuem esta caracterização bem definida (KUMAR et al., 2005; NARDI & MEIRELLES, 2006).

Segundo o NIH (2001), as CTA se adaptam de alguma forma durante o desenvolvimento fetal e não evoluem para a diferenciação. Definições sobre CTA variam na literatura científica e a maioria das informações é de estudos realizados em camundongos.

Desde a década de 60, sabe-se que organismos adultos têm a capacidade de autorregenerar alguns tecidos como a pele, o epitélio intestinal e principalmente o sangue, que tem suas células constantemente destruídas e

renovadas, num processo extremamente complexo de proliferação e diferenciação celular (SANTOS et al., 2004). Este conceito de que vários tecidos e órgãos do organismo têm um estoque de CTA com uma capacidade limitada de regeneração tecidual após injúria e diferem de acordo com o tecido, é também recente. A listagem de tecidos adultos que contêm CTA está aumentando, o que inclui a MO, sangue periférico, cordão umbilical, cérebro, coluna espinhal, polpa dentária, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitélio da pele e sistema digestivo, córnea, retina, fígado e pâncreas (SANTOS et al., 2004; MEIRELLES et al., 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006)

Uma das fontes mais abundantes e utilizadas para extração de CTA é a MO, amplamente estudada devido ao uso clínico em transplantes em humanos e, recentemente, na medicina veterinária em diversas enfermidades. Nesse tecido, encontram-se principalmente dois tipos de CTA: as CTH e as mesenquimais (CTM) (SCHWINDT et al., 2005; CARSTANJEN et al., 2006; NAKAGE & SANTANA, 2006).

O conceito de que a MO possui duas principais populações de CT não é recente. O estroma medular é composto pelas células do estroma ou células estromais e pelas CTM, e está diretamente relacionado à manutenção de um microambiente, no qual as CTH se mantêm e a progênie diferenciada recebe os sinais necessários para a hematopoiese e maturação celular (ARAÚJO et al., 2005; VATS et al., 2005; GIORDANO et al., 2007).

As CTH foram reconhecidas como CT há mais de 40 anos e são responsáveis pela formação de toda a linhagem de células sanguíneas. As CTM obtiveram o mesmo conceito pouco tempo depois e são classificadas como um grupo celular capaz de originar diversos tipos de tecido como osso, cartilagem, gordura, entre outros (NIH, 2009).

Estudos revelaram que a população de CPr que se diferencia em células endoteliais dos vasos sanguíneos são isoladas na circulação periférica e identificadas como originárias da MO. Estas células se assemelham aos angioblastos formadores dos vasos sanguíneos durante o período embrionário. Porém, ainda é impreciso afirmar se esta população de CPr endoteliais realmente representa um *pool* celular de CTA da MO. Desta forma, a MO parece conter três populações de CT: as CTH, CTM (Figura 3) e possivelmente as CPr endoteliais (NIH, 2001; ARAÚJO et al., 2005).

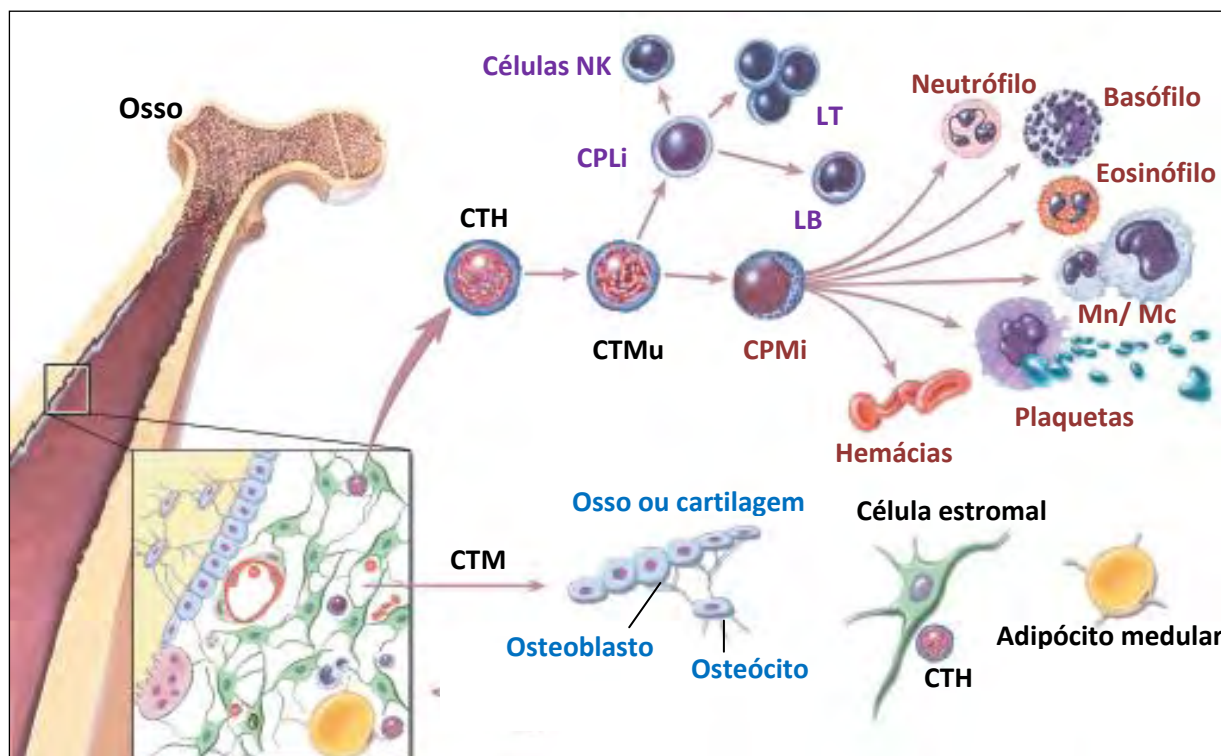


FIGURA 3 - Diferenciação de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais na medula óssea. Célula tronco hematopoiética (CTH); Célula tronco mesenquimal (CTM); Célula tronco multipotente (CTMu); Célula progenitora mielóide (CPrMi); Célula progenitora linfóide (CPrLi); Linfócitos T (LT); Linfócitos B (LB); Monócito (Mn); Macrófago (Mc).

Fonte: Adaptado de NIH (2001).

De maneira semelhante, há evidências de que a MO não contém apenas CTH pluri ou multipotencial capaz de originar as células sanguíneas, mas também uma população celular capaz de migrar para outros órgãos e regenerar diferentes tecidos não-hematopoiéticos (BIANCO et al., 2001; GIORDANO et al., 2007). Assim, o conteúdo proveniente da MO contém CT primitivas totipotentes e multipotentes que, após o transplante para outro indivíduo, podem originar células com potencialidades de se diferenciarem em vários tipos celulares, conforme a necessidade do tecido, como condrócitos, adipócitos, osteócitos (KOERNER et al., 2006), miócitos (FERRARI et al., 1998), hepatócitos (DAI et al., 2009), células beta das ilhotas pancreáticas (HOLLAND & STANLEY, 2008; LI et al., 2009), cardiomiócitos (LERI et al., 2006; UEMURA et al., 2006) e células pulmonares (GOMPERS & STRIETER, 2007).

Embora essas células derivadas da MO tenham marcação para CTH, não descarta-se a possibilidade de que estas células multipotentes sejam de origem mesenquimal. Transplantes seriados indicam que uma única célula de MO pode gerar vários tipos diferentes de tecidos, o que sugere que um precursor comum deva

existir, não somente para as linhagens mesenquimal e hematopoiética, mas também para os tipos celulares derivados da camada germinativa. Esta suposição sobre totipotência das células da MO tem reavivado o interesse nas CTA nos últimos anos. Então, é possível que a aplicação terapêutica dessa população celular seja tão promissora quanto da CTE (NARDI & MEIRELLES, 2006; GIORDANO et al., 2007).

2.2.1 Células-tronco mesenquimais

O termo CTM se refere a células com potencial de produzir uma grande variedade de tipos celulares de origem mesenquimal, como fibroblastos, miócitos, osteócitos, tenócitos, adipócitos e outros, e classificadas como multipotentes (DENIS & CAPLAN, 2004; MEIRELLES et al., 2006; MIAO et al., 2006). As CTM são facilmente isoladas, cultivadas e manipuladas *in vitro*, porém suas características ainda não estão totalmente definidas. Apresentam-se como uma população homogênea de células aderentes ao plástico que expressam proteínas específicas em sua superfície como, CD29, CD44, CD71, CD90 e CD105. De todas as formas de CTA estudadas até o presente, as CTM são as que podem ser derivadas de várias localidades e, ao mesmo tempo, têm a mais ampla capacidade de diferenciação e grande plasticidade o que ressalta sua importância na terapia celular (ZUK et al., 2002; ZAGO & COVAS, 2004; MEIRELLES et al., 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006; BROOKE et al., 2007).

Essas células podem ser encontradas no músculo, pele, tecido adiposo, fígado, MO, sangue periférico, cordão umbilical, entre outros tecidos (DENIS & CAPLAN, 2004; SCHWINDT et al., 2005; BROOKE et al., 2007). A MO possui uma quantidade relativamente pequena de CTM, o que compreende aproximadamente 0,001% a 0,01% do total de células, e este número diminui com o avançar da idade. Esse tipo celular também está presente na circulação sanguínea de fetos, porém amostras fetais podem ser mais difíceis de manipular e apresentam-se em menores quantidades que no cordão umbilical (MIAO et al., 2006).

As CTM podem se diferenciar em inúmeras linhagens celulares, como óssea, cartilaginosa, adiposa, muscular, hepática, endotelial, epitelial e neurogênica (FERRARI, et al., 1998; MCINTOSH et al., 2006; MEIRELLES et al., 2006; HU et al., 2007; NIE et al., 2007; NIXON et al., 2008; DAI et al., 2009). Devido a isso,

possuem aplicação terapêutica potencial para reparação de danos teciduais; porém, muitas vezes é necessária a expansão em cultura para obter um número celular adequado para a aplicação clínica. Apesar do grande interesse pelas CTM, ainda não existem protocolos totalmente definidos de isolamento, marcação, caracterização e identificação destas células (OLSSON, 2009).

Nos últimos anos, o tecido adiposo tem sido utilizado como uma fonte de CTM, que recebem a nomenclatura de CT derivadas do tecido adiposo (ADSC, do inglês, *adipose-derived stem cells*) e possuem fenótipo e expressão gênica semelhante às CTM da MO, e da mesma maneira, podem ser cultivadas *in vitro* (ZUK et al., 2002; PUISSANT et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2005; OGAWA, 2006; PEREIRA et al., 2008; PERONI et al., 2008). As ADSC possuem vantagens em relação aos demais tipos de CTM quanto à maior facilidade de coleta e a maior quantidade de CT disponível, e constituem cerca de 2% do total celular lipoaspirado (KINGHAM et al., 2007). As ADSC também possuem capacidade de diferenciação em diversos tecido, tornando-a uma excelente opção de utilização de CTM (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; KINGHAM et al., 2007; NIXON et al., 2008; PERONI et al., 2008).

2.2.2 Células-tronco hematopoiéticas

A CTH foi a primeira CT a ser caracterizada, isolada e utilizada terapeuticamente (RAFF, 2003; KUMAR et al., 2005; NARDI & MEIRELLES, 2006). É definida como uma célula de origem mesenquimal, multipotente, com grande capacidade de autorrenovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sanguíneas e a reconstituição da população hematopoiética a partir de uma única célula (GROTTO & NORONHA, 2003). As CTH apresentam os marcadores hematopoiéticos típicos em sua superfície, como os CD11b, CD14, CD43, CD45 e CD133 (ZUK et al., 2002; MEIRELLES et al., 2006; NAKAGE & SANTANA, 2006).

O sangue é um tecido continuamente renovado a partir das CT que estão localizadas na MO dos animais adultos. Os vários tipos de células sanguíneas derivam de um único tipo de CTH multipotente, que dá origem à CPr mielóides e CPr linfóides, com potencial mais restrito de diferenciação. A frequência das CTH na MO

é cerca de 1 a cada 10^4 células, o que constitui aproximadamente 0,05% a 0,1% da MO, e o restante composto por células estromais, CTM, CPr e células sanguíneas (NIH, 2001; RATHJEN & RATHJEN, 2004; LODISH et al., 2005).

2.2.3 Plasticidade das células-tronco adultas

Quando a CTA não diferenciada se transforma em uma célula do tecido onde habita, diz-se que houve uma diferenciação. Entretanto, a CTA igualmente tem a capacidade de se transformar em uma célula de outro tecido, mudando seu fenótipo e assumindo as características desta nova linhagem celular, até mesmo originária de outro folheto embrionário. Alguns estudos demonstram que as CTH e CTM, ambas derivadas do folheto mesodérmico, são capazes de originar células musculares mesodérmicas e células neurais ectodérmicas (NIH, 2001; ARAÚJO et al., 2005; KUMAR et al., 2005; MEIRELLES et al., 2006). No mecanismo da diferenciação celular ocorre diretamente a conversão de uma linhagem em outra, pela ativação de um conjunto de genes que altera a especificidade celular (RAFF, 2003; SCHWINDT et al., 2005). Pode-se, então, definir plasticidade como a multiplicidade de opções de diferenciação das CTA em diferentes tecidos (Figura 4) (NIH, 2001; ARAÚJO et al., 2005; KUMAR et al., 2005; MEIRELLES et al., 2006).

O primeiro relato desta propriedade de plasticidade das CTA foi feito por FERRARI et al. (1998), que demonstraram a regeneração do músculo esquelético de camundongos por células derivadas da MO transplantadas e marcadas geneticamente, essas capazes de diferenciarem-se em miócitos no ambiente muscular. Além da diferenciação, pôde-se comprovar a migração das células da MO para a área lesionada, o que, sob condições anormais, demonstra que as CTA medulares podem migrar para a regiões lesionadas do organismo (SANTOS et al., 2004). O conceito de plasticidade das CTA é de extremo valor, pois abre novas fronteiras para a utilização de ferramentas terapêuticas, que visam a engenharia de reconstrução e reparação de diversos tipos de tecidos (GROTTO & NORONHA, 2003).

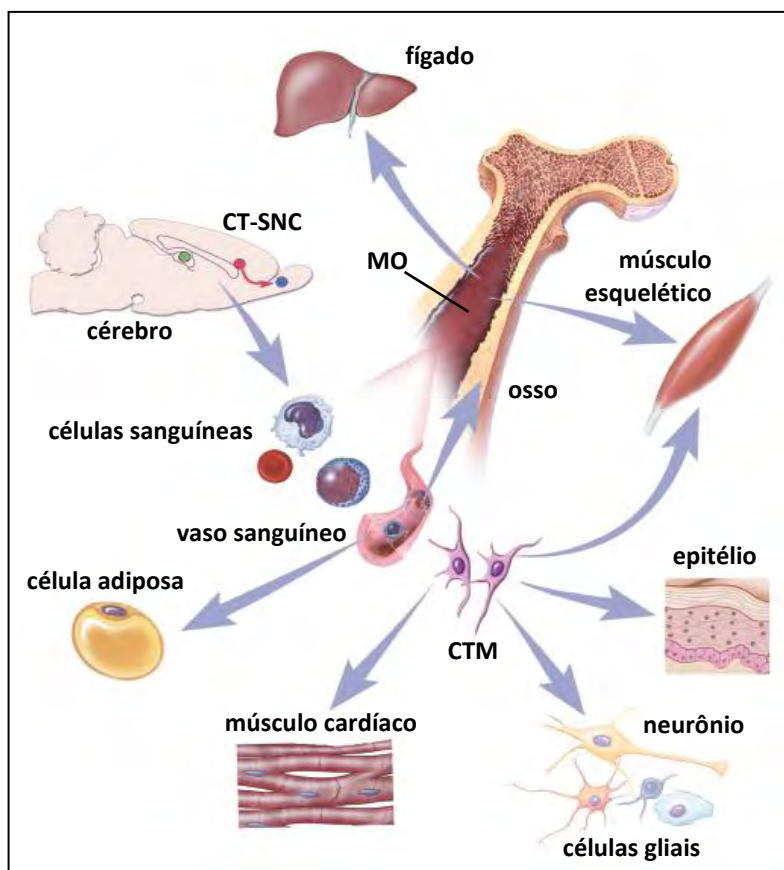


FIGURA 4- Representação de diferentes possibilidades de diferenciação das células-tronco adultas (CTA), com plasticidade celular. CT-SNC: célula-tronco do sistema nervoso central; CTM: célula-tronco mesenquimal; MO: medula óssea. Fonte: Adaptado de NIH (2001).

2.3 Alguns componentes estruturais e moleculares do nervo periférico

Um nervo periférico, estruturalmente, é composto por axônios, células de Schwann (CSc), células satélites de sustentação, fibroblastos fusiformes que produzem tecido fibrocolagenoso, componentes da matriz extracelular (MEC), vasos sanguíneos e o tecido de sustentação, subdividido em endoneuro, perineuro e epineuro. Dentre as estruturas da MEC estão o colágeno, a fibronectina e a laminina, que desempenham papel fundamental no processo de formação e regeneração nervosa. Em um nervo periférico coexistem os axônios mielínicos e amielínicos, ambos sustentados pelas CSc, em que cada uma dessas células possui uma lâmina externa bem definida que a separa do endoneuro (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997; STEVENS & LOWE, 2001; COLOMÉ, 2007).

Apesar dos aspectos moleculares, morfológicos e funcionais específicos de qualquer tipo de célula nervosa, a estrutura básica dos neurônios assemelha-se à de qualquer outro tipo celular (PURVES et al., 2005). Muitos neurônios são envoltos pela bainha de mielina, uma cobertura isolante composta por lipídeos e proteínas, produzida pelos oligodendrócitos no sistema nervoso central (SNC) e pelas CSc no SNP. A mielina de cada um desses axônios é formada a partir da membrana plasmática da CSc que se enrola múltiplas vezes ao redor do axônio (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; SCHMIDT & LEACH, 2003; BEAR et al., 2008; NOLTE, 2008).

O citoplasma neuronal é composto por proteínas organizadas na forma de fibrilas, constituindo o citoesqueleto, que possui três estruturas filamentosas principais: os microtúbulos, os filamentos intermediários ou neurofilamentos e os microfilamentos (DENT & GERTLER, 2003; ROBERTIS & HIB, 2004; KARP, 2005; LENT, 2005b).

Os neurofilamentos (NF) são os principais elementos estruturais dos neurônios, que formam uma rede tridimensional que converte o axoplasma em um gel extremamente resistente e estruturado. Possuem aproximadamente 10 nm de diâmetro e são constituídos por muitas unidades fibrilares mais finas e trançados entre si. Ao contrário dos microtúbulos e dos microfilamentos, estes não são polarizados e não estão envolvidos nas funções de transporte de substâncias, tendo papel principal de sustentação estrutural (ROBERTIS & HIB, 2004; BEAR et al., 2008; NOLTE, 2008).

Os NF são compostos por três grupos disitintos de proteínas: NF-L, NF-H e NF-M. Esses dois últimos polipeptídeos possuem prolongamentos que se projetam para a superfície, que mantêm as propriedades de espaçamento entre os neurofilamentos paralelos do axônio. Em estágios iniciais de diferenciação, quando o axônio em crescimento se direciona para a célula-alvo, este contém poucos NF, mas um grande número de microtúbulos. Logo que as células nervosas atingem com sucesso a região-alvo, são preenchidas com NF que proporcionam sustentação, assim como aumento acentuado no diâmetro do axônio (KARP, 2005).

A CSc é considerada a célula da glia do SNP e, durante sua diferenciação em células mielinizantes, as CSc ativam uma série de genes específicos que codificam proteínas, as quais iniciarão o processo de formação da mielina. Estas são assim divididas em grupos “maior” e “menor”, de acordo com a abundância de sua expressão. Dentre as proteínas do grupo “maior” estão a glicoproteína zero (P_0) e a

proteína básica de mielina (MBP) e no grupo “menor” constituem a proteína básica P2, e a glicoproteína associada à mielina (GAM). As proteínas P₀ e P2 são específicas das CSc e as proteínas MBP e GAM são encontradas em CSc e em oligodendrócitos. A P₀ é o componente estrutural mais abundante da mielina no SNP, constitui mais de 50% da porção externa da bainha de mielina e são restritas às CSc mielinizantes. A MBP não é uma proteína integral da membrana, e contempla cerca de 5% a 15% da mielina do SNP e 30% no SNC; porém é mais facilmente analisada. Já a GAM está presente apenas nas regiões não compactadas da bainha de mielina e sua expressão é detectada nos primeiros estágios da mielinização (YIN et al., 2001; MARQUES, 2005). A S-100 é uma proteína citoplasmática presente de forma abundante nas CSc, principalmente nas que se encontram em alguma fase de migração celular. Devido a essa facilidade de marcação, é uma proteína extremamente utilizada para a identificação das CSc (TORIGOE et al., 1996).

A relação entre CSc e o axônio ocorre em quatro situações: a primeira envolve mecanismos de adesão celular; a segunda com a regulação da proliferação da CSc pelo neurônio; a terceira pela influência dos neurônios na produção da MEC pela CSc; e a última com o papel do neurônio em iniciar a mielinização das CSc e manter a bainha de mielina (IDE, 1996).

A deposição de lâmina basal e a proliferação das CSc também estão sob o controle do axônio, e parece ser dependente de contato físico entre os dois componentes. A sua divisão ocorre lentamente na ausência do axônio, enquanto se torna extremamente mais rápida na sua presença. Muitas dessas características fenotípicas das CSc, reguladas pelo axônio, são reproduzidas por agentes que elevam os níveis intracelulares do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), este, um potente estimulador da divisão celular e indutor parcial da expressão do gene de mielina maior. Acredita-se que o AMPC estimule a expressão, pela Csc, dos genes que codificam os receptores para alguns fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês, *platelet derived growth factor*), fator de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês, *fibroblast growth factor*) e fator de crescimento neural (NGF, do inglês, *nerve growth factor*), este último um marcador de fase pré-mielinizante da CSc. Sabe-se ainda, que a CSc mielinizante depende fundamentalmente do axônio para se diferenciar e necessita, então, do

contato direto para ocorrer a aquisição e manutenção do fenótipo mielinizante (IDE, 1996; MARQUES, 2005).

2.4 Lesões nervosas periféricas

Existem vários tipos de lesões atribuídas aos nervos, o que, numa lesão traumática esses são frequentemente comprimidos, distendidos e algumas vezes rompidos. Quando o nervo encontra-se exposto, pode estar seccionado, lacerado ou comprimido. Em quaisquer dos exemplos citados, a lesão do nervo provoca alterações orgânicas ou funcionais no músculo e na pele que é inervada. (ROSA FILHO, 2004). Diante disso, Sedon em 1943 definiu três tipos de alterações patológicas em lesões traumáticas de nervo: neuropraxia, axonotmese e neurotmeese. Esta classificação é baseada no grau de ruptura das estruturas internas do nervo, que está relacionada com o prognóstico de recuperação (DOURADO et al., 2003).

A forma mais branda de lesão nervosa é a neuropraxia, caracterizada por desmielinização segmentar das fibras nervosas de grande calibre, sem interrupção axonal, levando ao comprometimento da condução nervosa por tais fibras. Na neuropraxia existe apenas um bloqueio capaz de causar paralisia, porém não há degeneração. Terminado o bloqueio, observam-se regeneração completa dos axônios, de sete a 21 dias, sem sequela. Já na axonotmese, há comprometimento parcial dos axônios na bainha de mielina, porém o epineuro permanece contínuo e, dessa maneira, poderá ou não haver regeneração da fibra nervosa. Na neurotmeese pode ocorrer a interrupção completa do nervo, sem possibilidade de regeneração, o que somente a cirurgia e a aproximação das extremidades poderão favorecer a regeneração dos axônios seccionados (RIBEIRO & CASSOL, 1999; BURNETT, 2004; PORTEY & ROY, 2004).

Após lesão em um axônio no SNP, o segmento axonal situado distalmente ao ponto de transecção não recebe mais suprimento a partir do corpo celular do neurônio e ocorre entrada de grande quantidade íons cálcio (Ca^{+2}) na fibra, interrompendo a transmissão sináptica. Neste segmento, o axônio e a bainha de mielina degeneram-se e as CSc permanecem viáveis, mas sofrem diferenciação. Os axônios e a bainha de mielina fragmentam-se em pedaços menores, são

fagocitados e removidos por macrófagos e pelas próprias CSc e, a expressão de genes para a mielina é dramaticamente diminuída. Essa sequência de eventos é referida como degeneração Walleriana (BURNETT, 2004; LENT, 2005a; NOLTE, 2008; STOPIGLIA & PEDRO, 2009). No coto proximal da fibra nervosa, o axônio sofre degeneração semelhante até o próximo nódulo de Ranvier, em direção retrógrada (STOPIGLIA & PEDRO, 2009).

Nesta etapa, as CSc passam a expressar genes típicos da fase pré-mielinizante, os quais codificam canais de sódio voltagem sensitivos, a molécula de adesão de células neurais (N-CAM, do inglês, *neural cell adhesion molecules*) e receptores para o NGF. Em nervos seccionados, as CSc continuam a expressar esses genes, até que sejam novamente contatadas pelos axônios em regeneração. As moléculas, N-CAM, molécula de adesão neuronal (L1-CAM, do inglês, *neuronal cell adhesion molecule*) e a GAM estão reduzidas durante a degeneração walleriana, sugerindo a contribuição na interação entre membranas ou entre as células e a MEC, que auxiliam na regeneração axonal (FU & GORDON, 1997; BOYD & GORDON, 2003; MARQUES, 2005).

Quanto mais distal do corpo celular a lesão ocorrer, melhor será, e isso depende do tipo e da extensão da lesão, bem como da vitalidade dos tecidos circundantes ao nervo periférico (COLOMÉ, 2007). Se houver lesão próxima ao corpo do neurônio poderá ocorrer morte por apoptose do corpo celular. Entretanto, havendo restabelecimento deste, a fibra nervosa poderá apresentar regeneração (MULLER & STOLL, 1999; BELKAS et al., 2004; STOPIGLIA & PEDRO, 2009).

Nesse processo de regeneração da fibra nervosa periférica as CSc apresentam papel fundamental. Com a extrusão inicial da bainha de mielina no coto distal, essas células são estimuladas, principalmente pelo fator de crescimento da glia ou neuregulina-2 (GGF-2, do inglês, *neuregulin glial growth factor 2*) a proliferarem e dividirem-se, alinhando-se dentro do tubo da lâmina basal para formar uma coluna chamada de banda de Bungner. Dispostas em colunas, as CSc propiciam um tropismo mecânico, guiando os axônios em regeneração aos seus alvos (GRIFFIN & HOFFMAN, 1993; MARCHIONNI et al., 1993; TORIGOE et al., 1996; MULLER & STOLL, 1999; TERENCEHI, 1999; DAHLIN & BRANDT, 2004).

Antecedendo ao encontro do axônio com seu alvo, no segmento proximal do axônio, muitos brotamentos (neuritos) emergem, formando o cone de crescimento, acompanhado de filopódios. Esses são orientados pelo contato com as

glicoproteínas da MEC das CSc, entre elas a laminina, o colágeno, a fibronectina e proteoglicano de heparan sulfato (HSPG), além das moléculas de adesão, como N-CAM, L1-CAM, molécula de adesão neural dependente de cálcio (N-caderina, do inglês, *neural cell calcium-dependent adhesion molecule*) e molécula de adesão epitelial dependente de cálcio (E-caderina, do inglês, *epithelial cell calcium-dependent adhesion molecule*) (IDE, 1996; TERENCEHI, 1999; DAHLIN & BRANDT, 2004; STOPIGLIA & PEDRO, 2009). Neste processo, os macrófagos presentes no nervo iniciam a fagocitose dos elementos em degeneração, também sintetizam e liberam interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), as quais atuam como agentes quimiotáticos para as CSc (COLOMÉ, 2007).

Em adição, para que ocorra o crescimento do cone, faz-se necessária a presença de substâncias que auxiliem na sobrevivência, extensão e maturação do axônio. Essas substâncias são os fatores de crescimento, ou também chamados de fatores tróficos. Em nervos normais intactos, esses fatores são produzidos nos órgãos alvos e conduzidos ao corpo celular do neurônio por transporte retrógrado. Se ocorrer interrupção da comunicação entre o axônio e o corpo celular por alguma lesão, as CSc produzem esses fatores com função de proteger os neurônios e estimular a regeneração, incluindo neurotrofinas como NGF, fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, do inglês, *glial cell line-derived neurotrophic factor*), FGF, fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*), neurotrofinas 3, 4/5, 6 e 7 (NT-3, NT-4/5, NT-6 e NT-7), fator neurotrófico ciliar (CNTF, do inglês, *ciliary neurotrophic factor*), fator inibitório de leucina (LIF, do inglês, *leukemia inhibitory factor*) e IL-6 (DODD & JESSELL, 1988; ACHESON et al., 1991; DISTEFANO et al., 1992; LEWIN et al., 1997; LEE & WOLF, 2000; BLOCH et al., 2001; SOFRONIEW et al., 2001).

Desta forma, os cones de crescimento, orientados por seus neuritos, crescem em direção distal, até atingirem o local da lesão, conectando-se com o segmento distal do nervo, que apresenta seus tubos endoneurais prontos para receber o axônio em regeneração. Quando ocorre o contato entre o axônio e as CSc, recapitula-se a diferenciação dessas células, tal como ocorre durante o seu desenvolvimento normal: extingue-se a expressão dos genes de receptores de NGF e da N-CAM e os genes para a mielina são ativados, estimulando a remielinização dos axônios já regenerados. A partir deste processo, a transmissão eletroquímica entre o corpo celular e o órgão alvo é refeita (FAWCETT & KEYNES, 1990; IDE,

1996; MARQUES, 2005). Além disso, o corpo do neurônio cromatótico recupera sua aparência original (KANDEL et al., 2003). Resumidamente, o processo de regeneração nervosa está esquematizado na figura 5.

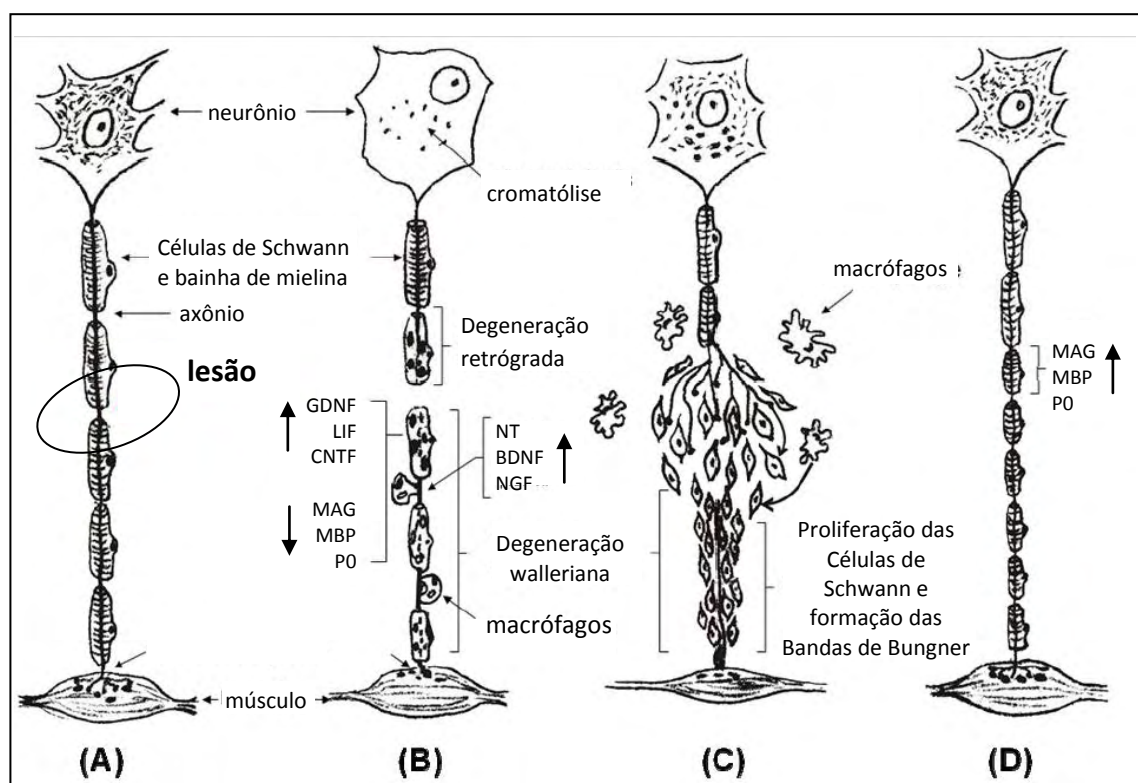


FIGURA 5 - Representação esquemática do processo de degeneração e regeneração nervosa periférica. A: Lesão no nervo periférico normal; B: processo de degeneração retrógrada e walleriana; C: formação dos cones de crescimento axonais e Bandas de Bungner; D: encontro dos axônios ao alvo distal e início de formação da bainha de mielina. GDNF: fator neurotrófico derivado da glia; LIF: fator inibitório de leucina; CNTF: fator neurotrófico ciliar; MAG: glicoproteína associada à mielina; MBP: proteína básica da mielina; PO: proteína zero; NT: neurotrofinas; BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo; NGF: fator de crescimento do nervo.

Fonte: Adaptado de STANG et al. (2009).

Um dos fatores mais importantes no desenvolvimento neuronal, é que essas células dependem de uma quantidade mínima de fator trófico para sobreviverem e, subsequentemente, para a persistência de conexões-alvo. Portanto, a morte neuronal também pode ser causada pela privação dos fatores neurotróficos, que são proteínas expressadas e produzidas nas proximidades neuronais, pelos tecidos alvo, pelas células gliais, pelos fibroblastos e por macrófagos. A CSc é a principal fonte dos fatores neurotróficos na regeneração axonal e está

particularmente envolvida no processo de degeneração walleriana onde produz uma grande variedade destes fatores (IDE, 1996; FU & GORDON, 1997; BOYD & GORDON, 2003). Os fatores neurotróficos são sempre sistetizados nos tecidos alvo e levados ao corpo celular dos neurônios via transporte retrógrado, onde será efetivada a função de sobrevivência celular (TERENGI, 1999). Além das neurotrofinas, há outros fatores tróficos importantes como fator FGF, GDNF, CNTF, LIF e GGF-2 (ECKENSTEIN et al., 1991; MARCHIONNI et al., 1993; KOPP et al., 1997; TERENGI, 1999; GORDON, 2010; MADDURI & GANDER, 2012).

O FGF é produzido na maioria das células do corpo e atua principalmente pelo receptor de FGF (FGFr, do inglês, *fibroblast growth factor receptor*) sobre a membrana celular. O HSPG se liga ao FGF, o que é necessário para ocorrer a interação e sinalização do FGF com FGFr (KANG et al., 2012). Segundo JENNY et al. (2009), o FGF parece desempenhar um papel chave na manutenção da autorrenovação das CT e progenitores neurais *in vitro* e manutenção de populações imaturas proliferativas em nichos neurogênicos *in vivo*. Em um estudo anterior, esses autores desenvolveram um novo sistema para superexpressar FGF-2 em células progenitoras neurais transplantadas, e mostraram que esta manipulação melhora significativamente a capacidade dessas células para gerar um *pool* de progenitores e neurônios imaturos. Assim, além de ajudar na sobrevivência neuronal, o FGF também estimula a mitogênese das CSc (ECKENSTEIN et al., 1991).

Um dos fatores neurotróficos muito importantes expressos pela CSc é o GDNF, um fator específico dessas células, que auxilia na sobrevivência neuronal, além da mielinização de axônios motores e sensitivos. Embora as CSc não expressem os receptores específicos de alta afinidade para o fatores neurotróficos, como ocorre nos neurônios axotomizados, elas expressam o receptor p75, que é comum para os fatores neurotróficos, além da ligação com o receptor Ret tirosina quinase (GOULD & ENOMOTO, 2009; GORNDON, 2010).

Acredita-se que este fator reduz naturalmente a morte neuronal em lesões axonais motoras e sensoriais. O GDNF foi caracterizado como 75 vezes mais potente que outras neurotrofinas no apoio à sobrevivência de motoneurônios embrionários de ratos purificados em cultivo. *In vivo*, o GDNF previne a atrofia e auxilia o retorno normal de neurônios motores que tenham sido privados dos fatores tróficos de sobrevivência, por axotomia (JONHNSON et al., 2008).

Apesar de, tanto a secreção, como a presença dos fatores tróficos serem essenciais no processo regenerativo nervoso, a interação entre a membrana da CSc e o cone de crescimento é mediado pelas CAM. Isso sugere que o NGF e os outros fatores secretados pelas CSc potencializam a regeneração axonal por fazer uma hiperegulação da expressão das CAM (TERENGI, 1999).

2.5 Terapia celular e sua aplicação experimental e terapêutica

Nos últimos anos, a medicina regenerativa vem evoluindo, e com isso, emergindo perspectivas inovadoras, principalmente para o tratamento de doenças crônico-degenerativas. Essa terapia consiste na utilização de células, biomateriais e fatores de proliferação e diferenciação celulares que auxiliam o organismo na reparação de tecidos lesionados (SANTOS et al., 2004; NIH, 2009). Segundo ZAGO & COVAS (2004), a grande maioria das pesquisas conduzidas com CT focaliza aspectos básicos da fisiologia celular e sua capacidade de diferenciação em tecidos diversos, e uma parcela menor focaliza a sua aplicação clínica em modelos animais.

Segundo BYDLOWSKI et al. (2009a), na neurologia, as propostas para utilização de CT são várias, como o reparo de danos na medula espinal, por meio da reposição das células neurais e da diferenciação em neurônios motores com possibilidade de reverter quadros de paralisia. De forma similar, atuaria no acidente vascular cerebral, que, dependendo do tipo de lesão, também pode levar a uma paralisia incapacitante. Outras possibilidades são a utilização na regeneração de nervos periféricos (CORONEL et al., 2006; KEILHOFF et al., 2006; HU et al., 2007; NIE et al.; 2007), esclerose lateral amiotrófica e doença de Alzheimer (GIORDANO et al., 2007; BYDLOWSKI et al., 2009a).

A forma mais comum de tratamento com CT, realizada desde 1959, é o transplante de CTH da MO, de sangue de cordão umbilical (SCU) ou de sangue periférico, que é largamente empregada para tratar leucemias, linfomas, algumas doenças hereditárias e falência de MO, como anemia aplástica e doenças autoimunes (ZAGO & COVAS, 2004; CANESIN, 2005; GIORDANO et al., 2007; BARACHINI et al., 2009).

Segundo NAKAGE & SANTANA (2006), os primeiros estudos de transplante de CT em cães foram realizados na década de 1980. Cães como

modelos experimentais tem propiciado a obtenção de informações importantes no transplante de progenitores hematopoéticos autólogos e alogênicos, permitindo a transposição desses achados experimentais para os seres humanos. Além disso, as CTH de cães revelaram-se fenotipicamente e funcionalmente semelhante às CTH de humanos e camundongos, o que indica que o modelo canino é aplicável ao estudo de CT em humanos.

Ainda, a porcentagem média de células CD34⁺ relativas à CTH de cães é de 11,09% no SCU, 10 a 18% na MO de animais com duas a três semanas de idade e menos de 5% na MO de animais com mais de três meses de idade, indicando que a porcentagem de células CD34⁺ de cães declina com a idade (NAKAGE & SANTANA, 2006).

O transplante de CTH do sangue periférico e MO revelaram o potencial terapêutico das CTH em cães com linfoma, doenças genéticas (STELZNER et al., 2003), vasculares (MATSUMURA et al., 2003) e do tecido ósseo (ARINZEH et al., 2003). Portanto, os modelos experimentais das CTH em cães têm propiciado informações pré-clínicas de extrema importância para os transplantes de CTH em humanos e animais (CANESIN, 2005; NAKAGE & SANTANA, 2006).

Pesquisas demonstram que as CT com maior potencial proliferativo para o transplante são as CTE, seguidas pelas células do SCU, MO do adulto e sangue periférico. Apesar do número de CTH funcionais no SCU humano ser dez vezes menor que na MO, a capacidade proliferativa destas células é superior àquelas provenientes da MO e do sangue periférico. Assim, pode-se obter sucesso no transplante de CT do SCU humano com um décimo da quantidade amostral necessária para o transplante de MO (CANESIN, 2005).

A utilização terapêutica e experimental de CTM para reconstituição de tendões e ligamentos em equinos e coelhos já está sendo realizada há alguns anos e demonstrou a possibilidade real de incremento nas propriedades mecânicas destas estruturas, o que comprovou a diferenciação dessas células em tenócitos com boa regeneração tecidual (BARREIRA, 2005; SUTTER, 2007; NIXON et al., 2008; OLSSON, 2009; SCHNABEL et al., 2009; SOUZA et al., 2009). A associação de moldes de colágeno ou biomateriais similares às culturas de células adultas ou fatores de crescimento são, também, possibilidades reais de utilização e associação com as CTA (BARREIRA, 2005; OLSSON, 2009).

Em tecido ósseo, os principais alvos terapêuticos das CT são a osteoporose em humanos e as fraturas em animais. Neste caso, as CT seriam utilizadas para reconstituir o osso com células novas e funcionais. Em lesões articulares com perda ou deformação de discos cartilagosos, os estudos mostram melhora das articulações pela infusão de condrócitos ou, ainda, pela reconstrução *in vitro* com a utilização de arcabouços tridimensionais (KRAUS & KIRKER-HEAD, 2006; ZAMPROGNO, 2007; BYDLOWSKI et al., 2009a). A utilização de CTM e ADSC para diferenciação em células condrogênicas e osteogênicas para reparação cartilaginosa e óssea tem sido aplicada experimentalmente em Medicina Veterinária, ainda com pouca aplicação clínica, diferentemente de tendões e ligamentos, já utilizado na rotina clínica há alguns anos (SUTTER, 2007; SOUZA et al., 2009).

VIDAL et al. (2007), KISIDAY et al. (2008), VIDAL et al. (2008) e FRISBIE et al. (2009) isolaram e promoveram diferenciação *in vitro* de CTM de equinos em linhagem condrogênica e osteogênica, verificaram a potencialidade de diferenciação celular, e confirmaram assim a real possibilidade de utilização destas CT em terapias regenerativas de osso e cartilagem. Em estudo realizado por ARINZEH et al. (2003), foi observada regeneração do osso fêmur de cães após a retirada de fragmento e utilização de CTM medular. Já ZAMPROGNO (2007), em aplicação clínica, utilizou CTM também de origem medular, em cães com fraturas com não-união há mais de um ano, e todos os animais apresentaram consolidação da fratura em até três meses após a injeção das células.

A experimentação laboratorial envolvendo as CTA evolui rapidamente e aponta múltiplas possibilidades para reparação tecidual e aceleração dos processos regenerativos. No entanto, permanece o problema científico sobre a verdadeira implantação das CT nos tecidos-alvo, por ainda não existirem marcadores celulares específicos. Com o avanço da nanotecnologia, houve o desenvolvimento dos nanocristais (NC), que inovaram a marcação celular e resolveram, em grande parte, as dificuldades de identificação e rastreamento celular (DUBERTRET et al., 2002; GOWDAK et al., 2004).

Os NC, também denominados *quantum dots*, são materiais semicondutores, emissores de luz brilhante, adotados como marcadores fluorescentes que podem ser facilmente detectados por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo, mesmo medindo cerca de 2 a 6 nm (PARAK et al., 2002; MATTHEAKIS et al., 2004; ALIVISATOS et al., 2005). São bem resistentes

à perda de brilho, o que os torna notadamente favoráveis na marcação de células e tecidos vivos por longo período de tempo (MATTHEAKIS et al., 2004). Essa marcação é decorrente da internalização destas nanopartículas, por meio de reações mediadas por receptor ou endocitose não-específica e, após a entrada na célula, permanecem em vesículas no citoplasma, na região perinuclear. Os NC podem ser transferidos às células-filhas por até seis gerações, e não às células adjacentes da população tecidual, o que permite avaliar precisamente o efetivo de CT presentes no local. Sabe-se, ainda, que essas nanopartículas não apresentam toxicidade celular, já comprovado em ensaios experimentais com embriões, em diferenciação e sinalização celular, o que possibilita a utilização *in vivo* desses materiais (DUBERTRET et al., 2002; MATTHEAKIS et al., 2004; ALIVISATOS et al., 2005).

Os mecanismos de reparo com a utilização das CT ainda são controversos e não estão totalmente definidos. No entanto, essas células vêm sendo amplamente testadas em experimentos e também em algumas aplicações clínicas, o que necessita cada vez mais de pesquisas, tanto para garantir a segurança em utilizá-las, como para otimizar todo o seu potencial terapêutico. Todos esses estudos preliminares servem como um reflexo de como o grande arsenal de CT poderá ser aplicado clinicamente no futuro (NIH, 2009).

2.6 Biomateriais e técnicas de reparação nervosa periférica

A biotecnologia e a engenharia de tecidos representam uma abordagem multidisciplinar para resolver alguns dos mais exigentes problemas na medicina regenerativa, que é a criação de novos tecidos semelhantes aos do organismo vivo. Estas novas abordagens técnicas incluem estratégias na utilização de novas formulações de polímeros sintéticos, condutos biológicos, assim como diferentes alternativas na regeneração de tecidos (JONHNSON et al., 2008).

A reparação de lesões em nervos periféricos continua a ser um grande desafio na medicina regenerativa e na microcirurgia. Apesar dos progressos feitos em técnicas cirúrgicas, ao longo dos últimos 30 anos, a recuperação funcional após uma lesão grave em um nervo periférico é frequentemente incompleta e insatisfatória, sendo que a recuperação funcional após o reparo cirúrgico de nervos mistos é ainda mais decepcionante. Com o intuito de garantir uma melhora na

regeneração nervosa e também de outros tecidos, muitas pesquisas vem aprimorando e inovando as técnicas cirúrgicas com a utilização de diversos biomateriais, fatores de crescimento e terapias celulares como as células-tronco (JONHNSON et al., 2008; KEILHOFF & FANSA, 2011). Com isso, a manipulação de condutos nervosos artificiais, também denominados como invólucros ou bainhas, tem atraído um interesse considerável. Condutos nervosos são utilizados para gerar um ambiente favorável para os axônios em regeneração, o que permite a formação espontânea de uma matriz de fibrina, além de favorecer e apoiar o crescimento de axônios, capilares e células não neurais (MELLO et al., 2001; DELISTOIANOV et al., 2006; STANG et al., 2009; MADDURI & GANDER, 2012).

LUNDBORG et al. (1982), ANSSELIN et al. (1997), OLIVEIRA et al. (2004), PAN et al. (2006) e KEILHOFF & FANSA (2011) são unânimes em utilizar como modelo experimental a tubulização nervosa, que consiste na utilização de um invólucro de biomaterial e a sutura dos cotos nervosos no interior deste conduto, deixando um espaço entre eles. Assim, os condutos agem como proteção do tecido conjuntivo que se forma ao redor, e como uma forma de ligação entre os cotos nervosos, o que favorece o direcionamento e o crescimento axonal em direção distal (Figura 6).

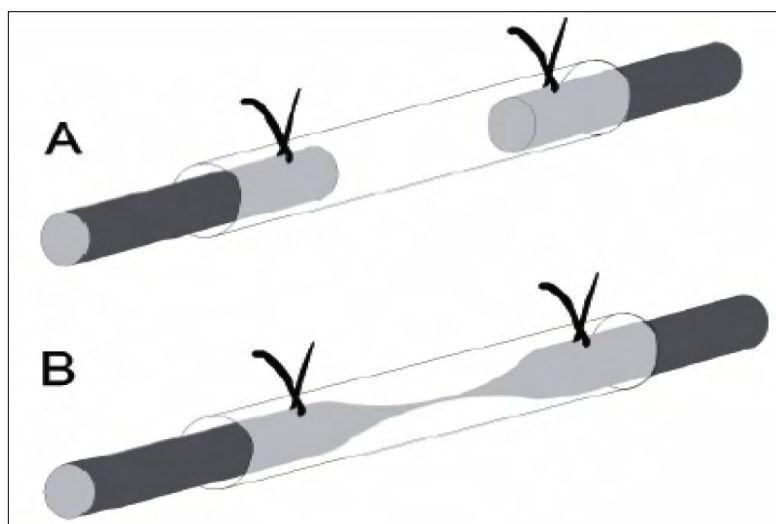


FIGURA 6 - Representação esquemática da técnica de tubulização para regeneração nervosa (A) com formação da ponte não celular de fibrina para crescimento e orientação axonal (B).

Fonte: OLIVEIRA et al. (2004).

Segundo STANG et al. (2009), a técnica de reconstrução ideal do nervo deve ser aquela que contemple a maioria dos seguintes fatores: permitir reconstrução imediata do nervo no momento da lesão; não criar tensão no local de sutura e um sítio potencial de aprisionamento do nervo; não requerer o sacrifício de um doador; não requerer tempo adicional intra-operatório; não colocar material estranho de forma permanente no organismo; não necessitar de medicamentos adicionais, como terapia imunossupressora no caso de aloenxertos e permitir a deposição de fatores de crescimento ou diversos tipos celulares.

Portanto, a escolha e o processamento do biomaterial são de extrema importância. Um biomaterial adequado deve possuir boa biocompatibilidade, de preferência ser biodegradável, com propriedades adequadas de degradação, para não necessitar de outra intervenção cirúrgica, além de ser capaz de controlar os efeitos secundários, tais como porosidade, resistência mecânica, e funcionalização biológica. Além disso, a cinética de degradação de materiais deve ser compatível com a taxa de regeneração do nervo, que é de aproximadamente 1 a 3 mm por dia, comprovada em coelhos, uma vez que os axônios começam a crescer para a direção distal (GUTMANN et al., 1942; MADDURI & GANDER, 2012). Dependendo da gravidade da lesão e do tamanho do espaço deixado entre os cotos no momento cirúrgico, o invólucro deve preservar a sua integridade durante, pelo menos, quatro a oito semanas, mas se degradar após alguns meses sem liberar produtos de degradação que interfiram na regeneração tecidual (MADDURI & GANDER, 2012).

Uma ampla gama de polímeros naturais e sintéticos está disponível para a fabricação de invólucros, alguns já aprovados para uso em humanos. Os invólucros podem ser feitos, tanto de materiais biológicos (naturais), como sintéticos. As duas formas são rotineiramente investigadas e utilizados em pesquisas como artérias, veias, músculos, colágeno, fibrina, quitosana, fibras de seda, alginato, polímeros sintéticos como ácido poliglicólico, poli-hidroximetil-metacrilato, silicone e até mesmo fibras de vidro (DELISTOIANOV et al., 2006; STANG et al., 2009; MADDURI et al., 2010; SUMMA et al., 2010; ORBAY et al., 2012; SHEN et al., 2012). Os mais utilizados atualmente na medicina regenerativa são os invólucros biodegradáveis, mas apesar da sua degradação desejada, eles devem manter uma força mecânica mínima para suportar a sutura cirúrgica e proteger os axônios em regeneração da invasão pelo tecido conjuntivo que se forma ao redor do invólucro (STANG et al., 2009; MADDURI & GANDER, 2012).

De acordo com STANG et al. (2009) além da biodegradabilidade, esses condutos podem ser permeáveis, semi-permeáveis ou impermeáveis. Os permeáveis devem permitir o influxo de fatores de cicatrização gerados externamente, assim como a difusão externa de resíduos gerados internamente. No entanto, fatores neurotróficos produzidos pelas CSc deveriam permanecer dentro do lúmen, o que poderia ser dificultoso. Já os condutos impermeáveis podem influenciar positivamente na regeneração do nervo isolando a área de regeneração, impedindo a entrada do tecido cicatricial e mantendo os fatores de crescimento gerados internamente. Finalmente, os tubos de paredes semipermeáveis podem também impedir a entrada do tecido cicatricial e permitir uma difusão interna mais controlada desses fatores de cicatrização gerados externamente, o que tem demonstrado melhores resultados na regeneração nervosa (Figura 7).

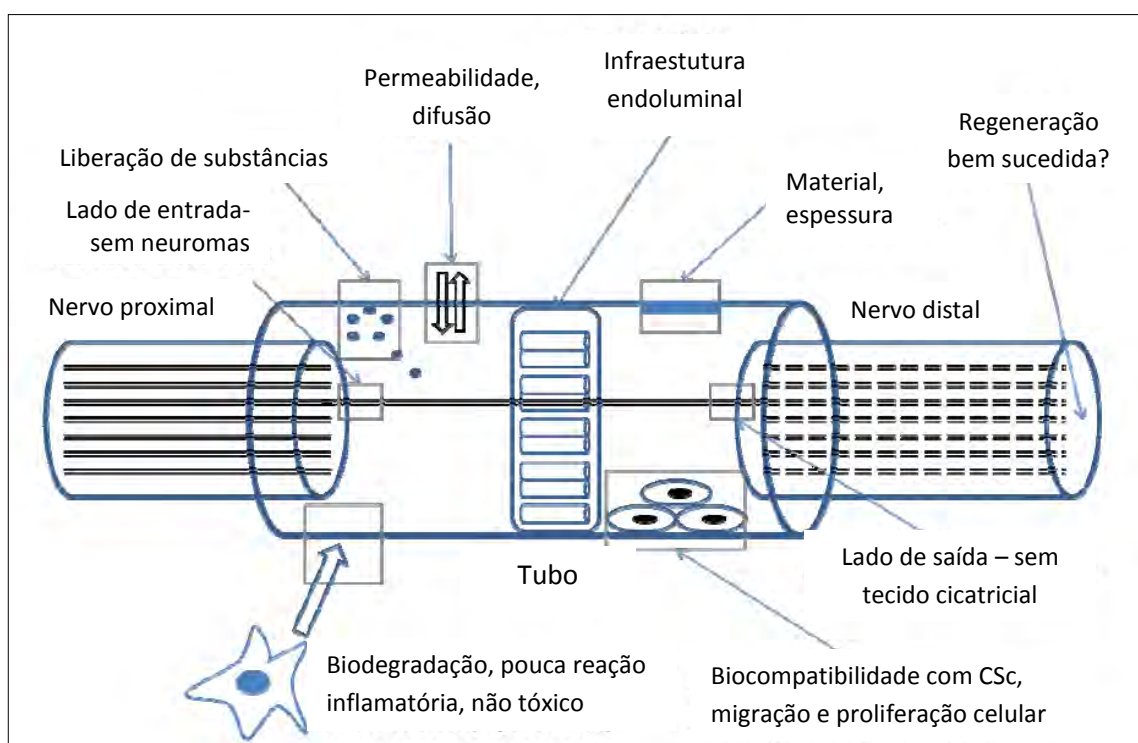


FIGURA 7: Representação esquemática das características desejáveis em um invólucro utilizado para a tubulização na regeneração nervosa periférica. CSc: células de Schwann.

Fonte: Adaptado de STANG et al. (2009).

3. Justificativa e objetivo

Atualmente, a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos, estão à frente de grande parte das pesquisas relacionadas às aplicabilidades terapêuticas das células-tronco adultas, porque essas possuem capacidade de diferenciação celular e atuação na cicatrização tecidual. Além da biologia celular, os biomateriais também possuem extrema importância e participação na reconstrução tecidual, o que direciona as pesquisas para as inúmeras possibilidades de utilização terapêutica, principalmente para doenças com tratamentos ainda pouco eficazes. Neste contexto, as lesões nervosas centrais e periféricas ocupam papel importante, por serem de alta incidência e grande importância na medicina e na veterinária.

Assim, este estudo justifica-se, tanto pela atualidade, como pela relevância do tema em questão, considerando a possibilidade de que as CTA possam melhorar o processo de regeneração nervosa, devido às suas características de plasticidade celular. Para tal, foi proposta a utilização de dois tipos diferentes de CTA: a fração de células mononucleares (FCM) obtidas da MO e ADSC, para avaliar os efeitos das células na regeneração nervosa periférica de equinos e de elucidar qual tipo celular participa melhor no processo regenerativo.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a regeneração do nervo ulnar de equinos após secção cirúrgica, tubulização com silicone e terapia celular com FCM e ADSC. Para a realização da secção nervosa na espécie equina, foi selecionado o nervo ulnar como material de análise, tanto por ser de fácil acesso cirúrgico, como por ser um nervo apenas sensitivo para esta espécie, não acarretando complicações motoras aos animais.

Referências

1. ACHESON, A.; BARKER, P. A.; ALDERSON, R. F. MILLER, F.D.; MURPHY, R. A. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: Inhibition by antibodies to NGF. **Neuron**, Cambridge, v. 7, p. 265-275, 1991.
2. ALIVISATOS, A. P.; GU, W.; LARABELL, C. Quantum dots as cellular probes. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 7, p. 55-76, 2005.
3. ANSSELIN, A. D.; FINK, T.; DAVEY, D. F. Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, Oxford, v. 23, p. 387-398, 1997.
4. AQUINO, J. B.; HJERLING-LEFFLER, J.; KOLTZENBURG, M.; EDLUND, T.; VILLAR, M. J.; ERNFORS, P. In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. **Experimental Neurology**, Nova Iorque, v.198, n.2, p.438–449, 2006.
5. ARAÚJO, J. D.; ARAÚJO FILHO, J. D.; CIORLIN, E.; RUIZ, M.; RUIZ, L. P.; GRECO, O. T.; LAGO, M. R.; ARDITO, R. V. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. **Jornal Vascular Brasileiro**, Porto Alegre, v. 4, n. 4, p. 357-65, 2005.
6. ARINZEH, T. L.; PETER, S. J.; ARCHAMBAULT, M. P.; VAN DEN BOS, C.; GORDON, S.; KRAUS, K.; SMITH, A.; KADIYALA, S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. **The Journal of Bone and Joint Surgery (American)**, Boston, v. 85, n. 10, p. 1927-1935, 2003.
7. BARACHINI, S.; TROMBI, L.; DANTI, S.; D'ALESSANDRO, D.; BATTOLA, B.; LEGITIMO, A.; NESTI, C.; MUCCI, I.; D'ACUNTO, M.; CASCONI, M. G.; LAZZERI, L.; MATTII, L.; CONSOLINI, R.; PETRINI, M. Morpho-funcional characterization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood for

potential uses in regenerative medicine. **Stem Cells and Development**, Nova lorque, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2009

8. BARREIRA, A. P. B. **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultrasonográfica e imuno-histoquímica**. 2005. 98f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
9. BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 857 p.
10. BELKAS, J. S.; SHOICHET, M. S.; MIDHA, R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. **Neurological Research**, Nova lorque, v. 26, n. 2, p. 2-11, 2004.
11. BIANCO P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P. G. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, Nova lorque, v. 19, n. 3, p. 180-192, 2001.
12. BLOCH, J.; FINE, E. G.; BOUCHE, N.; ZURN, A. D.; AEBISCHER, P. Nerve growth factor and neurotrophin-3-releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. **Experimental Neurology**, Nova lorque, v. 172, n. 1, p. 425–432, 2001.
13. BOYD, J. G.; GORDON, T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. **Molecular Neurobiology**, Clifton, v. 27, n. 3, p. 277–324, 2003.
14. BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; HAN, R.; HEAZLEWOOD, C.; JONES, B.; KAMBOURIS, M.; KOLLAR, K.; MCTAGGART, S.; PELEKANOS, R.; RICE, A.; ROSSETTI, T.; ATKINSON, K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Londres, v. 18, n. 1, p. 846-858, 2007.

15. BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurgery Focus**, Charlottesville, v. 16, n. 5, p. 01-07, 2004.
16. BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; DUARTE, S. A.; JANZ, F. L.; CAVAGLIERI, R. C.; MASELLI, L. M. F. Células-tronco do líquido amniótico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 31, supl. 1, p. 45-52, 2009.
17. BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 31, supl. 1, p. 25-35, 2009a.
18. CANESIN, A. P. M. N. **Padronização da coleta e quantificação de células-tronco hematopoéticas no sangue do cordão umbilical de cães**. 2005. 48f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
19. CARSTANJEN, B.; DESBOIS, C.; HEKMAIT, M.; BEHR, L. Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 70, n. 2, p. 143-147, 2006.
20. COLOMÉ, L. M. **Avaliação de envolvimento de células-tronco autólogas de medula óssea em associação com técnica de tubulização por prótese de silicone na regeneração do nervo tibial de coelhos**. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
21. CORONEL, M. F.; MUSOLINO, P. L.; VILLAR, M. J. Selective migration and engraftment of bone marrow mesenchymal stem cells in rat lumbar dorsal root ganglia after sciatic nerve constriction. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 405, p. 5–9, 2006.

22. DAHLIN, L. B.; BRANDT, J. Basic science of peripheral nerve repairs: wallerian degeneration/ growth cones. **Operative Techniques in Orthopaedics**, Nova lorque, v. 14, n. 3, p. 138-145, 2004.
23. DAI, L. J.; LI, H. Y.; GUAN, L. X.; RITCHIE, G.; ZHOU, J. X. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. **Stem Cell Research**, Kidlington, v. 2, n. 1, p. 16–25, 2009.
24. DELISTOIANOV, N.; MACORIS, D.G.; GODOY, R.F.; ALESSI, A.C. Comparação entre duas técnicas de neurografia do digital palmar em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 44-51, 2006
25. DENIS, J. E.; CAPLAN, A. I. Bone marrow mesenchymal stem cells. In: SELL, S. **Stem cells handbook**. Totowa: Human Press, 2004. cap. 10, p. 107-118.
26. DENT, E. W.; GERTLER, F. B. Cytoskeletal dynamics and review transport in growth cone motility and axon guidance. **Neuron**, Cambridge, v. 40, n. 3, p. 209–227, 2003
27. DISTEFANO, P. S.; FRIEDMAN, B.; RADZIEJEWSKI, C.; ALEXANDER, C.; BOLAND, P.; SCHICK, C. M.; LINDSAY, R. M.; WIEGAND, S. J. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograded axonal transport in peripheral and central neurons. **Neuron**, Cambridge, v. 8, p. 983-993, 1992.
28. DODD, J.; JESSELL, T. M. Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. **Science**, Nova lorque, v. 242, n. 4879, p. 692-699, 1988.
29. DOURADO, E; GOMES, A. C. M.; GOMES, P. F. S.; RIBEIRO, T. P. A. Técnicas microcirúrgicas de reparação nervosa: Procedimentos convencionais e alternativos. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, Camaragibe, v. 3, n. 2, p. 49-54, 2003.

30. DUBERTRET, B.; SKOURIDES, P.; NORRIS, D. J.; NOIREAUX, V.; BRIVANLOU, A. H.; LIBCHABER, A. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. **Science**, Washington, v. 298, p. 1759-1762, nov. 2002.
31. ECKENSTEIN, F. P.; SHIPLEY, G. D.; NISHI, R. Acidic and basic fibroblast growth factors in the nervous system: distribution and differential alteration of levels after injury of central versus peripheral nerve. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 11, p. 412–419, 1991.
32. FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. Peripheral nerve regeneration. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 13, n. 1, p. 43-60, 1990.
33. FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M.; PAOLUCCI, E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, Washington, v. 279, n. 5.536, p. 1528-1530, 1998.
34. FRISBIE, D. D.; KISIDAY, J. D.; KAWCAK, C. E.; WERPYP, N. M.; MCILWRAITH, C. W. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, Nova Iorque, v.27, n. 12, p. 1675-1680, 2009.
35. FU, S. F.; GORDON, T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. **Molecular Neurobiology**, Clifton, v. 14, n. 1, p. 67-50, 1997.
36. GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, I. R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, Filadélfia, v. 211, n. 1, p. 27–35, 2007.
37. GOMPERTS; B. N.; STRIETER, R. M. Stem cells and chronic lung disease. **Annual Review of Medicine**. Palo Alto, v. 58, n. 63, p. 285-300, 2007.

38. GORDON, T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. **Journal of Communication Disorders**, Nova Iorque, v. 43, p. 265-273, 2010.
39. GOULD, T. W.; ENOMOTO, H. Neurotrophic modulation of motor neuron development. **The Neuroscientist**, Baltimore, v. 15, n. 1, p. 105-116, 2009.
40. GOWDAK, L. H. W. Análise crítica da utilização de células-tronco no tratamento da insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 179-185, 2004.
41. GRIFFIN, J. W.; HOFFMAN, P. N. Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. In: DYCK, P. J.; THOMAS, P. K. **Peripheral neuropathy**. 3.ed. Filadélfia: Saunders, 1993
42. GROTTO, H. Z. W.; NORONHA, J. F. A Identificação de células-tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**. São José do Rio Preto, v. 25, n. 3, 2003.
43. GUTMANN, E.; GUTTMANN, L.; MEDAWAR, P. B.; YOUNG, J. Z. The rate of regeneration of nerve. **The Journal of experimental biology**, Londres, v. 19, p. 14–44, 1942
44. HOLLAND, A. M.; STANLEY, E. G. Stem cells and the price of immortality. **Stem Cell Research**, Kidlington, v. 2, n. 1, p. 26–28, 2009.
45. HU, J.; ZHU, Q. T.; LIU, X. L.; XU, Y. B.; ZHU, J. K. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. **Experimental Neurology**, Nova Iorque, v. 204, p. 658–666, 2007.
46. IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neuroscience Research**, Shannon, v. 25, sup. 1, p. 101-121, 1996.

47. JENNY, B.; KANEMITSU, M.; TSUPYKOV, O.; POTTER, G.; SALMON, P.; ZGRAGGEN, E.; GASCON, E.; SKIBO, G.; DAYER, A. G.; KISS, J. Z. Fibroblast growth factor-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential. **Stem Cells, The Stem Cell Niche**, Cambridge, v. 27, p. 1309-1317, 2009.
48. JOHNSON, E. O.; CHARCHANTI, A.; SOUCACOS, P. N. Nerve repair: Experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration Injury. **International Journal of the Care of the Injured**, Bristol, v. 39S, p. 37-42, 2008.
49. JUNQUEIRA, C.; CARNEIRO, J. Tecido nervoso. In: JUNQUEIRA, C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 129-158.
50. KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. A formação e regeneração das sinapses. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Princípios da Neurociência**. 4.ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 1087-2014.
51. KANG, J. M.; HAN, M.; JUNG, Y.; KIM, S. H.; KIM, S. H. Adhesion and differentiation of adipose-derived stem cells on a substrate with immobilized fibroblast growth factor. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 8, n. 5 p. 1759-67, 2012.
52. KARP, G. O citoesqueleto e a motilidade celular. In: KARP, G. **Biologia celular e molecular**. 3.ed. Barueri: Manole, 2005. p. 333-396.
53. KEILHOFF, G.; GOIHL, A.; LANGNASE, K.; FANSA, H.; WOLF, G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 85, n. 2, p. 11-24, 2006.

54. KEILHOFF, G.; FANSA, H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. A real hope or just an empty promise? **Experimental Neurology**, Nova lorque, v. 232, p. 110-113, 2011.
55. KINGHAM, P.J.; KALBERMATTEN, D.F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S.J.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, Nova lorque, v.207, n. 2, p. 267–274, 2007.
56. KISIDAY, J. D.; KOPESKY, P. W.; EVANS, C. H.; GRODZINSKY, A. J.; MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D. Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. **Journal of Orthopedic Research**, Rosemont, v. 26, n. 3, p. 322-331, 2008.
57. KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J. D.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET, P.; GROGAN, S. P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, Nova lorque, v. 24, n. 4, p. 1613–1619, 2006.
58. KOPP, D. M.; TRACHTENBERG, J. T.; THOMPSON, W. J. Glial growth factor rescues schwann cells of mechanoreceptors from denervation-induced apoptosis. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 17, n. 17, p. 6697–6706, 1997.
59. KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, Filadélfia, v. 35, p. 232–242, 2006.
60. KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. Tissue renewal and repair: regeneration, realing and fibrosis. In: KUMAR, V.; ABBAS, K. A.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran. Pathologic basis of disease**. 7ed. Philadelphia: Elsevier Sauders, 2005. Cap.3, p. 91-94.

61. LADAK, A.; OLSON, J.; TREDGET, E. E.; GORDON, T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. **Experimental Neurology**, Nova Iorque, v.228, p.242–252, 2011.
62. LEE, S. K.; WOLFE, S. W. Peripheral nerve injury and repair. **American Academy Orthopaedic Surgeons**, Washington, v. 8, n. 4, p. 243-252, 2000.
63. LENT, R. **Cem bilhões de neurônios. Conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2005a. 698 p.
64. LENT, R.; UZIEL, D.; FURTADO, D. A. Neurônios. In: CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células. Uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole, 2005b. p.226-247.
65. LERI, A.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. Células da medula óssea e reparo Cardíaco. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 87, n. 2, 2006.
66. LEWIN, S. L.; UTLEY, D. S.; CHENG, E. T.; VERITY, A. N.; TERRIS, D. J. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhance rates of functional recovery compared with BDNF treatment alone. **The Laryngoscope**, Saint Louis, v. 107, p. 992-999, 1997.
67. LI, G. D.; LUO, R.; ZHANG, J.; YEO, K. S.; XIE, F.; TAN, E. K. T.; CAILLE, D.; QUE, J.; KON, O. L.; SALTO-TELLEZ, M.; MEDA, P.; LIM, S. K. Derivation of functional insulin-producing cell lines from primary mouse embryo culture. **Stem Cell Research**, Kidlington, v. 2, n. 1, p. 29–40, 2009.
68. LODISH, H.; KAISER, C. A.; BERK, A.; KRIEGER, M.; MATSUDAIRA, P. Origem, linhagem e morte celular. In: LODISH, H.; KAISER, C. A.; BERK, A.; KRIEGER, M.; MATSUDAIRA, P. **Biologia celular e molecular**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 22, p. 896-906.
69. LUNDBORG, G.; DAHLIN, L. B.; DANIELSEN, N.; GELBERMAN, R. H.; LONGO, F. M.; POWELL, H. C.; VARON, S. Nerve regeneration in silicone chambers:

influence of gap length and of distal stump components. **Experimental Neurology**, Nova Iorque, v. 76, p. 361-375, 1982.

70. MADDURI, S.; FELDMAN, K.; TERVOORT, T.; PAPALOÏZOS, M.; GANDER, B. Collagen nerve conduits releasing the neurotrophic factors GDNF and NGF. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 143, p. 168-174, 2010.
71. MADDURI, S.; GANDER, B. Growth factor delivery systems and repair strategies for damaged peripheral nerves. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 274-282, 2012.
72. MAKWANA, M.; RAIVICH, G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 272, n. 2, p. 2628–2638, 2005.
73. MARCHIONNI, M. A.; GOODEARL, A. D. J.; CHEN, M. SU'; BERMINGHAMCDONOGH, O.; KIRK, C.; HENDRICKS, M.; DANEHY, F.; MISUMI, D.; SUDHALTER, J.; KOBAYASHI, K.; WROBLEWSKI, D.; LYNCH, C.; BALDASSARE, M.; HILES, I.; DAVIS, J. B.; HSUAN, J. J.; TOTTY, N. F.; OTSU, M.; MCBURNE, R. N. Y.; WATERFIELD, M. D.; STROOBANT, P.; GWYNNE, D. Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. **Nature**, Londres, v. 362, p. 312 -318, 1993.
74. MARQUES, M. J. Células de Schwann. In: CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B **Células. Uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole, 2005. p. 248-264, 450p.
75. MATSUMURA, G.; MIYAGAWA-TOMITA, S.; SHIN'OKA, T.; IKADA, Y.; KUROSAWA, H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. **Circulation**, Dallas, v. 108, p. 1729-1734, 2003.
76. MATTHEAKIS, L. C.; DIAS, J. M.; CHOI, Y. J.; GONG, J.; BRUCHEZ, M. P.; LIU, J.; WANG, E. Optical coding of mammalian cells using semiconductor quantum dots. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 327, p. 200-208, 2004.

77. MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; MITCHELL, J. B.; FLOYDE, Z. E.; HAMMILL, L.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; TING, J. P.; STORMS, R. W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J. M. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. **Stem Cells – Tissue Specific Stem Cells**, Nova Iorque, v. 24, n. 6, p. 1246-1253, 2006.
78. MEIRELLES, L. C.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, Londres, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.
79. MELLO, L.R.; FELTRIN, Y.; SELBACH, R.; MACEDO JUNIOR, G.; SPAUTZ, C.; HAAS, L.J. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 59, n. 2-B, p. 372-379, 2001.
80. MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, Londres, v. 30, n. 3, p. 681-687, 2006.
81. MULLER, H. W.; STOLL, G. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. **Brain Pathology**, Zurich, v. 9, n. 2, p. 313-325, 1999.
82. NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.
83. NARDI, N. B.; AFONSO, Z. C. Células-tronco hematopoiéticas. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p. 49-45.
84. NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook Experimental Pharmacology**, Berlin, v. 174, n. 6, p. 249–282, 2006.

85. NIE, X.; ZHANG, Y.-J.; TIAN, W.-D.; JIANG, M.; DONG, R.; CHEN, J.-W.; JIN, Y. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. **International Journal of Oral Maxillofacial. Surgery**, Copenhagen, v. 36, n. 1, p. 32–38, 2007.
86. NIH - National Institutes of Health. Department of Health and Human Services, 2001. stem cells: Scientific progress and future research directions. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage>. Acesso em: 07 jul. 2009.
87. NIH - National Institutes of Health. Department of Health and Human Services, 2009. Stem Cell Basics. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage>. Acesso em: 07 jul. 2009.
88. NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 69, p. 928–937, 2008.
89. NOLTE, J. Células do sistema nervoso. In: NOLTE J. **Neurociência**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 1-11, 265p.
90. OGAWA, R. The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. **Current Stem Cell Research & Therapy**, São Francisco, v. 8, n. 1, p. 13-20, 2006.
91. OLIVEIRA, A. L. R.; PIERUCCI, A.; PEREIRA, K. B. Pheripheral nerve regeneration though the nerve tubulization technique. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 225-231, 2004.
92. OLSSON, D. C. **Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea na lesão iatrogênica aguda de tendão calcâneo de cães**. 2009. 110f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

93. ORBAY, H.; UYSAL, A. C.; YAKUSOKU, H.; MIZUNO, H. Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, Amsterdam, v. 65, n. 5, p. 657-664, 2012.
94. ORTIZ-HIDALGO, C.; WELLER, R. O. Peripheral nervous system. In: STERNBERG, S. S. **Histology for pathologists**. Filadélfia: Lippincott, 1997. p. 285-311.
95. PAN, H. C.; YANG, D. Y.; CHIU, Y. T.; LAI, S. Z.; WANG, Y. C.; CHANG, M. H.; CHENG, F. C. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. **Journal of Clinical Neuroscience**, Melbourne, v. 13, p. 570-575, 2006.
96. PARAK, W. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks. **Advanced Materials**, Deerfield Beach v. 14, n. 12, p. 882-885, 2002.
97. PEREIRA, I. S. O.; PONTES, P.; EÇA, L. P.; FERREIRA, A. T.; MAZZETTI, P. M. V.; SILVA, L; SOUZA, F. C. Protocolo piloto de separação e quantificação de células-tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 11-16, 2008.
98. PERONI, D.; SCAMBI, I.; PASINI, A.; LISI, V.; BIFARI, F.; KRAMPERA, M.; RIGOTTI, G.; SBARBATI, A.; GALIE, M. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. **Experimental Cell Research**, Nova Iorque, v. 314, n. 2, p. 603-615, 2008.
99. PORTNEY, L. G.; ROY, S. H. Eletromiografia e testes de velocidade de condução nervosa. In: O'SULLIVAN, S. B.; SCHMITZ, T. **Fisioterapia: avaliação e tratamento**. 4.ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 214-234.

100. PUISSANT, B.; BARREAU, C.; BOURIN, P.; CLAVEL, C.; CORRE, J.; BOUSQUET, C.; TAUREAU, C.; COUSIN, B.; ABBAL, M.; LAHARRAGUE, P.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L.; BLANCHER, A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 129, n. 1, p. 118–129, 2005.
101. PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M. **Neurociências**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 728p.
102. RAFF, M. Adult stem cell plasticity: Fact or artifact? **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 19, n. 1, p. 1-22, 2003.
103. RATHJEN, J.; RATHJEN, P. D. Embryonic stem cells: isolation and application of pluripotent cells from the pregastrulation mammalian embryo. In: SELL, S. **Stem cells handbook**. Totowa: Human Press, 2004. cap. 3, p. 33-44.
104. RIBEIRO, E. C.; CASSOL, M. Enfoque fisioterápico e fonoaudiológico na paralisia facial periférica. **International Archives of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 140-146, 1999.
105. ROBERTIS, E.; HIB, J. O citoesqueleto. In: ROBERTIS, E.; HIB, J. **De Robertis. Bases da biologia celular e molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 5, p. 65-94, 389p.
106. RODRIGUEZ, A. M.; ELABD, C.; AMRI, E.Z.Z.; AILHAUD, G.; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Biochimie**, Paris, v. 87, n. 8, p. 125–128, 2005.
107. ROSA FILHO, B. J.; AGUIAR, D.; GAMA, F.; ANDRADE, L.; SILVA, L.; PIRES, S. Lesões traumáticas dos nervos periféricos: axonotmese. **Fisioweb Wgate**,...2004...Disponível..em:..http://www.wgate.com.br/conteudo/medicinaesa

ude/fisioterapia/neuro/axonotmese/axonotmese.htm. Acesso em: 22 de set. 2009.

108. SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; CARVALHO, A. C. C. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 6, p. 490-495, 2004.
109. SCHNABEL, V. L.; LYNCH, M. E.; VAN DER MEULEN, M. C. H.; YEAGER, A. E.; KORNATOWSKI, M. A.; NIXON, A. J. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-i gene- enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. **Journal of Orthopaedic Research** [online], 2009. Disponível em: <http://www.interscience.wiley.com>. Acesso em: 30 jun. 2009.
110. SCHMIDT, C. E.; LEACH, J. B. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. **Annual Review Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 5, p. 293–347, 2003.
111. SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.
112. SELL, S. What are they? Where do they come from? Why are they here? When do they go wrong? Where are they going? In: SELL, S. **Stem cells handbook**. Totowa: Human Press, 2004. cap. 1, p. 1-18.
113. SHEN, C. C.; YANG, Y. C.; LIU, B. S. Peripheral nerve repair of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in a biodegradable reinforced nerve conduit. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 100A, n. 1, p. 48–63, 2012.

114. SOFRONIEW, M. V.; HOWE, C. L.; MOBLEY, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 1271-1281, 2001.
115. SOUZA, W. A.; ZANGIROLAMI, D. F.; SACCO, S. R. Uso de células-tronco como tratamento de tendinite e ruptura de tendão em equinos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária** [online], ano VII, n.12, 2009. Disponível em: <http://www.revista.inf.br>. Acesso em: 06 ago. 2009.
116. STANG, F.; KEILHOFF, G.; FANSA, H. Biocompatibility of different nerve tubes. **Materials**, Basel, v. 2, p. 1480-1507, 2009.
117. STELZNER, M.; HOAGLAND, V. D.; WOOLMAN, J. D. Identification of optimal harvest sites of ileal stem cells for treatment of bile acid malabsorption in a dog model. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, Saint Louis, v. 7, n. 4, p. 516-522, 2003
118. STEVENS, A.; LOWE, J. Tecido nervoso. STEVENS, A.; LOWE, J. In: **Histologia humana**. 2.ed. São Paulo: Manole, 2001. p. 77-98.
119. STOPIGLIA, A. J. PEDRO, C. R. Lesões de nervos periféricos. IN: MIKAIL, S.; PEDRO, C. R. **Fisioterapia veterinária**. 2.ed. São Paulo: Manole, 2009. p. 167-174.
120. SUMMA, P. G.; KINGHAM, P, J.; RAFFOUL, W.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G.; KALBERMATTEN, D. F. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, Amsterdam, v. 63, p. 1544-1552, 2010.
121. SUTTER, W. W. Autologous cell-based therapy for tendon and ligament injuries. **Clinical Techniques in Equine Practice**, Ottawa, v. 6, n. 2, p. 198-208, 2007.

122. TERENGI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **Journal of Anatomy**, Londres, v. 194, n. 1, p. 1-14, 1999.
123. THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, Washington, v. 282, n. 5391, p.1145–47, 1998.
124. TORIGOE, K.; TANAKA, H. F.; TAKAHASHI, A.; AWAYA, A.; HASHIMOTO, K. Basic behavior of migratory schwann cells in peripheral nerve regeneration. **Experimental Neurology**, Nova lorque, v. 137, n. 2, p. 301–308, 1996.
125. UEMURA ,R.; XU, M.; AHMAD, N.; ASHRAF, M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. **Circulation Research**, Baltimore, v. 98, n. 11, p. 1414-1421, 2006.
126. VATS, A.; BIELBY, R. C.; TOLLEY, N. S.; NEREM, R.; POLAK, J. M. Stem cells. **Lancet**, Londres, v. 366, n. 9485, p. 592–602, 2005.
127. VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, Filadélfia, v. 36, n. 7, p. 613-622, 2007.
128. VIDAL, M. A.; ROBINSON, S. O.; LOPEZ, M. J.; PAULSEN, D. B.; BORKHSENIUS, O.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. **Veterinary Surgery**, Filadélfia, v. 37, n. 8, p. 713-724, 2008.
129. YIN, Q.; KEMP, G. J.; YU, L. G.; WAGSTAFF, S. C.; FROSTICK, S. P. Expression of schwann cell-specific proteins and low-molecular-weight neurofilament protein during regeneration of sciatic nerve treated with neurotrophin-4. **Neuroscience**, Oxford, v. 105, n. 3, p. 779-783, 2001.

130. ZAGO, M.A. Células tronco: Terapia celular, transplante de células de tecidos ou de órgãos. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p. 03-20.
131. ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. In: Seminário do Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004, 23 p.
132. ZAMPROGNO, H. Células-tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. **Acta Scientiae Veterinariae** [online], v.35, supl 2, p.289-290, 2007. Disponível em: [http:// www.ufrgs.br/favet/revista](http://www.ufrgs.br/favet/revista). Acesso em: 06 ago. 2009.
133. ZATZ, M. Clonagem e célula tronco. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 18, n. 51, 2004.
134. ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, São Francisco, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.
135. ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, H.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 13, n. 2, p. 4279–4295, 2002.

CAPÍTULO 2 - REGENERAÇÃO DO NERVO ULNAR DE EQUINOS APÓS TUBULIZAÇÃO E TERAPIA CELULAR COM FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

RESUMO

Pesquisas que avaliem a regeneração nervosa periférica na espécie equina são escassas, embora os cavalos sejam vítimas frequentes de traumatismos. As células-tronco adultas (CTA) são uma fonte alternativa de células para a regeneração do tecido nervoso, por possuírem propriedades pluri e multipotentes de diferenciação. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar avaliação histomorfológica na regeneração nervosa periférica de equinos, por meio de neurotomia e utilização de tubos de silicone com solução salina (grupo controle – GC, n=5), tubos de silicone com implante autólogo de fração de células mononucleares (grupo FCM, n=5) e tubos de silicone com implante autólogo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (grupo ADSC, n=5). A FCM e a ADSC foram obtidas respectivamente, da medula óssea e tecido adiposo de cada animal. Realizaram-se biopsias dos nervos ulnares com 13 e 26 semanas e avaliação com as colorações de HE, luxol *fast blue*, tricômio de Masson e nanocristal. Evidenciou-se melhor regeneração nervosa e diminuição da degeneração walleriana nos grupos FCM e ADSC, em relação ao GC. O grupo ADSC apresentou os melhores resultados, com maior eficiência das ADSC em relação à FCM na regeneração nervosa periférica em equinos. As CTA, principalmente as ADSC, constituem método de terapia celular promissor para a regeneração nervosa periférica de equinos.

Palavras-chave: biomateriais, células-tronco adultas, medula óssea, nervo periférico, tecido adiposo, tubo de silicone.

Equine ulnar nerve regeneration after tubing and cell therapy with mononuclear cells fraction and mesenchymal stem cells.

ABSTRACT

Researches evaluating equine peripheral nerve regeneration are scarce, although this species is a frequent victim of traumatic accidents. The adult stem cells (ASC) are an alternative source of cells for nerve tissue regeneration because of their pluri

and multipotent differentiation properties. The aim of this study was to perform histomorphologic evaluation of equine peripheral nerve regeneration, by means of neurotomy using silicone tubes with saline solution (control group – CG, n=5), silicone tubes with autologous mononuclear cell fraction (MCF group, n=5), and silicone tubes with autologous adipose tissue derived stem cells (ADSC group, n=5). The MCF and ADSC were obtained from bone marrow and adipose tissue from each animal. Nerve biopsies were performed on the 13th and 26th weeks and evaluation with HE, luxol fast blue, Masson's trichrome and nanocrystals. It was evidenced improved nerve regeneration and wallerian degeneration reduction in MCF and ADSC groups, compared to CG. The ADSC group presented the best results, showing ADSCs efficiency compared to MCF for equine peripheral nerve regeneration. The ASC, especially ADSC, are a promising therapy cell method for equine peripheral nerve regeneration.

Keywords: adipose tissue, adult stem cells, biomaterials, bone marrow, peripheral nerve, silicone tube.

INTRODUÇÃO

Estruturalmente, um nervo periférico é subdividido em fascículos, sustentados pelos endoneuro, perineuro e epineuro, que desempenham papel fundamental no processo de formação e regeneração nervosa (KINGHAM et al., 2007; CARRIEL et al., 2011).

As lesões nos nervos periféricos são de ocorrência frequente e representam um grande problema econômico e social na área da saúde, sendo que em veterinária são também fator limitante ao bem estar animal (KINGHAM et al., 2007). Em equinos, a lesão de um nervo periférico ocorre mais comumente após lacerações, traumas, durante manobras de contenção em posição de decúbito, em procedimentos de anestesia geral, ou ainda, de forma iatrogênica no ato cirúrgico (DELISTOIANOV et al, 2006; STASHAK, 2006).

A reparação nervosa pode ser orientada pelo do uso de um tubo de biomaterial, à semelhança das técnicas utilizadas em humanos, com o propósito de melhorar a reinervação, favorecendo o direcionamento axonal e atuando como uma barreira física à invasão do tecido cicatricial circundante. Os tubos de silicone têm

sido amplamente utilizados experimentalmente na restauração nervosa, atuam como invólucro, permitem a formação espontânea de uma matriz de fibrina, e favorecem o crescimento de axônios, capilares e células não neurais (MELLO et al., 2001; DELISTOIANOV et al., 2006; MADDURI & GANDER, 2012).

Entretanto, na atualidade, novos materiais vêm sendo utilizados na restauração nervosa periférica, com destaque aos de origem sintética, como os polímeros e os de origem biológica como o colágeno, a fibrina, a quitosana e as artérias e veias. Entre os materiais sintéticos não biodegradáveis, a câmara de silicone é considerada o de eleição, pois provoca pequena ou nenhuma reação tecidual e não induz a reação inflamatória local. O desenvolvimento axonal, a migração celular e o crescimento de capilares podem ser acompanhados e o ambiente químico da câmara pode ser analisado ou alterado por manipulação extrínseca. Este material tem como vantagens a transparência, a rigidez adequada e a fácil manipulação cirúrgica (DELISTOIANOV et al., 2006; STANG et al., 2009; MADDURI & GANDER, 2012).

Segundo NIE et al. (2007), as técnicas para a regeneração do tecido nervoso têm avançado com o emprego, no local da lesão, de células vivas isoladas e/ou substratos artificiais para direcionar a regeneração axonal e restabelecer a função neural. AQUINO et al. (2006) e NIE et al. (2007) preconizaram o uso de células-tronco adultas (CTA) como fonte alternativa de células para a regeneração do tecido nervoso por estas possuírem crescimento rápido e propriedades pluri e multipotentes de diferenciação em tipos celulares como fibroblastos, hepatócitos, cartilagem, osso, músculo e células nervosas (MCFARLIN et al., 2006; MEIRELLES et al., 2006; PENTEADO et al. 2007).

A medula óssea (MO) é um dos locais de eleição para a obtenção dessas células pela facilidade de colheita, por permitir o transplante autólogo, e também por não apresentar barreiras éticas. Dentre as CTA da MO incluem-se as células-tronco hematopoéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM), que apresentam multi e pluripotencialidade, respectivamente. Por essa razão, alguns autores mencionam que a utilização da fração de células mononucleares (FCM) da MO, e não apenas um único tipo celular, seja mais benéfico por favorecer a proliferação e a manutenção das CTA. Estas, posteriormente, sob condições apropriadas, podem se diferenciar seletivamente em diversas linhagens celulares (HOWS, 2005; TOGNOLI et al., 2009).

O tecido adiposo, assim como a MO, é derivado do mesênquima embrionário e possui um estroma, no qual já foi identificada e isolada uma população de CTM (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002). Também há nesse tecido, maior quantidade de CTM, que constitui em média 2% do lipoaspirado total. O interesse pelas CTM derivadas do tecido adiposo tem sido crescente por ser esse tecido apontado como uma fonte abundante, acessível e de fácil colheita (NARDI & MEIRELLES, 2006; KINGHAM et al., 2007). As CTM colhidas do tecido adiposo recebem a nomenclatura de CT derivadas do tecido adiposo (ADSC), possuem fenótipo e expressão gênica semelhantes às CTM da MO, e podem da mesma maneira, ser cultivadas *in vitro* e possuem capacidade de diferenciação em diversos tipos de células como miócitos, cardiomiócitos, células endoteliais, neurais, adipócitos, condrócitos, hepatócitos, tenócitos e osteoblastos (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; NIXON et al., 2008; PERONI et al., 2008).

A maioria das pesquisas utiliza o camundongo como modelo experimental de eleição para a demonstração das aplicações de CTA. Entretanto, surge a necessidade de utilização de outras espécies animais (KINGHAM et al., 2007), como a equina, que possui alta incidência de lesões nervosas, que, na maioria das vezes, implica em eutanásia (STASHAK, 2006).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar avaliação histomorfológica na regeneração do nervo ulnar de equinos após secção cirúrgica, tubulização e terapia celular com fração de células mononucleares da medula óssea (FCM) e células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Hospital Escola de Grandes Animais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (Hvet-FAV/UnB), Brasília-DF, no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (Instituto de Ciências Biológicas - IC/UnB), Brasília-DF, e no Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), Goiânia-GO. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (ICB-UnB), com protocolo UnBDOC nº75944/2088 (Anexo 1).

Utilizaram-se 15 equinos adultos, 13 fêmeas e dois machos, sem raça definida e clinicamente sadios. Os animais foram mantidos em piquetes com alimentação à base de capim Tifton, ração granulada, sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em baias individuais apenas nos dias anterior e posterior ao procedimento cirúrgico.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três grupos, cinco repetições e dois momentos de biopsia. Os animais foram alocados em três grupos, com cinco animais em cada: grupo controle (GC) com utilização de soro fisiológico; grupo FCM com deposição de fração de células mononucleares da medula óssea; e grupo ADSC com deposição de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Ambos, FCM e ADSC, foram implantes autólogos. Em todos os grupos foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico de tubulização com tubo de silicone, utilizando-se os dois membros de cada animal (nervo direito e nervo esquerdo). Com isso, foram estabelecidos dois momentos de biopsia dos nervos ulnares para cada animal: na 13ª semana realizou-se a biopsia no membro direito (GC1, FCM1 e ADSC1) e na 26ª semana, no membro esquerdo do mesmo animal (GC2, FCM2 e ADSC2). O nervo ulnar foi escolhido como material de análise, tanto por ser de fácil acesso cirúrgico, como por ser um nervo apenas sensitivo para esta espécie, não acarretando complicações motoras aos animais.

Colheita e isolamento da fração de células mononucleares (FCM) e cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC)

As amostras de MO e tecido adiposo foram colhidas no Hvet (FAV/UnB) e encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (IC/UnB), para o isolamento da FCM e ADSC.

As colheitas e os isolamentos da FCM foram realizados conforme BARREIRA (2005) e TOGNOLI et al. (2009). Foi coletada a medula óssea (MO) no osso esterno dos cinco equinos pertencentes ao grupo FCM. Os animais foram mantidos em estação, contidos em bretes e sedados com detomidina (0,02 mg/kg/IV). Em seguida, realizou-se tricotomia de uma área de aproximadamente 5 x 20cm na região do esterno para realização do exame ultrassonográfico afim de se localizar a 4ª e 5ª esternébras. Imediatamente após, procedeu-se a anestesia local com 10 mL de lidocaína, e a introdução da agulha de punção de MO modelo

Jamshidi (Ecomed, Rio de Janeiro, Brasil), de calibre oito e 12 cm de comprimento. Uma vez fixada a agulha dentro do esterno, retirou-se o mandril e aspirou-se aproximadamente 20 mL de conteúdo medular com auxílio de uma seringa de 60 mL, contendo 0,25mL de heparina a 5000 UI/mL e 9 mL de soro fisiológico, no qual obteve-se um total de 30 mL na seringa. As amostras foram identificadas, acondicionadas em gelo e encaminhadas ao laboratório para o isolamento da FCM.

O isolamento da FCM ocorreu no interior de uma capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70% e luz ultravioleta, onde a amostra foi delicadamente depositada em *Ficoll Hypaque* (Histopaque, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), equivalente à mesma quantidade de amostra colhida. Em seguida a amostra foi centrifugada a 500G por 30' a temperatura ambiente, a fim de realizar a separação de seus constituintes por gradiente de concentração. Após centrifugação, obteve-se a separação das células mononucleares da MO, visíveis na forma de um halo. Essa suspensão celular foi retirada, adicionou-se a mesma quantidade de PBS (tampão fosfato salino), e em seguida a amostra foi homogeneizada e centrifugada 500G por 10'. Ao final dessa primeira centrifugação, o sedimentado obtido foi lavado em PBS e novamente centrifugado a 500G por 10'. Ao término desse procedimento, obteve-se um sedimento com a FCM, o qual foi ressuspenso em PBS para obtenção de 210µL de solução.

As colheitas e os cultivos do tecido adiposo dos cinco equinos pertencentes ao grupo ADSC foram realizados conforme BRAVO et al. (2012). Os animais foram mantidos em estação, contidos em bretes, sedados com detomidina (0,02 mg/kg/IV) e em seguida, foi realizada tricotomia de uma área de aproximadamente 10 x 10 cm na região glútea caudodorsal paraxial. Procedeu-se anestesia local em "L" invertido com lidocaína 2%, e em seguida, fez-se uma incisão linear de 10 cm, localizada aproximadamente 10 cm abaxial e lateral à base da cauda. A incisão foi centrada no sulco formado pela origem proximal dos músculos bíceps femoral e semitendinoso. Realizou-se, assim, a colheita de 10 g de tecido adiposo subcutâneo, o qual foi pesado em balança de precisão e colocado em um tubo cônico de 50 mL, contendo 25 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Invitrogen, California, USA) e 250 µL de antibiótico e antimicótico (Gibco, Invitrogen, California, USA), mantido a 8°C e transportado ao laboratório para o cultivo celular.

O isolamento das ADSC ocorreu no interior de uma capela de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70% e luz ultravioleta. O tecido foi lavado com PBS e transferido para uma placa de petri, onde foi fracionado com auxílio de pinça anatômica e bisturi. Em seguida, o tecido foi colocado em tubo cônico de 50 mL, com 10 mL de tripsina 0,05% (Trypsin 0,25%, Gibco, Invitrogen, California, USA), e foi mantido a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Foi então transferido para outro tubo cônico de 50 mL com colagenase tipo I 0,3%, na proporção de 1:3 (tecido:solução), e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos, com agitação leve a cada 10 minutos de incubação. Após a digestão enzimática, os fragmentos de tecido adiposo, foram distribuídos em duas garrafas de cultivo de 25cm², juntamente com 1mL de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Invitrogen, California, USA) e 9 mL de colagenase tipo I 0,06%. As garrafas foram então incubadas em estufa umidificada com 5% de CO₂ no ar a 37°C, por 18 horas.

No dia seguinte, o conteúdo foi transferido para um tubo cônico de 50 mL e mantido sob agitação no vórtex por alguns segundos. Encaixou-se um filtro de 70 µm em outro tubo cônico de 50 mL e despejou-se o conteúdo lentamente, para a filtração das células e o restante do tecido adiposo foi descartado. O conteúdo obtido pela filtração foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos em tubos cônico de 15 mL, e descartado o sobrenadante. O sedimento obtido foi ressuspensão em 1 mL de DMEM.

Uma alíquota de 500 µL da amostra foi depositada em garrafa de cultivo de 25cm², juntamente com 5 mL de meio de cultivo (4,45 mL de DMEM; 0,5 mL de SFB; 0,05 mL de antibiótico e antimicótico) e incubado em estufa umidificada com 5% de CO₂ no ar a 37°C. Após três dias o meio de cultivo foi trocado para eliminação das células não aderentes. O meio foi trocado a cada três dias até atingir a confluência celular de aproximadamente 75%, quando procedeu a retirada das células das garrafas (passagem celular) com tripsina 0,2%. O procedimento foi repetido por aproximadamente 14 dias, o que totalizou em quatro passagens celulares. Após esse período de cultivo, uma alíquota de células foi destinada ao procedimento de diferenciação celular e o restante foi utilizado para a implantação no animal.

Ao final do procedimento de isolamento da FCM e da ADSC, obteve-se um volume de 210 µL de solução. Uma alíquota de 10 µL da amostra foi retirada para quantificação e teste de viabilidade celular em câmara de *Neubauer*, com o

corante Azul de Tripán 1%. Para o mapeamento celular das células injetadas no local do procedimento cirúrgico, as FCM e ADSC foram incubadas com 1 µL de nanocristal (Qtracker®655 Cell Labeling Kit, Invitrogen, California, EUA), homogeneizadas e levadas à estufa a temperatura de 37°C por 45 minutos, para posterior avaliação em microscópio de fluorescência. Após a incubação, as amostras foram mantidas em um microtubo de plástico à temperatura ambiente e encaminhadas imediatamente para a utilização no procedimento cirúrgico.

Dos cinco animais pertencentes ao grupo FCM, obteve-se uma média de 77,3% de viabilidade celular e $3,15 \times 10^6$ células vivas utilizadas para implantação. Dos cinco animais pertencentes ao grupo ADSC, obteve-se uma média de 92,83% de viabilidade celular e $2,15 \times 10^5$ células vivas utilizadas para implantação.

Ao final da quarta passagem celular, uma alíquota do cultivo de ADSC foi encaminhada para o procedimento de diferenciação celular em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica e passagem em citometro de fluxo com os marcadores positivos mesenquimais CD105 e CD90 e os marcadores negativos CD45 e CD11b, para haver a confirmação de que as células cultivadas pertenciam à linhagem de CTM, também conforme BRAVO et al. (2012).

Diferenciação osteogênica

Uma alíquota celular foi depositada em placas de seis poços e cultivada em estufa umidificada a 37°C e 5 % CO₂, com 3 mL de meio de diferenciação osteogênica. O meio era composto por: DMEM com 15 mM de tampão HEPES (Invitrogen, California, USA); 10% de SFB; 20 nM de dexametasona (Alfa Aesar, Heysham, Reino Unido); 10 mM de β-glicerofosfato + 0,05 mM de L-ácido ascórbico-2-fosfato (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA); 1% de antibiótico e antimicótico. Uma porção de células destinadas para controle negativo foi cultivada apenas com DMEM; 15 mM de HEPES, 10% de SFB; e 1% de antibiótico e antimicótico. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias e após 21 dias de cultivo, as células foram coradas com Alizarin Red S (Alfa Aesar, Heysham, Reino Unido) o qual cora a matriz mineralizada em vermelho.

Diferenciação adipogênica

Uma alíquota celular foi depositada em placas de seis poços e cultivada em estufa umidificada a 37°C e 5 % CO₂, com 3 mL de meio de diferenciação adipogênica. O meio era constituído por: DMEM com 15 de HEPES (Invitrogen, California, USA); 10% de SFB; 1% de ITS + Premix (BD, Franklin Lakes, EUA); 1 µM de dexametasona (Alfa Aesar, Heysham, Reino Unido); 100 µM de indometacina; 500 µM de 3-isobutyl-1-methyl xantina (IBMX); 1% de antibiótico e antimicótico. Uma porção de células destinadas para controle negativo foi cultivada apenas com DMEM; 15 mM de HEPES; 10% de SFB; e 1% de antibiótico e antimicótico. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias. Após três dias de cultivo o IBMX foi retirado do meio de cultivo e após 21 dias de cultivo, as células foram coradas com Oil-red O (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) o qual cora as gotículas de gordura em vermelho.

Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as células foram centrifugadas e resuspensas em DMEM/F12 previamente aquecido, a uma densidade de $1,6 \times 10^7$ células viáveis/ mL. Foram utilizadas placas de 12 poços, e depositou-se gotas de 5 µL desta solução celular no centro de cada poço, na qual foi levada para estufa umidificada a 37°C e 5% CO₂ por duas horas. Em seguida adicionou-se, em cada poço, o meio de diferenciação condrogênica previamente aquecido. As células foram cultivadas em estufa umidificada a 37°C e 5 % CO₂, com 2 mL de meio de diferenciação condrogênica. O meio era composto por: DMEM com 15 mM de HEPES (Invitrogen, California, USA); 10% de SFB; 1% de ITS + Premix (BD, Franklin Lakes, NJ, USA); 10 ng/mL de fator de crescimento transformador beta 3 recombinante humano (hTGFβ3); 50 nM de L-ácido ascórbico-2-fosfato (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA); 100 nM de dexametasona (Alfa Aesar, Heysham, Reino Unido); 100 µL de antibiótico e antimicótico. Uma porção de células destinadas para controle negativo foi cultivada apenas com DMEM/ 15 mM HEPES; 10% de SFB; 1% de antibiótico e antimicótico. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias e após 21 dias de cultivo, as células foram coradas com Alcian Blue o qual cora os proteoglicanos em azul. O sedimento celular foi fixado em formol tamponado a 10%

e posteriormente processados histologicamente. As lâminas foram coradas em HE e submetidas à imuno-histoquímica para colagenase tipo 10.

Citometria de fluxo

Uma alíquota das células foi testada no citômetro de fluxo (FACScalibur; BD; Franklin Lakes, NJ, USA) para identificação dos marcadores de superfície de CTM e ausência dos marcadores de CTH. Foram utilizados os marcadores positivos de CTM, CD105 e CD90, e os marcadores negativos CD45 e CD11b (estes últimos, marcadores de CTH). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: mouse anti-human CD105 (Invitrogen, California, EUA), mouse anti-human CD90 (ABD Serotec, Oxford, Reino Unido), mouse anti-human CD45 (ABD Serotec, Oxford, Reino Unido) e mouse anti-human CD11b (ABD Serotec, Oxford, Reino Unido). O anticorpo isótopo correspondente foi utilizado como controle negativo e, como anticorpo secundário, utilizou-se o anticorpo goat anti-mouse IgG (H/L):FITC (ABD Serotec, Oxford, Reino Unido). Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo (TreeStar, Ashland, USA).

Procedimento cirúrgico

A medicação pré-anestésica incluiu tranquilização dos animais com detomidina (0,02 mg/kg/IV), seguida de éter gliceril guaiacol (110mg/kg/IV) com manutenção em anestesia geral inalatória com isoflurano vaporizado em oxigênio (15mL/kg), em circuito semifechado. Realizou-se, em seguida, o acesso ao nervo ulnar, que incluiu: incisão linear da pele no terço médio do osso rádio em posição caudolateral; divulsão roma do tecido subcutâneo; incisão da fáscia profunda do antebraço; e dessa maneira, a exposição do nervo ulnar e a realização subsequente da neurotomia (Figuras 1A e 1B).

Para a realização da técnica de tubulização, foi utilizado um tubo flexível de silicone (Perfitecnica, Salto, Brasil), com comprimento de 2,0 cm e diâmetro interno de 3 mm, previamente esterilizado com formoldeído 38% por 30 minutos e lavado com solução fisiológica para retirada do produto. O coto proximal do nervo ulnar foi introduzido e fixado ao tubo, com ponto único em "U" no epineuro, utilizando fio de náilon 6-0. Em seguida, o coto distal foi inserido e fixado ao tubo da mesma

maneira do coto proximal, respeitando-se um espaço de 5 mm entre os cotos (Figuras 1C e 1D).

No interior do tubo se silicone depositaram-se as soluções respectivas a cada grupo: 200 µl de soro fisiológico no GC, e 200 µl de FCM e ADSC, respectivamente nos grupos FCM e ADSC, com uma seringa de 1 mL (Figuras 1E e 1F). Em seguida, realizou-se a reaproximação do tecido subcutâneo com o fio absorvível Caprofyl (Ethicon, Cornelia, EUA) e, a sutura de pele em pontos separados simples. Todos os procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgicos foram realizados no Hvet (FAV/UnB).

Os animais foram mantidos em baias individuais e receberam antibioticoterapia sistêmica com penicilina benzatina (30.000 UI/kg/IM) em três aplicações, a cada 48 horas, e fenilbutazona (4,4 mg/kg/IV), uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Os curativos foram realizados a cada sete dias, até a remoção da sutura de pele e bandagem com 13 dias de pós-operatório.

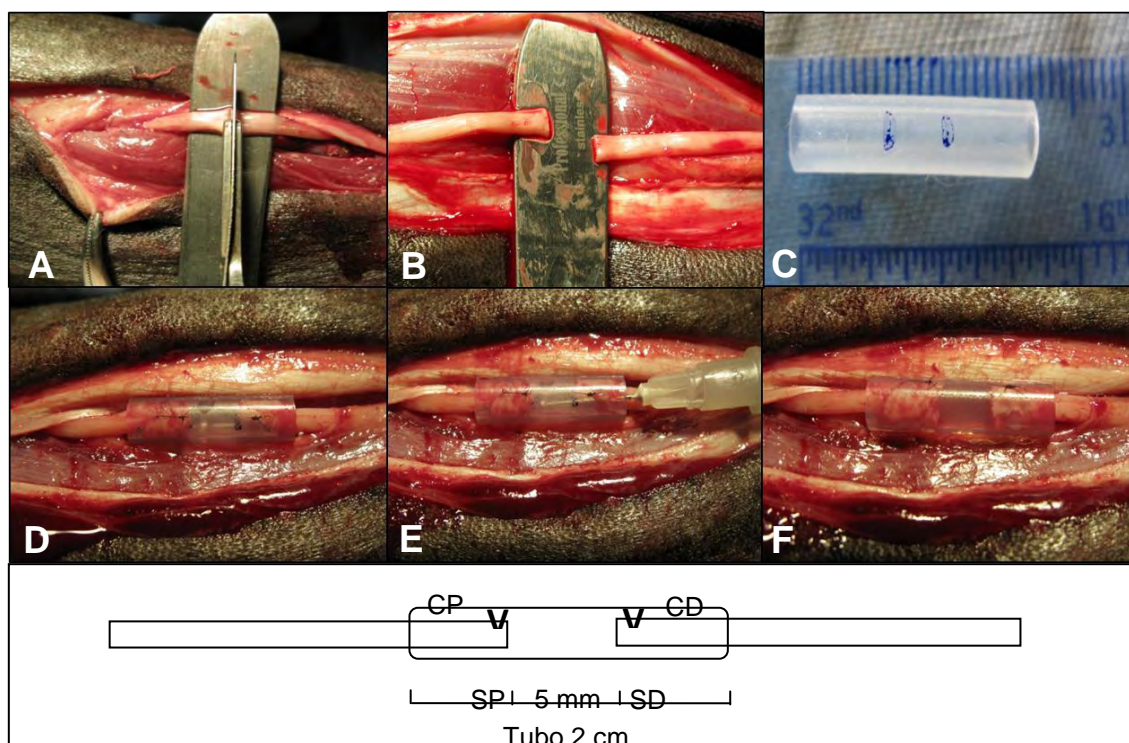


FIGURA 1 - Procedimento de tubulização e aplicação do soro fisiológico, FCM e ADSC em nervos periféricos de equinos. A e B: neurotomia do nervo ulnar de equino; C: tubo de silicone de 2cm de comprimento com demarcação de 5 mm de espaço; D: fixação dos cotos nervosos no interior do tubo de silicone; E e F: deposição de FCM no interior do tubo de silicone. No esquema, **V** representa os pontos de sutura aplicados no nervo e tubo de silicone; SP: sutura proximal; SD: sutura distal; CP: cabo proximal; CD: cabo distal.

Colheita de material e avaliação histomorfológica

Foram realizadas as biopsias dos nervos ulnares nas 13^a e 26^a semanas, nos três grupos, e obteve-se um total de 30 fragmentos de 4 cm cada, compreendendo 2 cm proximais e 2 cm distais ao local da neurotomia. Para avaliação da marcação com o nanocristal em microscopia de fluorescência, realizou-se um *imprint* em lâminas histológicas dos fragmentos obtidos dos grupos FCM e ADSC (Figuras 2A e 2B), e as lâminas foram armazenadas ao abrigo de luz.

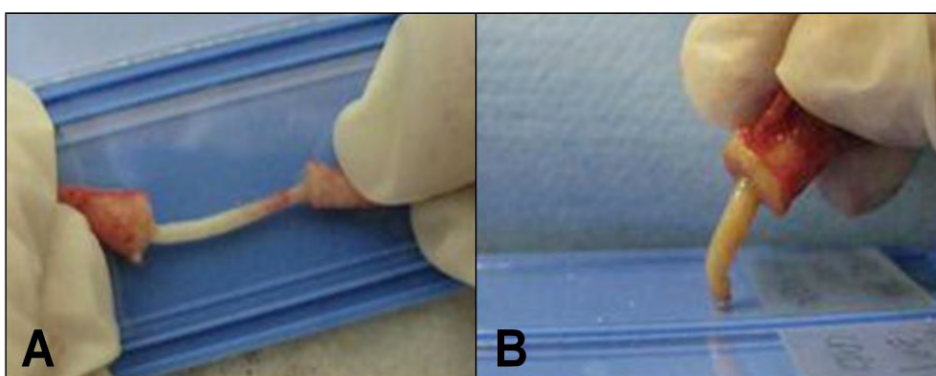


FIGURA 2: *Imprint* em lâmina histológica do nervo ulnar de equinos no grupo FCM1, após biopsia e retirada do tubo de silicone. A: *Imprint* de todo fragmento de nervo ulnar; B: *Imprint* do cabo de regeneração, após corte transversal do fragmento.

Os fragmentos de nervos foram fixados por 48 horas em formol a 10% tamponado e, em seguida, mantidos em álcool 70% até o processamento histológico. Os fragmentos, em blocos de parafina, foram cortados a 5 μ m, distendidos sobre lâminas histológicas e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e tricrômio de Masson e a 8 μ m para a coloração com luxol *fast blue*. Foram confeccionados cortes longitudinais nos cotos proximais (CP) e cabos de regeneração (CR) e cortes transversais nos cotos distais (CD). Tais procedimentos foram realizados no Laboratório de Histopatologia do Setor de Patologia Animal (EVZ/UFG).

Macroscopicamente, avaliaram-se as amostras quanto à regeneração completa entre os cotos, presença de tecido conjuntivo fibroso e aderências entre as estruturas do feixe vasculonervoso. Microscopicamente, avaliaram-se a proliferação axonal, a reorganização dos fascículos, o infiltrado inflamatório, a hemorragia, a

hiperemia, a hemossiderose e a degeneração walleriana pela coloração de HE. Para a avaliação do colágeno tipo I, empregou-se a coloração de tricrômio de Masson e para a avaliação da bainha de mielina empregou-se a coloração de luxol *fast blue*.

Para cada um dos parâmetros citados acima, foram realizadas análises descritivas e semi-quantitativas de todo o fragmento, por meio de microscopia óptica em objetiva de 10x e estabelecidos escores de zero a três, sendo: escore 0 - ausente (sem alterações); escore 1 - discreto (1-25% do fragmento); escore 2 - moderado (26-50% do fragmento); e escore 3 - acentuado (51-100% do fragmento).

Foram estabelecidas comparações entre as porções em cada nervo, entre os animais, entre os grupos e entre os momentos de biopsia. Foi realizada a estatística descritiva dos dados e aplicou-se o teste Qui-Quadrado e a correlação de Spearman, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando-se o software IBM SPSS Statistic versão 15.

RESULTADOS

Formação do cabo de regeneração e marcação com nanocristal

Em todas as amostras do grupo controle e dos grupos experimentais, houve completa formação do CR, unindo-se assim o CP ao CD (Figura 3C e 3D). Macroscopicamente visualizou-se fibrose ao redor do tubo de silicone e aderência no feixe vasculonervoso em quantidade acentuada em todas as amostras (Figura 3A e 3B). Microscopicamente, observou-se uma área bem definida de tecido de conjuntivo fibroso ao redor dos CP e CD, adjacente ao epineuro, com variação quanto à quantidade, de discreta a acentuada (Figura 3E), em todos os grupos, independentemente do intervalo das biopsias.

Em relação à endocitose do nanocristal, foi observada em microscopia de fluorescência, marcação discreta a moderada em vermelho fluorescente apenas no grupo FCM1, o que demonstra a presença do marcador nas células por até três meses após a implantação do grupo que recebeu a FCM (Figura 4).

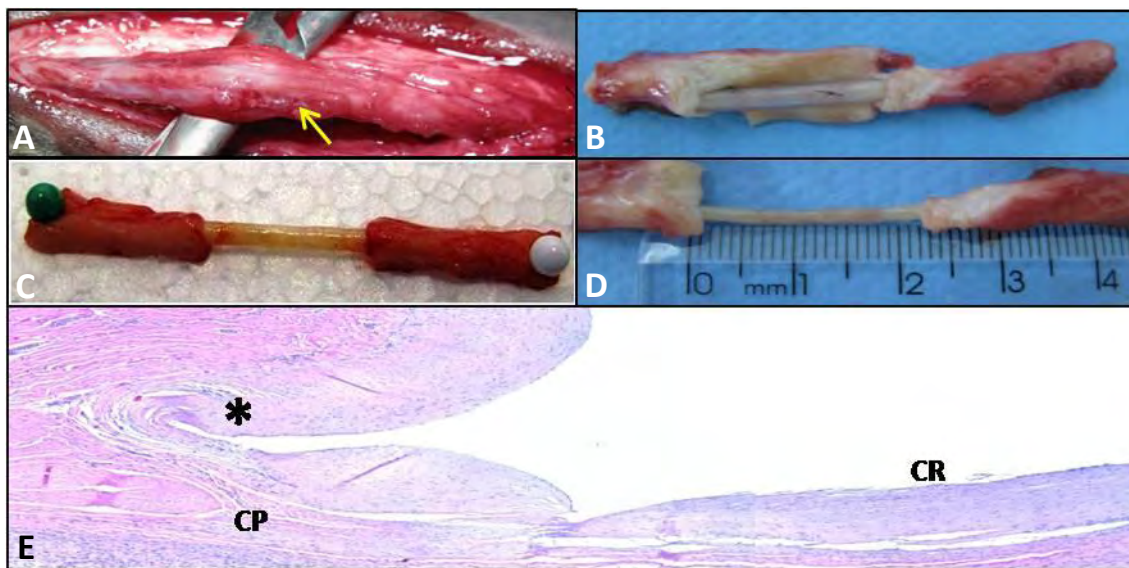


FIGURA 3 - Biopsias de nervos ulnares de equinos submetidos à técnica de tubulização e terapia celular, com 13 semanas de biopsia. A: grupo controle com aderência no feixe vasculonervoso (seta amarela); B: grupo controle, mostrando presença acentuada de tecido fibroso ao redor do tubo; C: grupo controle com formação completa do CR; D: grupo FCM com formação completa do CR; E: grupo controle, com tecido conjuntivo fibroso (asterisco) ao redor do CP, HE, 5x. CP: coto proximal; CR: cabo de regeneração.

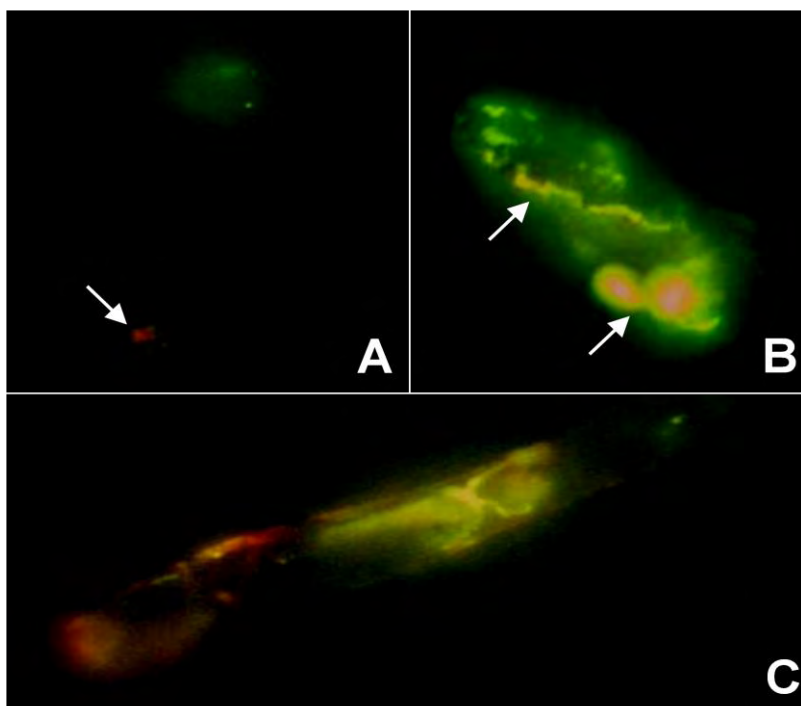


FIGURA 4 - Fotomicrografia de fluorescência da endocitose do nanocristal no grupo FCM1, com marcação em vermelho, de forma discreta (A e B, setas brancas) e moderada (C).

Diferenciação celular das ADSC e citometria de fluxo

Foi confirmada a diferenciação celular das ADSC nas linhagens de células-tronco mesenquimais, com a utilização dos meios indutores para cada caso. Aos 21 dias de cultivo, as células se coraram pelo *Alizarin red*, *Oil Red* e *Alcian Blue*, o que confirma a diferenciação das ADSC nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, respectivamente (Figura 5).

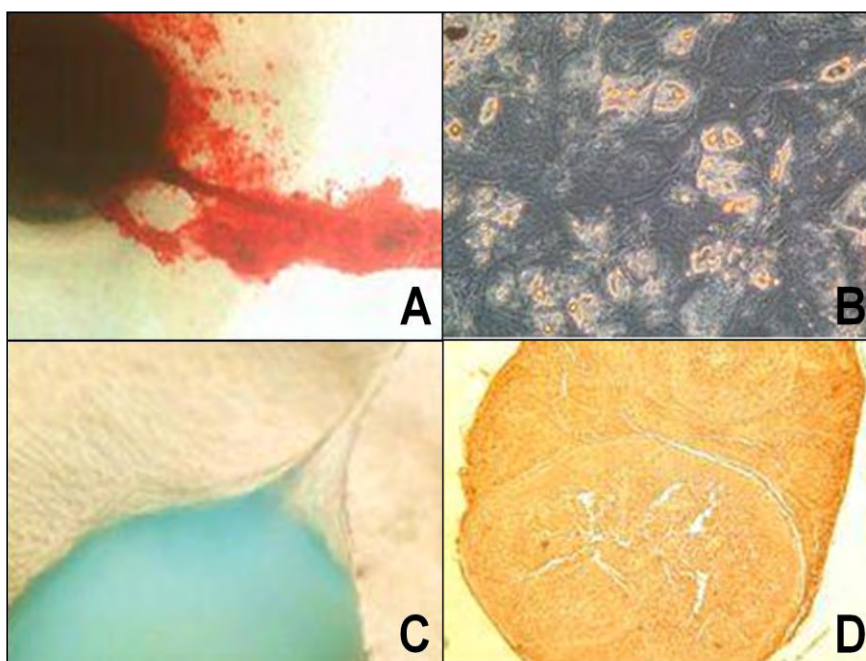


FIGURA 5 - Diferenciação celular de ADSC em linhagens mesenquimais. A: diferenciação osteogênica pela coloração de *Alizarin red*; B: diferenciação adipogênica pela coloração de *Oil Red*; C: diferenciação condrogênica pela coloração de *Alcian Blue*; D: imuno-histoquímica da micromassa condrogênica pelo colágeno 10.

A citometria de fluxo foi utilizada para a identificação dos principais marcadores de células-tronco mesenquimais. Foi confirmada positivamente a marcação dos anticorpos CD105 e CD90 em todas as amostras avaliadas demonstradas pelas médias de 96,48% e 94,94% respectivamente. Já com relação à marcação dos principais marcadores hematopoiéticos como CD45 e CD11b, houve marcação insignificante também em todas as amostras analisadas, com médias de 0,59% e 0,76% respectivamente, o que comprova a origem mesenquimal e não hematopoiética das células utilizadas para a implantação (Figura 6).

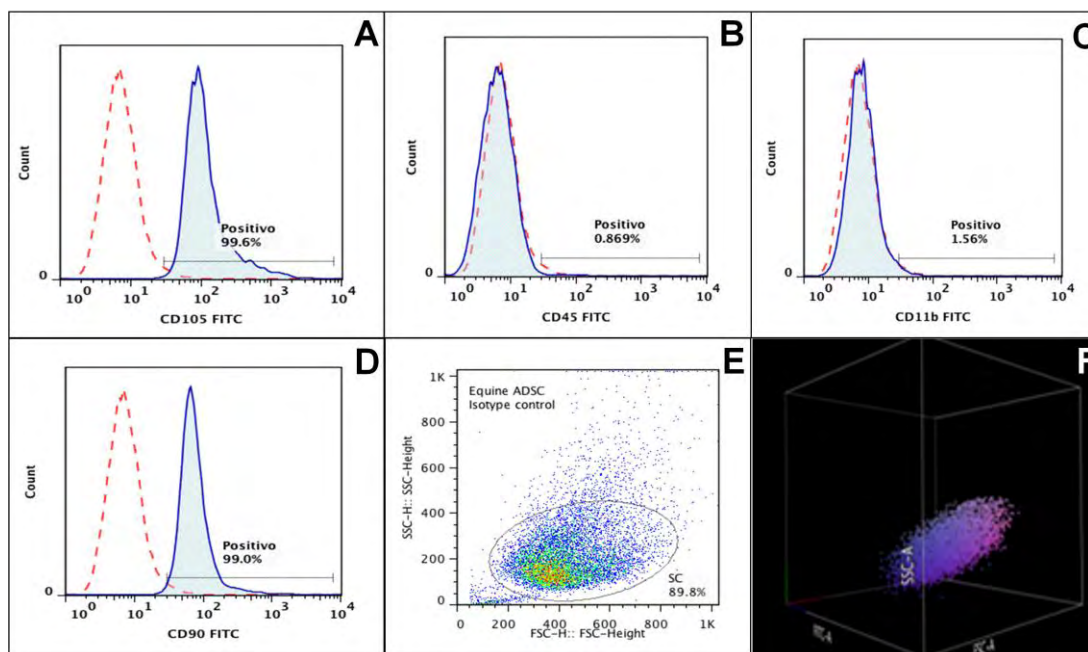


FIGURA 6 - Análise dos marcadores de células-tronco mesenquimais para ADSCs de equinos por citometria de fluxo. A: anticorpo CD105; B: anticorpo CD45; C: anticorpo CD11b; D: anticorpo CD90; E: dot plot das ADSC de equinos; F: representação 3D da população de ADSC de equinos. Linha azul: leitura do anticorpo testado; Linha vermelha: Controle isotipo negativo.

Hematoxilina e eosina – HE

Não foi visualizada proliferação axonal do CR até o CD, pois este apresentou processos degenerativos em 100% das amostras analisadas de todos os grupos (30/30). Constatou-se apenas proliferação acentuada de tecido conjuntivo entre os cotos e células de formato fusiforme e em meia lua neste tecido.

Degeneração walleriana (DW) foi observada em todas as amostras, porém apresentou-se de forma mais evidente no GC1, e menos evidente no grupo ADSC (Figuras 7A, 8C e 8D). Evidenciou-se assim, uma diminuição da ocorrência de DW nos grupos FCM e ADSC em relação ao GC. Com relação à hemorragia, esta foi observada em intensidade moderada em todos os grupos, à exceção do grupo FCM1, em que esta variável não foi evidenciada (Figura 7B e 8E). Em ambas as variáveis, houve diferença ($p < 0,05$) apenas entre os grupos quando analisados entre si. Os grupos FCM1 e ADSC apresentaram os menores índices de hiperemia (Figura 7C), porém sem diferença estatística. Em relação à hemossiderose, houve variação de ausente a moderada entre os grupos (Figura 7D e 8E), também sem diferença significativa.

Infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente linfocitário associado a raros macrófagos foi encontrado em 97% das amostras (29/30). Foi observado discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear em 20% das amostras (6/29), sem quatro pertencentes ao ADSC1. Verificou-se, uma diminuição do infiltrado inflamatório mononuclear nos momentos de 13 para 26 semanas de biopsia (Figura 7E, 8E e 8F). Houve diferença ($p < 0,05$) com relação aos grupos, aos momentos de biopsia e as porções CP, CR e CD.

Todas as amostras exibiram alguma reorganização fascicular, e o GC2 apresentou o maior grau. Os FCM2 e ADSC2 apresentaram escores moderados, enquanto os GC1 e FCM1 tiveram os menores índices de reorganização fascicular. Houve diferença estatística apenas com relação aos momentos de biopsia (13ª x 26ª semana) (Figuras 7F, 8G e 8H).

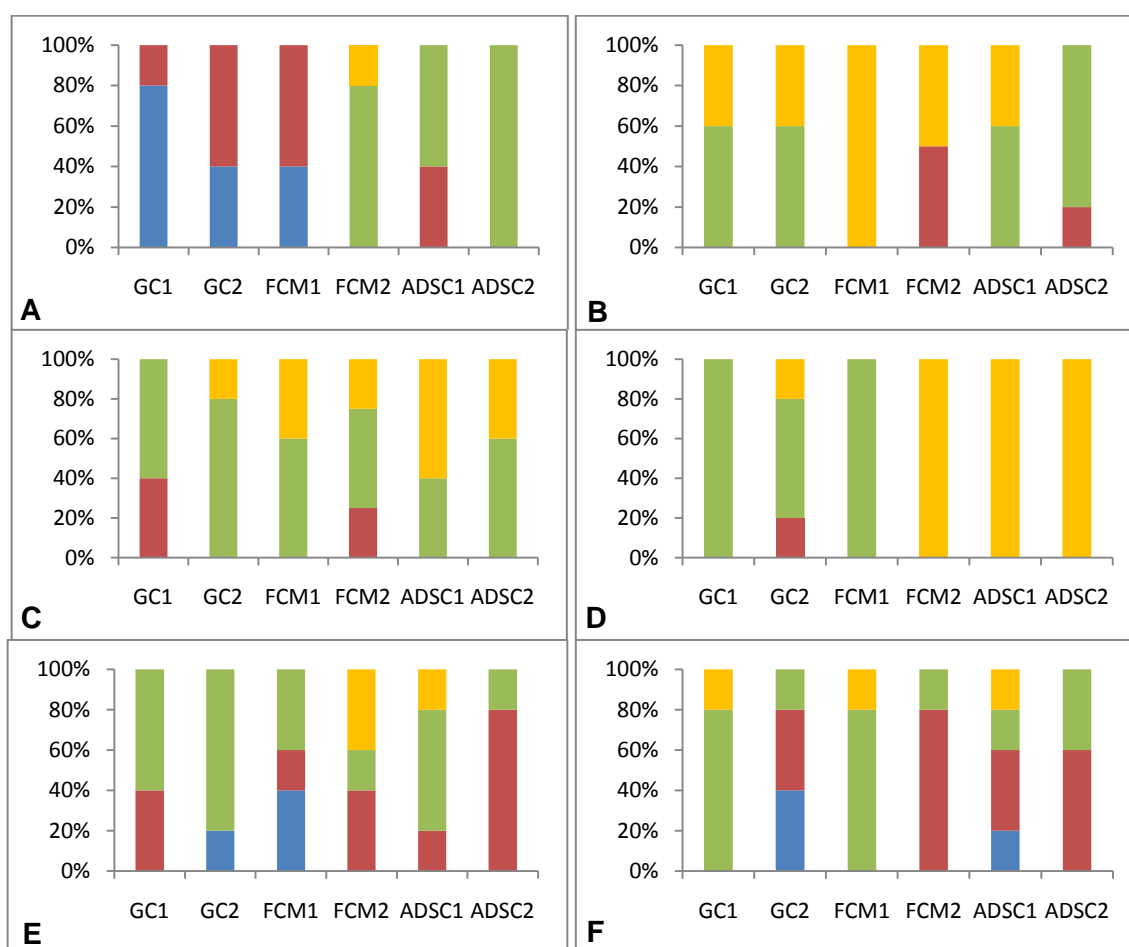


FIGURA 7 - Escores histológicos avaliados pela coloração de HE em nervos ulnares de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular. A: Degeneração walleriana; B: Hemorragia; C: Hiperemia; D: Hemossiderose; E: Infiltrado linfocitário; F: Reorganização de fascículos. ■ Ausente; ■ Discreta; ■ Moderada; ■ Acentuada.

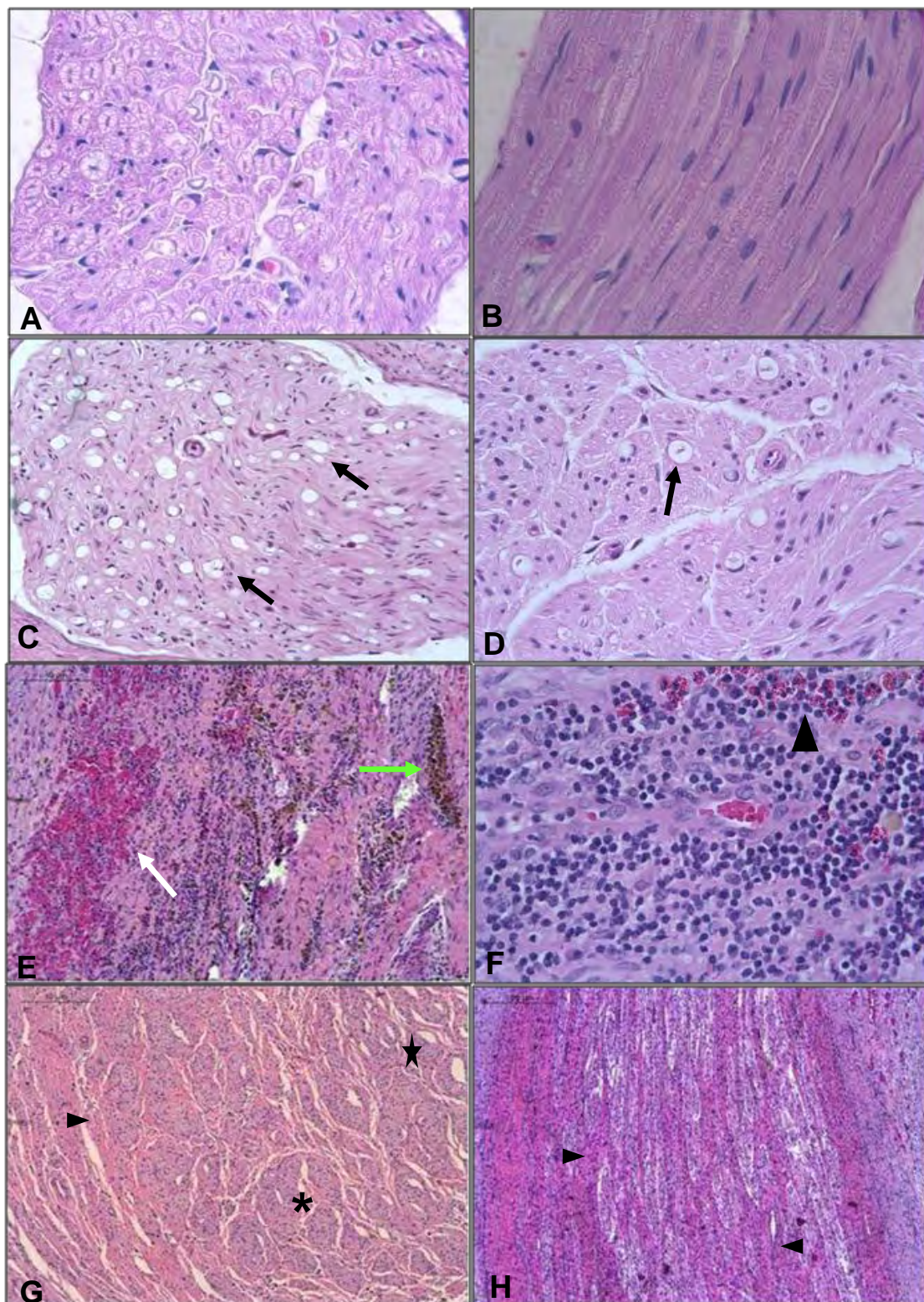


FIGURA 8 - Fotomicrografia de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular, pela coloração de HE. A e B: nervo ulnar normal em corte transversal e longitudinal, 40X; C: degeneração walleriana (setas pretas) acentuada em GC1, 20X; D: DW moderada em FCM2, 40X; E: infiltrado linfocitário moderado no CR com hemossiderose (seta verde) e hemorragia discreta (seta branca) em GC1, 10X; F: infiltrado mononuclear acentuado no CR, com eosinófilos (cabeça da seta), em GC1, 20X; G e H: reorganização fascicular discreta a moderada, em GC2. Fascículos e perineuro organizados de forma discreta (estrela), perineuro moderado (cabeça da seta) e fascículos moderados (asterisco), corte transversal e longitudinal, 10X.

Tricrômio de Masson

Com relação à avaliação do colágeno tipo I, corado em azul escuro, houve maior quantidade nos GC e FCM1, tanto nas porções de CP, como no CR (Figura 9 e 10). Já nos FCM2 e grupo ADSC, a quantidade de colágeno tipo I foi constante entre as porções, inferindo uma possível produção de colágeno tipo III no CR, corado em azul claro pela coloração de tricrômio de Masson. Não houve diferença estatística com relação aos grupos, momentos de biopsia e as porções CP, CR e CD.

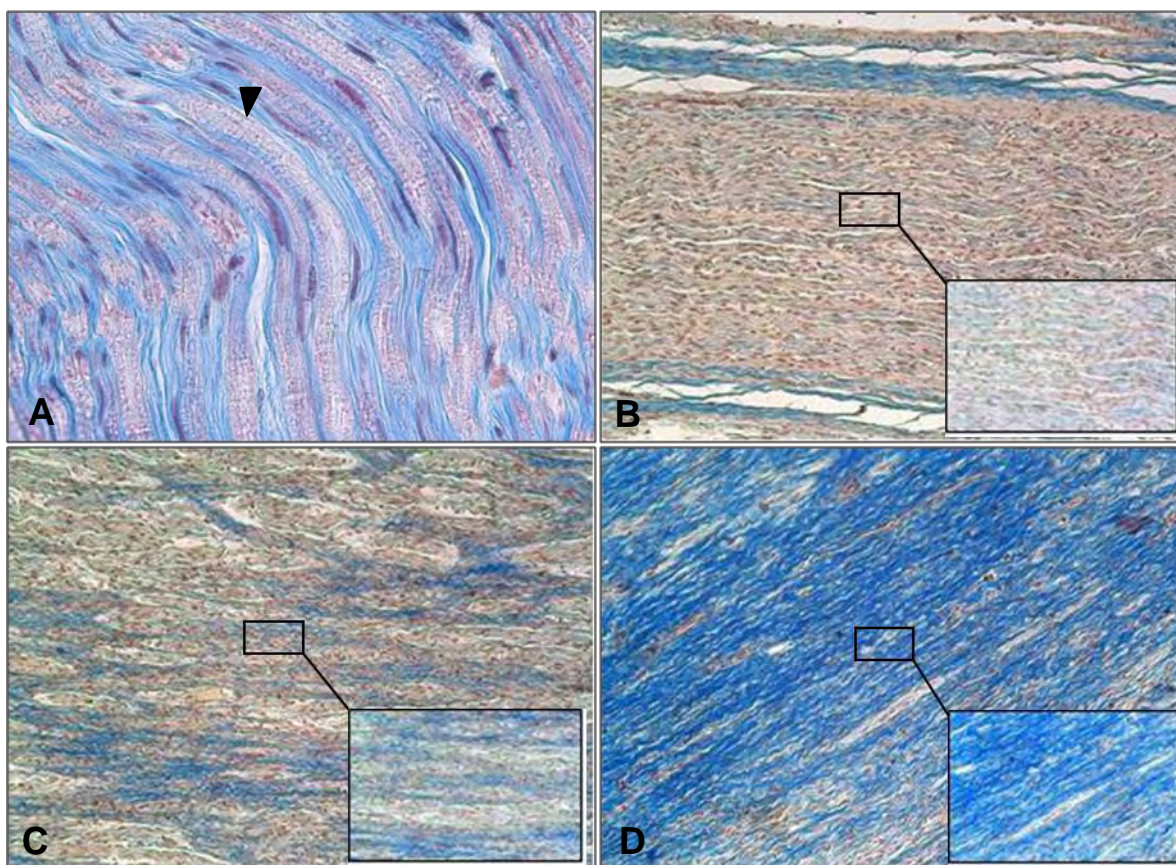


FIGURA 9 - Fotomicrografia de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular, pela coloração de tricrômio de Masson com diferentes graus de maturação de colágeno tipo I. A: nervo ulnar normal com axônios íntegros e bainha de mielina corada em vermelho (cabeça da seta), 40X; Cabo de regeneração (CR) discreto em ADSC1 (B), moderado em GC1 (C) e acentuado em GC1 (D), 10X. Detalhe em B, C e D, 20X.

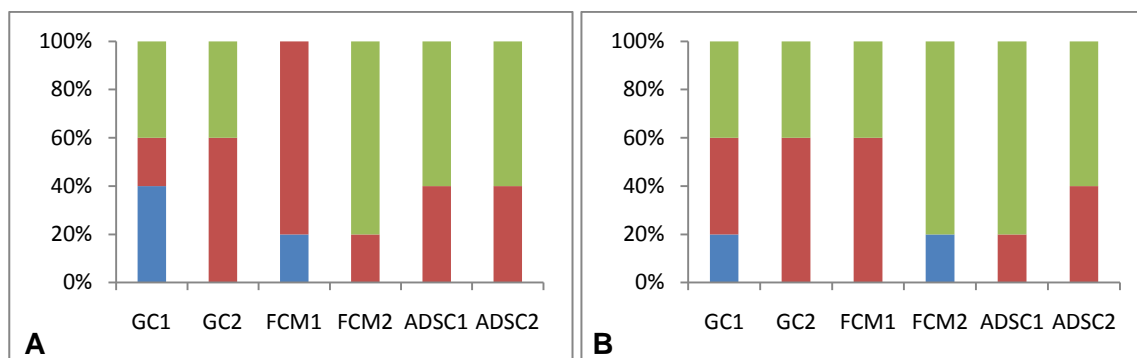


FIGURA 10 - Escores da maturação de colágeno tipo I avaliados pela coloração de tricrômio de Masson em nervos ulnares de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular. A: Coto proximal; B: Cabo de regeneração. ■ Ausente; ■ Discreta; ■ Moderada; ■ Acentuada.

Luxol *fast blue*

Em todos os grupos foi visualizada formação mielínica em alguma porção do nervo ulnar. No CP observou-se predominância de moderada mielinização no GC e discreta no grupo FCM e em ADSC2. No CR houve apenas discreta visualização de mielina no GC e FCM2. Já no CD, pôde-se visualizar mielinização discreta GC e ADSC. O FCM1 foi o único que não apresentou mielinização em nenhum dos cabos (Figura 11 e 12).

Houve diferença em relação ao CP, CD e CR, porém não houve diferença em relação à avaliação dos momentos de biopsia e entre os grupos. Houve correlação moderadamente positiva ($p < 0,05$, $r = 0,425$) entre as colorações de tricrômio de Masson e luxol *fast blue* nas porções de CP e CR, no momento de 13 semanas (GC1, FCM1 e ADSC1), o que demonstra que a quantidade de colágeno tipo I e de mielina aumenta simultaneamente.

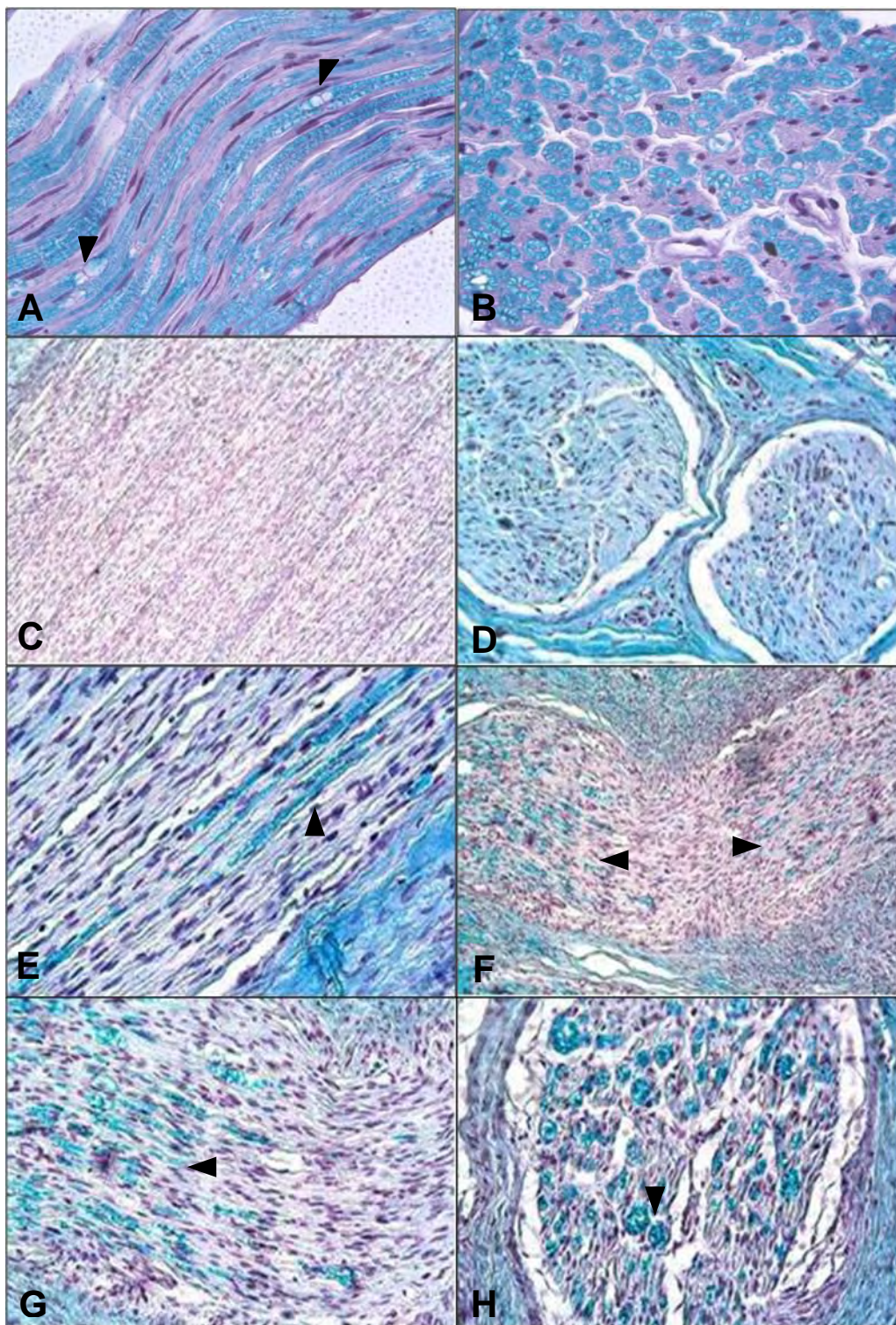


FIGURA 11 - Fotomicrografia de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular, pela coloração de luxol fast blue, com diferentes graus de mielinização. A e B: nervo ulnar normal com axônios íntegros e bainha de mielina corada em azul (nódulo de Ranvier – cabeça da seta), 40X; C e D: CR e CD (respectivamente) evidenciando ausência de mielina, 10X e 20X; E: CR com mielina discreta em CG1 (cabeça da seta), 20X; F e G: CP com mielina discreta em CG1 (cabeça da seta), 10X e 20X; H: CP com mielina moderada em CG1 (cabeça da seta), 20X.

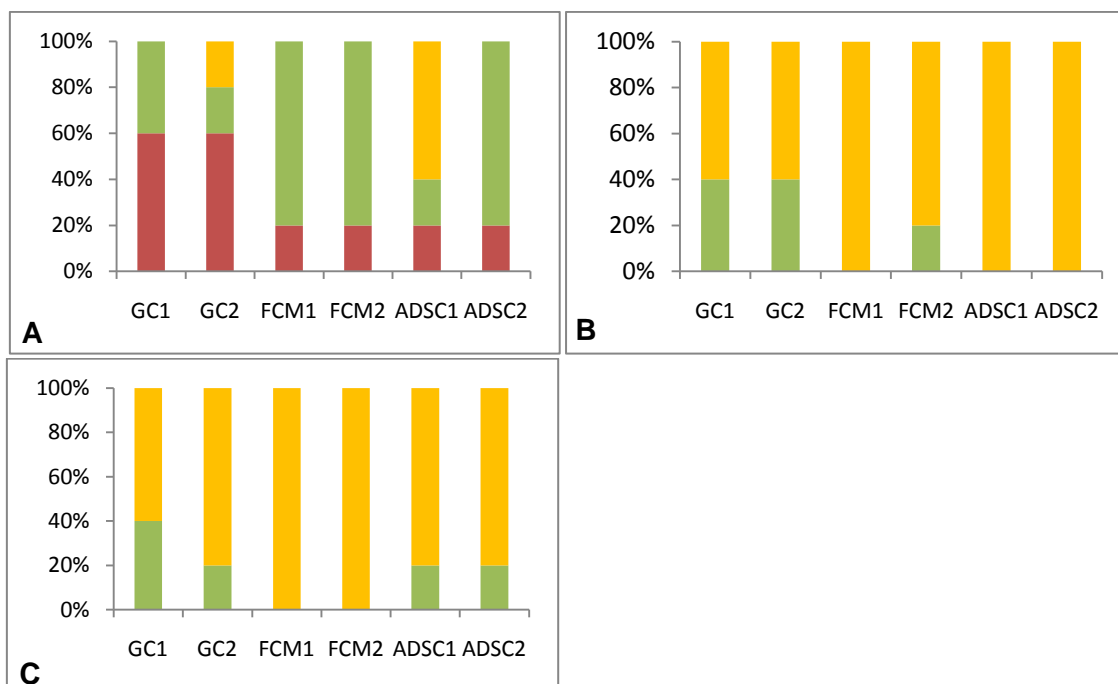


FIGURA 12 - Escores de mielina avaliados pela coloração de luxol *fast blue* em nervos ulnares de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular.

A: Coto proximal; B: Cabo de regeneração; C: Coto distal.

■ Ausente; ■ Discreta; ■ Moderada; ■ Acentuada.

DISCUSSÃO

Segundo STANG et al. (2009) a técnica de reconstrução nervosa ideal deve ser aquela que permita uma imediata reconstrução do nervo no momento da lesão; não crie tensão e aprisionamento no local da sutura; não utilize material não biodegradável permanentemente; não necessite de tratamento farmacológico adicional; e que permita a utilização de fatores de crescimento ou terapias celulares para uma melhor regeneração do nervo. O procedimento cirúrgico adotado neste experimento respeitou a maioria dos atributos citados acima, o que pode ter contribuído para a completa formação do CR, o que também foi observado por MATSUMOTO et al. (2000), WANG et al. (2005), DELISTOIANOV et al. (2006), NIE et al. (2007), COLOMÉ et al. (2008), MATSUTOMO et al. (2010), ORBAY et al. (2012) e SHEN et al. (2012).

No presente estudo, observou-se, macro e microscopicamente, uma área bem definida de tecido conjuntivo fibroso circundando os cotos proximais e distais, adjacentes ao epineuro, com variação quanto à sua quantidade. De maneira semelhante MATSUMOTO et al. (2000), DELISTOIANOV et al. (2006),

MATSUTOMO et al. (2010) e LIU et al. (2011), também observaram macroscopicamente fibrose exuberante ao redor do tubo utilizado e aderência no feixe vasculonervoso em todas as amostras coletadas.

A presença de tecido conjuntivo ao redor do cabo de regeneração e a formação de neuromas não foram observadas neste estudo, reafirmando os achados de MELLO et al. (2001), WANG et al. (2005), HU et al. (2007), COLOMÉ et al. (2008), LIU et al. (2011) e ORBAY et al. (2012). O tubo de silicone suturado ao epineuro foi eficaz em proteger o local de reparo da invasão de tecido conjuntivo, que foi observado externamente ao tubo, mas não internamente. Muitos experimentos (HU et al., 2007; KINGHAM et al., 2007; COLOMÉ et al. 2008; SUMMA et al., 2010; ORBAY et al., 2012; SHEN et al., 2012) têm sido realizados usando-se invólucros ou colas nos cotos, em torno de suturas término-terminais, com a finalidade de prevenir a invasão de tecido conjuntivo no local do reparo, evitando efeitos constritivos do tecido cicatricial externo. Além da proteção mecânica, estes envelopes promovem regeneração axonal longitudinal, dificultando a formação de neuromas, como afirmado por HALL (2005), DELISTOIANOV et al. (2006) e STANG et al. (2009).

Foi possível observar que, tanto a técnica cirúrgica utilizada, como os tempos de 13 e 26 semanas estipulados para biopsia, foram eficazes para a formação do cabo de regeneração, em todas as amostras, propiciando início de reorganização do tecido nervoso periférico com ausência de neuromas.

Com relação à marcação pelo nanocristal, foi visualizada marcação em vermelho fluorescente apenas no FCM1, confirmando que as células se mantiveram no local da lesão. Este padrão de marcação também foi descrito por OLIVEIRA et al. (2009), OLIVEIRA et al. (2010) e TOGNOLI et al. (2009). A ausência de marcação na ADSC já na primeira biopsia sugere, não a falta de endocitose do marcador pelas CTM, mas sim a ocorrência exacerbada de proliferação celular tendo atingido até a sexta ou mais gerações, tempo limite que o marcador fica armazenado intracelularmente (TOGNOLI et al., 2009; OLSSON et al., 2011). Isso pode ser sustentado pelo fato da ADSC ser uma população mais homogênea de CTM em relação à FCM, e que por definição, possui maior capacidade de autorenovação e diferenciação celular (ZUK et al., 2001; MEIRELLES et al., 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006).

Neste trabalho, microscopicamente, não houve proliferação axonal visível do coto proximal até o coto distal, apenas proliferação de tecido conjuntivo na região entre ambos locais, e os mesmos achados também observados por DELISTOIANOV et al. (2006), em cavalos e COLOMÉ et al. (2008), em coelhos. No entanto, houve grande quantidade de células com formato fusiforme e meia lua no tecido conjuntivo entre os cotos, sugerindo a migração de fibroblastos e células de Schwann, respectivamente para o local de regeneração. Isso representaria uma fase inicial da reparação nervosa e, provavelmente, um período de tempo mais prolongado poderia ter promovido a visualização de alguma regeneração mais evidente do CR. WANG et al. (2005) também observaram grande quantidade de tecido conjuntivo entre os cotos, no entanto os autores relataram presença de axônios com bainha de mielina fina. Os mesmos descreveram ainda que, no grupo controle, que não recebeu a tubulização foi visualizada pequena quantidade de axônios em dois dos cinco cães avaliados, além de maior quantidade de tecido conjuntivo, de forma desorganizada.

O tecido conjuntivo é basicamente preenchido por colágeno, o qual foi observado de maneiras diferentes nos grupos experimentais, em relação ao controle, sendo evidenciada predominância do colágeno tipo III nos grupos FCM2 e ADSC. Assim, infere-se maior atividade de regeneração e reorganização dos fascículos nervosos. GUIMARÃES et al. (2006) analisando o nervo periférico normal do gato doméstico, observaram maior quantidade de colágeno tipo I em relação ao III, tanto no endoneuro como no perineuro. Isso contrapõe os resultados desta pesquisa, que demonstraram maior atividade do colágeno tipo III na reorganização fascicular nos grupos FCM2 e ADSC. Neste caso, a presença de colágeno tipo III pode representar uma fase ainda imatura da reparação tecidual, o que é sustentado por MCFARLIN et al. (2006), SUMMA et al. (2010), LADAK et al. (2011), LIU et al. (2011), ORBAY et al. (2012) e SHEN et al. (2012), que evidenciaram melhor reorganização tecidual nos grupos tratados com CTM em relação ao grupo controle.

Neste estudo verificou-se reorganização de fascículos nervosos em fase inicial, em todos os grupos, porém mais acentuada nos momentos de 26 semanas de biopsia, indicando início do restabelecimento de vitalidade no tecido nervoso, mesmo na ausência do axônio no CR, já que a proliferação de perineuro pode caracterizar organização do tecido conjuntivo que reveste o tecido nervoso. Este fato é considerado satisfatório, já que o tempo da regeneração do neurônio com proliferação axonal varia conforme a extensão a ser regenerada. Isto foi confirmado

por MATSUMOTO et al. (2010), que avaliaram a regeneração nervosa periférica de cães, por até 12 meses após tubulização, e verificaram melhora nas funções motoras e sensitivas, quanto mais tardio o tempo pós lesão.

Com relação à degeneração walleriana (DW), esta foi observada em todos os grupos, porém, os grupos FCM2 e ADSC apresentaram menor grau de DW quando comparados ao GC. Isso indica que as células FCM e ADSC auxiliaram na diminuição ou controle dos processos degenerativos, concordando com os achados de COLOMÉ et al. (2008).

Com relação à formação da bainha de mielina, evidenciou-se um processo de mielinização do CP em direção ao CR e CD, como é esperado em um processo de regeneração nervosa periférica. De maneira semelhante, MATSUMOTO et al. (2000), WANG et al. (2005), LIU et al. (2011) e ORBAY et al. (2012) visualizaram, no CR, fibras nervosas mielinizadas, ainda com diâmetro pequeno, e bainha de mielina fina e em maior quantidade no grupo experimental, em relação ao controle. Já CARRIEL et al. (2011), não observou mielina no CD dos nervos regenerados, apenas nas porções proximais e de regeneração, diferente do observado neste estudo, em que foi evidenciada mielina também nas porções distais.

Os nervos que receberam ADSC obtiveram melhores resultados em relação aos demais grupos estudados, enfatizando a superioridade das ADSC em relação à FCM e ainda ao tratamento sem algum tipo de terapia celular para a regeneração nervosa periférica. Isso pode ser justificado pelo fato das ADSC serem uma população celular apenas de células-tronco mesenquimais, enquanto a FCM possui quantidade consideravelmente menor de células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas. Somado a isso, UEMURA et al. (2006) sugerem a possibilidade de melhora na regeneração tecidual por efeitos parácrinos mediados pelas células transplantadas, ao invés, apenas, de um processo de transdiferenciação celular, o que também aumentariam as possibilidades de melhores resultados no grupo ADSC.

Diante dos fatos obtidos e dos tempos de biopsia atribuídos, há a necessidade de um tempo maior para ocorrer completa regeneração do tecido nervoso periférico após lesão.

CONCLUSÃO

A técnica cirúrgica de tubulização utilizada no presente estudo foi eficaz e o tempo mínimo de 13 semanas foi suficiente para a formação do cabo de regeneração, propiciando início de reorganização do tecido nervoso periférico, sem a formação de neuromas. Baseado nos achados histopatológicos, a terapia com FCM e ADSC favorece a regeneração nervosa periférica, visto que os grupos experimentais apresentaram melhores resultados em relação ao grupo controle. A terapia celular com ADSC é mais eficiente na regeneração do nervo ulnar de equinos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Edital Nº 17/2008) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF – Edital N.º 05/2008) pelo apoio financeiro cedido ao projeto. Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (EVZ/UFG) pela concessão da bolsa de auxílio à pesquisa (CNPq). À prof. Dra. Carolina Madeira Lucci (Instituto de Ciências Biológicas /UnB) pelo apoio e espaço concedido à execução do cultivo celular. À Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Distrito Federal (SEAPA-DF) pela cessão dos animais utilizados no projeto. À Universidade de Brasília (UnB), em especial ao Hospital Veterinário de Grandes Animais por permitir a utilização das instalações para realização das coletas de medula óssea, tecido adiposo, procedimentos cirúrgicos e internação dos animais.

REFERÊNCIAS

1. AQUINO, J. B.; HJERLING-LEFFLER, J.; KOLTZENBURG, M.; EDLUND, T.; VILLAR, M. J.; ERNFORS, P. In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. **Experimental Neurology**, Nova Iorque, v.198, n.2, p.438–449, 2006.
2. BARREIRA, A. P. B. **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultra-**

- sonográfica e imuno-histoquímica.** 2005. 98f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
3. BRAVO, M. O.; MORAES, J. M.; DUMMONT, C. B. S.; FILGUEIRAS, R. R.; HASHIMOTO, H. H.; GODOY, R. F. Isolamento, expansão e caracterização de células-tronco do tecido adiposo de equinos. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.28, n.2, p. 66-74, 2012.
 4. CARRIEL, V.; GARZO´N, I.; ALAMINOS, M.; CAMPOS, A. Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach. **Histochemistry and cell biology**, Berlim, v.136, p.709–717, 2011.
 5. COLOMÉ, L. M.; GOMES, C. G.; CROSIGNANI, N.; PAZ, A. H.; LUGO, A. A.; GUIMARÃES, K. M.; FOERSTROW, L. P.; TESSARI, J. P.; COLOMÉ, L. M.; GRAÇA, D. L.; MEURER, L.; PASSOS, E. P.; PIPPI, N. L.; CONTESINI, E. A.; LIMA, E. O. C. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.9, p.2529-2534, 2008.
 6. DELISTOIANOV, N.; MACORIS, D.G.; GODOY, R.F.; ALESSI, A.C. Comparação entre duas técnicas de neurorrafia do digital palmar em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.1, p.44-51, 2006
 7. GUIMARÃES, G. C.; MACHADO, M. R. F.; da CRUZ, C.; SANTOS, A. L. Q.; MIGLINO, M. A.; CATTELAN, J. W. Morfologia microscópica do nervo radial do gato doméstico (*Felis catus domesticus* LINNAEUS, 1758). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 3, p. 127-137, 2006.
 8. HALL, S. The response to injury in the peripheral nervous system. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Londres, v.87-B, n.10, p.1309-1319, 2005.

9. HOWS, J. Adult stem cell therapy beyond haemopoietic stem cell transplantation? **Transplant Immunology**, Sevenoaks, v. 14, p. 221-223, 2005.
10. HU, J.; ZHU, Q. T.; LIU, X. L.; XU, Y. B.; ZHU, J. K. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. **Experimental Neurology**, Nova lorque, v.204, p.658–666, 2007.
11. KINGHAM, P.J.; KALBERMATTEN, D.F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S.J.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, Nova lorque, v.207, n.2, p.267–274, 2007.
12. LADAK, A.; OLSON, J.; TREDGET, E. E.; GORDON, T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. **Experimental Neurology**, Nova lorque, v.228, p.242–252, 2011.
13. LIU, G. B.; CHENG, Y. X.; FENG, Y. K.; PANG, C. J.; LI, Q.; WANG, Y.; JIA, H.; TONG, X. J. Adipose-derived stem cells promote peripheral nerve repair. **Archives of medical science**, Poznań, v.4, p.592-596, 2011.
14. MADDURI, S.; GANDER, B. Growth factor delivery systems and repair strategies for damaged peripheral nerves. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 274-282, 2012
15. MATSUMOTO, K.; OHNISHI, K.; KIYOTANI, T.; SEKINE, T.; UEDA, H.; NAKAMURA, T.; ENDO, K.; SHIMIZU, Y. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)–collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. **Brain Research**, Amsterdam, v.868, p.315–328, 2000.
16. MATSUMOTO, I.; KANEKO, M.; ODA, M.; WATANABE, G. Repair of intra-thoracic autonomic nerves using chitosan tubes. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, Amsterdam, v.10, p.498–501, 2010.

17. MCFARLIN, K.; GAO, X.; LIU, Y. B.; DULCHAVSKY, D. S.; KWON, D.; ARBAB, A. S.; BANSAL, M.; LI, H.; CHOPP, M.; DULCHAVSKY, S. A.; GAUTAM, S. C. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound repair and regeneration**, Saint Louis, v.14, p.471–478, 2006.
18. MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v.119, n.11, p.2204-2213, 2006.
19. MELLO, L.R.; FELTRIN, Y.; SELBACH, R.; MACEDO JUNIOR, G.; SPAUTZ, C.; HAAS, L.J. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v.59, n.2-B, p.372-379, 2001.
20. NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin, v.174, p.249–282, 2006.
21. NIE, X.; ZHANG, Y.-J.; TIAN, W.-D.; JIANG, M.; DONG, R.; CHEN, J.-W.; JIN, Y. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue-engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v.36, n.1, p. 32–38, 2007.
22. NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.69, p.928–937, 2008.
23. OLIVEIRA, D. M.; ALMEIDA, B. O.; MARTI, L. C.; SIBOV, T. T.; PAVON, L. F.; MALHEIROS, D. M. A. C.; CAMPOS, A. H. A marcação de células-tronco mesenquimais humanas com *quantum dots* possibilita a identificação de células transplantadas enxertadas em corações de porcos após o infarto do miocárdio. **Einstein**, São Paulo, v.7, n.3-Pt 1, p.284-289, 2009.

24. OLIVEIRA, G. K.; RAISER, A.G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F. Z.; MARTINS, D. B.; DEZENGRINE, R.; SANTOS JÚNIO, E. B.; RAPPETI, J.; TRINDADE, L. B.; TOGNOLI, G. K.; PIPPI, N. L.; SAUSEN, L. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n.1, p.72-79, 2010.
25. OLSSON, D. C.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; OLIVEIRA, G. K.; TREICHE, T. L. E.; SALBEGO, F. Z.; Marcadores fluorescentes coloidais: conceitos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, online, 2011.
26. ORBAY, H.; UYSAL, A. C.; YAKUSOKU, H.; MIZUNO, H. Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, Amsterdam, v.65, n.5, p. 657-664, 2012.
27. PENTEADO, F. C. L.; ORELLANA, M. D.; FONTES, A. M.; KASHIMA, S.; COVAS, D. T. Diferenciação hepatocítica de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 28, n.3, p.325 - 334, 2007.
28. PERONI, D.; SCAMBI, I.; PASINI, A.; LISI, V.; BIFARI, F.; KRAMPERA, M.; RIGOTTI, G.; SBARBATI, A.; GALIE, M. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. **Experimental Cell Research**, Nova Iorque, v.314, n.2, p.603-615, 2008.
29. SHEN, C. C.; YANG, Y. C.; LIU, B. S. Peripheral nerve repair of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in a biodegradable reinforced nerve conduit. **Journal of biomedical materials research Part A**, Hoboken, v.100A, n.1, p.48–63, 2012.
30. STANG, F.; KEILHOFF, G.; FANSA, H. Biocompatibility of different nerve tubes. **Materials**, Basel, v.2, p.1480-1507, 2009.

31. STASHAK, T.S. **Claudicação em Equinos Segundo Adams**. 5ed. São Paulo: Roca, 2006, p.1094.
32. SUMMA, P. G.; KINGHAM, P, J.; RAFFOUL, W.; WIBERG, M.; TERENGI, G.; KALBERMATTEN, D. F. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, Amsterdam, v.63, p.1544-1552, 2010.
33. TOGNOLI, G. K.; OLSSON, D. C.; MARTINS, D. B.; SANTOS JÚNIOR, E. B.; SALBEGO, F. Z.; OLIVEIRA, G. K.; BRAGA, F. V. A.; RAISER, A. G.; DEZENGRINI, R.; DA CRUZ, F. S. F.; CASTRO, M. B.; ROSA, M. C.; CARREGARO, A. B.; PIPPI, N. L. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.1, p.148-155, 2009.
34. UEMURA, R.; XU, M.; AHMAD, N.; ASHRAF, M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. **Circulation Research**, Baltimore, v. 98, p. 1414-1421, 2006.
35. WANG, X.; HU, W.; CAO, Y.; YAO, J.; WU, J.; GU, X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. **Brain**, Hoboken, v.128, p.1897-1910, 2005.
36. ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, São Francisco, v.7, n.2, p.211-228, 2001.
37. ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, H.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v.13, n.2, p.4279-4295, 2002

CAPÍTULO 3 - EXPRESSÃO DE NF, S-100, FGF-2 E GDNF NO NERVO ULNAR DE EQUINOS APÓS TUBULIZAÇÃO E TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a regeneração nervosa periférica de equinos por meio da marcação dos anticorpos NF (neurofilamento), S-100, fator de crescimento fibroblástico (FGF-2) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), com a realização de neurotomia e utilização de tubos de silicone com solução salina (grupo controle – GC, n=5), tubos de silicone com implante autólogo de fração de células mononucleares (grupo FCM, n=5) e tubos de silicone com implante autólogo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (grupo ADSC, n=5). A FCM e a ADSC foram obtidas, respectivamente, da medula óssea e tecido adiposo de cada animal. Realizaram-se biopsias dos nervos ulnares com 13 e 26 semanas e avaliação da marcação do nanocristal pela fluorescência e dos anticorpos NF, S-100, FGF-2 e GDNF pela imuno-histoquímica. Evidenciou-se relação inversamente proporcional entre NF e S-100, com maior marcação do NF e direcionamento axonal no grupo ADSC, em relação ao GC, porém não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$). O grupo ADSC obteve os melhores resultados, o que demonstrou superioridade das ADSC em relação à FCM para regeneração nervosa periférica em equinos.

Palavras-chave: biomateriais, células-tronco adultas, fatores de crescimento, nervos periféricos, regeneração nervosa, tubo de silicone.

Expression of NF, S-100, FGF-2 and GDNF in equine ulnar nerve after tubing and deposition of bone marrow and adipose stem cells.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate equine peripheral nerve regeneration through NF (neurofilament), S-100, glial derived neurotrophic factor (GDNF) and fibroblastic growth factor (FGF-2) antibodies labeling, by means of neurotomy using silicone tubes with saline solution (control group – CG, n=5), silicone tubes with autologous mononuclear cell fraction (MCF group, n=5), and silicone tubes with autologous

adipose tissue derived stem cells (ADSC group, n=5). The MCF and ADSC were obtained from bone marrow and adipose tissue from each animal. Nerve biopsies were performed on the 13th and 26th weeks and labeling evaluation of nanocrystals with fluorescence, and NF, S-100, FGF-2 and GDNF antibodies with immunohistochemistry. It was evidenced inverse relationship between NF and S-100, with NF stronger staining and axonal guidance in ADSC group, compared to CG, but not statistically significant ($p>0.05$). The ADSC group presented the best results, which demonstrated ADSC superiority compared to FCM in equine peripheral nerve regeneration.

Keywords: adult stem cells, biomaterials, growth factors, nerve regeneration, peripheral nerve, silicone tube.

INTRODUÇÃO

Células-tronco (CT) são as células com capacidade de autorreplicação, isto é, com capacidade de gerar uma cópia idêntica a si mesma e com potencial de diferenciar-se em vários tecidos, originando pelo menos um tipo de descendente completamente diferenciado. Os tecidos adultos possuem reservatórios de células-tronco adultas (CTA) específicas que contribuem com a manutenção e regeneração tecidual. A medula óssea (MO) é um dos locais de abrigo de diferentes tipos de CTA, como as células-tronco hematopoéticas (CTH) e mesenquimais (CTM) (MEIRELLES et al., 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006), tendo uma população de CTA mais heterogênea, denominada por alguns autores, como fração de células mononucleares da MO (FCM) (COLOMÉ et al., 2008; TOGNOLI et al., 2009).

Além da MO, o tecido adiposo é um local recentemente muito estudado, por ser fonte de grande quantidade de CTM, nomeadas células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC). Essas células já foram amplamente isoladas e caracterizadas (ZUK et al., 2001; BUNNELL et al. 2008; VIOLINI et al., 2009; KANG et al., 2012) e são consideradas como uma fonte atraente de células em medicina regenerativa, a exemplo das terapias celulares e engenharia de tecidos, pois o tecido adiposo está disponível em quantidades superiores que a MO ou o sangue do cordão umbilical (KINGHAN et al., 2007). Com estímulos e condições locais apropriados, as CTA, sejam as FCM ou ADSC, exibem certa plasticidade e possuem

potencialidade de diferenciação em inúmeras linhagens como osteoblastos, adipócitos, condrócitos, cardiomiócitos, tenócitos, e células nervosas (ZUK et al., 2002; MCINTOSH et al., 2006; MEIRELLES et al., 2006; UEMURA et al., 2006; HU et al., 2007; KINGHAM et al., 2007; NIE et al., 2007; NIXON et al., 2008; PERONI et al., 2008). Portanto, além de sua fácil aquisição e expansão em cultura, a sua plasticidade faz com que as CTM sejam uma fonte ideal para a reparação tecidual e engenharia de tecidos, inclusive o tecido nervoso (KEILHOFF & FANSA, 2011).

Tanto as células de Schwann (CSc), como os fatores tróficos são essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento das células nervosas e outros tecidos adjacentes (BARNETT et al., 2002; KANG et al., 2012). Os fatores neurotróficos produzidos em uma lesão nervosa, tem sido exaustivamente investigados com o objetivo de acelerar o processo de regeneração nervosa, tanto por darem suporte a sobrevivência dos axônios como por participarem ativamente em processos de sinalização celular. O fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF-2) são fatores de transformação e crescimento, possuem a capacidade de promover a manutenção e a sobrevivência neural, além de auxiliarem nas funções de várias populações celulares no sistema nervoso periférico (BOYD & GORDON, 2003; MAY et al., 2008; GOULD & ENOMOTO, 2009; MADDURI et al., 2009; GORDON, 2010; SHIM & MING, 2010; GUILLEMOT & ZIMMER, 2011; KANG et al., 2012; MADDURI & GANDER, 2012).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a regeneração do nervo ulnar em equinos, seccionados experimentalmente e submetido à terapia com células-tronco, pela expressão de componentes morfológicos (neurofilamento e células de Schwann) e fatores de crescimento (FGF-2 e GDNF).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Hospital Escola de Grandes Animais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (Hvet-FAV/UnB), Brasília-DF, no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (Instituto de Ciências Biológicas - IC/UnB), Brasília-DF, e no Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), Goiânia-GO. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal

(CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (ICB-UnB), com protocolo UnBDOC nº75944/2088 (Anexo 1).

Utilizaram-se 15 equinos adultos, 13 fêmeas e dois machos, sem raça definida e clinicamente sadios. Os animais foram mantidos em piquetes com alimentação à base de capim Tifton, ração granulada, sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em baias individuais apenas nos dias anterior e posterior ao procedimento cirúrgico.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três grupos, cinco repetições e dois momentos de biopsia. Os animais foram alocados em três grupos, com cinco animais em cada: grupo controle (GC) com utilização de soro fisiológico; grupo FCM com deposição de fração de células mononucleares da medula óssea; e grupo ADSC com deposição de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Ambos, FCM e ADSC, foram implantes autólogos. Em todos os grupos foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico de tubulização com tubo de silicone, utilizando-se os dois membros de cada animal (nervo direito e nervo esquerdo). Com isso, foram estabelecidos dois momentos de biopsia dos nervos ulnares para cada animal: na 13ª semana realizou-se a biopsia no membro direito (GC1, FCM1 e ADSC1) e na 26ª semana, no membro esquerdo do mesmo animal (GC2, FCM2 e ADSC2). O nervo ulnar foi escolhido como material de análise, tanto por ser de fácil acesso cirúrgico, como por ser um nervo apenas sensitivo para esta espécie, não acarretando complicações motoras aos animais.

Colheita e isolamento da fração de células mononucleares (FCM) e cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC)

As amostras de MO e tecido adiposo foram colhidas no Hvet (FAV/UnB) e encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (IC/UnB), para o isolamento da FCM e ADSC.

As colheitas e os isolamentos da FCM foram realizados conforme BARREIRA (2005) e TOGNOLI et al. (2009). Foi coletada a medula óssea (MO) no osso esterno dos cinco equinos pertencentes ao grupo FCM, utilizando-se agulha de punção de MO modelo *Jamshidi* (Ecomed, Rio de Janeiro, Brasil), de calibre oito e 12cm de comprimento. As colheitas e os cultivos dos cinco equinos pertencentes ao grupo ADSC foram realizados conforme BRAVO et al. (2012).

Ao final do procedimento de isolamento da FCM e da ADSC, obteve-se um volume de 210 μL de solução. Uma alíquota de 10 μL da amostra foi retirada para quantificação e teste de viabilidade celular em câmara de *Neubauer*, com o corante Azul de Tripán 1%. Para o mapeamento celular das células injetadas no local do procedimento cirúrgico, as FCM e ADSC foram incubadas com 1 μL de nanocristal (Qtracker®655 Cell Labeling Kit, Invitrogen, California, EUA), homogeneizadas e levadas à estufa a temperatura de 37°C por 45 minutos, para posterior avaliação em microscópio de fluorescência. Após a incubação, as amostras foram mantidas em um microtubo de plástico à temperatura ambiente e encaminhadas imediatamente para a utilização no procedimento cirúrgico.

Dos cinco animais pertencentes ao grupo FCM, obteve-se uma média de 77,3% de viabilidade celular e $3,15 \times 10^6$ células vivas utilizadas para implantação. Dos cinco animais pertencentes ao grupo ADSC, obteve-se uma média de 92,83% de viabilidade celular e $2,15 \times 10^5$ células vivas utilizadas para implantação.

Ao final da quarta passagem celular, uma alíquota do cultivo de ADSC foi encaminhada para o procedimento de diferenciação celular em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica e passagem em citometro de fluxo com os marcadores positivos mesenquimais CD105 e CD90 (mouse anti-human CD105, Invitrogen California, EUA; mouse anti-human CD90, ABD Serotec, Oxford, Reino Unido) e os marcadores negativos CD45 e CD11b (mouse anti-human CD45 e mouse anti-human CD11b, ABD Serotec, Oxford, Reino Unido), para haver a confirmação de que as células cultivadas pertenciam à linhagem de CTM, também conforme BRAVO et al. (2012).

Procedimento cirúrgico

A medicação pré-anestésica incluiu tranquilização dos animais com detomidina (0,02 mg/kg/IV), seguida de éter gliceril guaiacol (110mg/kg/IV) com manutenção em anestesia geral inalatória com isoflurano vaporizado em oxigênio (15mL/kg), em circuito semifechado. Realizou-se, em seguida, o acesso ao nervo ulnar, que incluiu: incisão linear da pele no terço médio do osso rádio em posição caudolateral; divulsão roma do tecido subcutâneo; incisão da fáscia profunda do antebraço; e dessa maneira, a exposição do nervo ulnar e a realização subsequente da neurotomia (Figuras 1A).

Para a realização da técnica de tubulização, foi utilizado um tubo flexível de silicone (Perfitécnica, Salto, Brasil), com comprimento de 2,0 cm e diâmetro interno de 3 mm, previamente esterilizado com formoldeído 38% por 30 minutos e lavado com solução fisiológica para retirada do produto. O coto proximal do nervo ulnar foi introduzido e fixado ao tubo, com ponto único em “U” no epineuro, utilizando fio de náilon 6-0. Em seguida, o coto distal foi inserido e fixado ao tubo da mesma maneira do coto proximal, respeitando-se um espaço de 5 mm entre os cotos (Figuras 1B). No interior do tubo de silicone depositaram-se as soluções respectivas a cada grupo: 200 µl de soro fisiológico no GC, e 200 µl de FCM e ADSC, respectivamente nos grupos FCM e ADSC, com uma seringa de 1 mL (Figuras 1C e 1D). Em seguida, realizou-se a reaproximação do tecido subcutâneo com o fio absorvível Caprofyl (Ethicon, Cornelia, EUA) e, a sutura de pele em pontos separados simples. Todos os procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgicos foram realizados no Hvet (FAV/UnB).

Os animais foram mantidos em baias individuais e receberam antibioticoterapia sistêmica com penicilina benzatina (30.000 UI/kg/IM) em três aplicações, a cada 48 horas, e fenilbutazona (4,4 mg/kg/IV), uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Os curativos foram realizados a cada sete dias, até a remoção da sutura de pele e bandagem com 13 dias de pós-operatório.

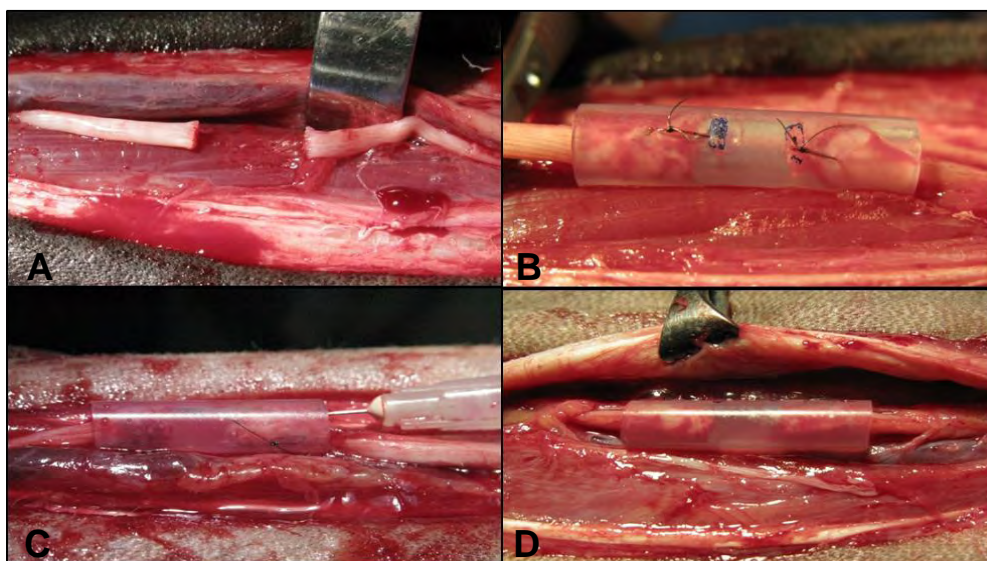


FIGURA 1 - Procedimento de tubulização e aplicação do soro fisiológico, FCM e ADSC em nervos periféricos de equinos. A: neurotomia do nervo ulnar de equino; B: tubo de silicone de 2 cm de comprimento e a fixação dos cotos nervosos no seu interior; C: aplicação de ADSC no interior do tubo de silicone; D: ADSC injetada no tubo de silicone.

Colheita de material e imuno-histoquímica

Nas 13^a e 26^a semanas realizaram-se as biopsias dos nervos ulnares nos três grupos, obtendo-se um total de 30 fragmentos de 4 cm cada, compreendendo 2 cm proximais e 2 cm distais ao local da neurotomia. Para avaliação da marcação com o nanocristal em microscopia de fluorescência, realizou-se um *imprint* em lâminas histológicas dos fragmentos obtidos dos grupos FCM e ADSC, e as lâminas foram armazenadas ao abrigo de luz.

Os fragmentos de nervos foram fixados por 48 horas em formol a 10% tamponado e mantidos em álcool 70% até o processamento histológico. Os fragmentos foram cortados a 5 µm, distendidas sobre lâminas histológicas positivamente carregadas (Green Adhesion Slides Ground, Starfrost, Sakura, Alphen aan den Rijn, Holanda) e submetidos ao procedimento de imuno-histoquímica.

Utilizaram-se os anticorpos NF (Monoclonal Mouse Anti-Human Neurofilament Protein, Clone 2F11 - M 0762, Dako Cytomation, Carpinteria, EUA), S-100 (Polyclonal Rabbit Anti-S100 - Z0311, Dako Cytomation, Carpinteria, EUA), FGF-2 (Polyclonal Rabbit Anti-FGF-2 [147]: sc-79, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA) e GDNF (Monoclonal Mouse Anti-GDNF [B-8]: sc-13147, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA). Apenas as lâminas do anticorpo S-100 foram incubadas por dez minutos em solução de sódio dodecil sulfato a 1% (SDS). Realizou-se o bloqueio da atividade da peroxidase e proteínas endógenas por 20 minutos (Kit Dual Block – S2003, Dako Cytomation, Carpinteria, EUA) e a recuperação antigênica (RA) em solução de citrato (pH 6,0) em banho maria a 95°C por 20 minutos, para o anticorpo NF e em panela de pressão elétrica a 121°C por 3 minutos para os demais anticorpos. Incubaram-se as lâminas por uma hora à temperatura ambiente com 3% de albumina de soro bovino (BSA), seguida de leite desnatado a 10% por uma hora para os anticorpos S-100, FGF-2 e GDNF e leite desnatado 3% por 40 minutos para o anticorpo NF. Os tecidos foram incubados em câmara úmida, por 18 horas a 4°C com anti-NF (1:200) e GDNF (1:10) e em temperatura ambiente por uma hora com anti-FGF-2 (1:200) e 30 minutos anti-S-100 (1:500), e incubados à temperatura ambiente no anticorpo secundário, com 15 minutos em cada reação do Kit Polyvue Mouse/Rabbit (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, EUA). A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina peroxidase (STABLE DAB/PLUS, Diagnostic Biosystems,

Pleasanton, EUA) por 30 segundos no anticorpo S-100 e um minuto e meio nos demais anticorpos. Para fins de análise em densidade óptica, não foi feita a contra coloração com HE.

Todos os anticorpos foram analisados quantitativamente por mensuração da marcação citoplasmática com software analisador de imagens. Foram obtidas imagens dos fragmentos corados por DAB-peroxidase, com câmera digital acoplada ao microscópio óptico (Leica™ DFC 290, Weztlar, Alemanha), com a objetiva de 5X e as marcações analisadas por densidade óptica utilizando o software semi-automático Image Processing and Analysis in Java, versão 1.44 (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, EUA) conforme MIOT & BRIANEZI (2010) e representado na figura 2. Foram obtidas imagens de todo o fragmento, e as porções de coto proximal (CP), cabo de regeneração (CR) e coto distal (CD) foram analisadas separadamente em cada animal de todos os grupos, estabelecendo-se uma média dos valores relativos às imagens obtidas em cada porção. Foram estabelecidas comparações entre as porções em cada nervo, assim como entre os animais, entre os grupos e entre os momentos de biopsia.

Após visualização da existência de normalidade entre as variáveis com o teste de aderência Kolmogorov-Smirnov, evidenciaram-se amostras paramétricas nos anticorpos NF e S-100 e não-paramétricas nos anticorpos FGF-2 e GDNF. Portanto, para as análises de NF e S-100 foram aplicados: Teste de Tukey para comparação entre os grupos, Análise de variância para comparação entre os períodos de biopsia, e Análise de variância e teste t-Student para comparação entre as porções de CP, CR e CD. Para as análises de FGF e GDNF foram aplicados teste de Kruskal-wallis para comparação entre os grupos e entre as porções de CP, CR e CD, teste de Wilcoxon para comparação entre os períodos de biopsia e Correlação de Spearman para comparação entre os anticorpos FGF-2, GDNF e S-100. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo com o software IBM SPSS Statistic versão 15.

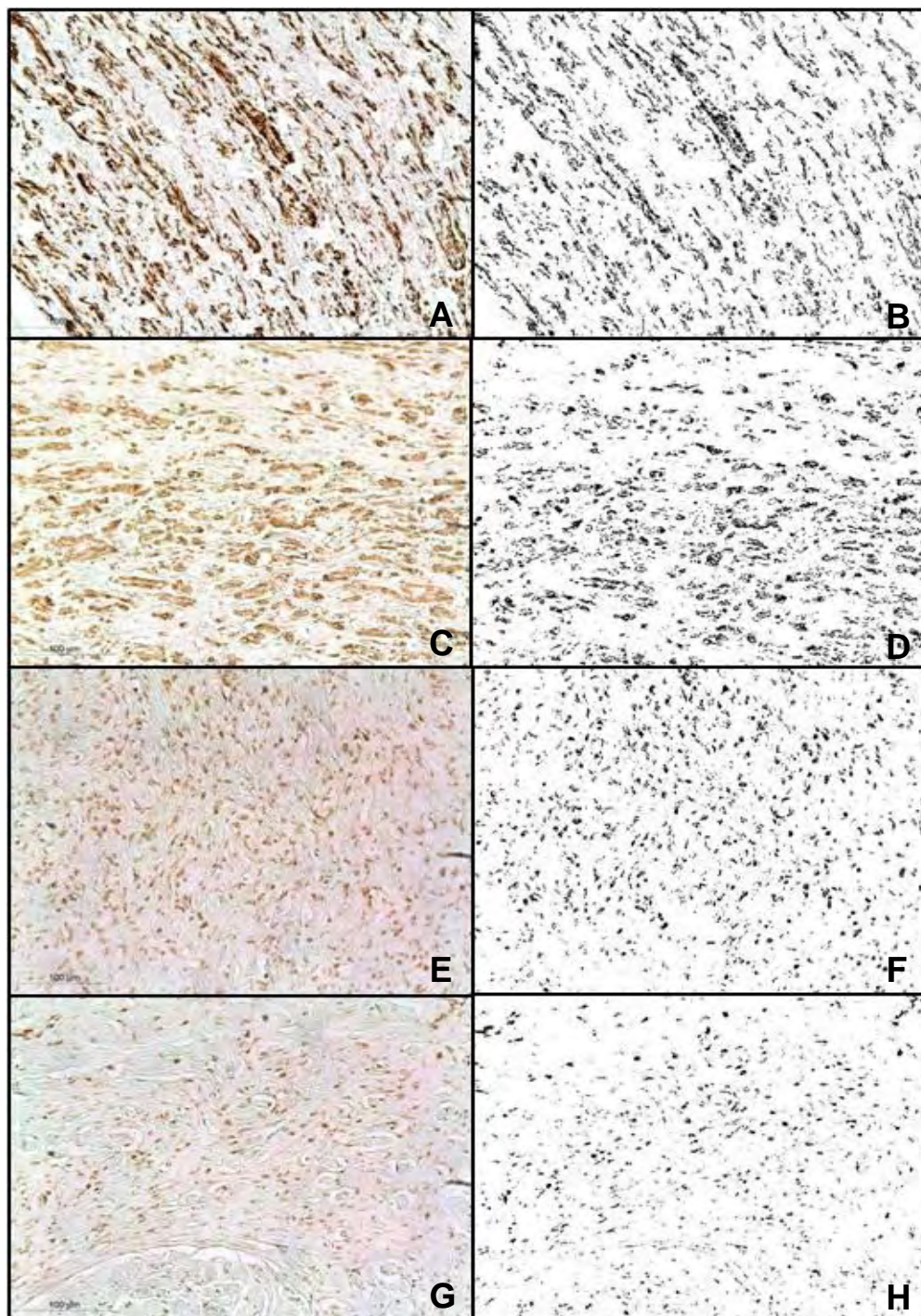


FIGURA 2 - Imunomarcção dos anticorpos NF, S-100, GDNF e FGF-2 em nervos ulnares de equinos do grupo FCM1 nas transições de coto proximal para cabo de regeneração, com a coloração em marron pela diaminobenzidinaperoxidase e suas imagens correspondentes em preto e branco convertidas pelo software Image J, para análise por densidade óptica em pixels. A e B: NF; C e D: S-100; E e F: GDNF; G e H: FGF-2. Imuno-histoquímica, 20X.

RESULTADOS

Houve completa formação do cabo de regeneração (CR), unindo assim o coto proximal (CP) ao coto distal (CD) em todas as amostras analisadas.

Apenas no grupo FCM1 foi observada marcação do nanocristal em vermelho fluorescente, de forma discreta a moderada, em microscopia de fluorescência.

Foi confirmada a diferenciação celular das ADSC nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica coradas pelo *Alizarin red*, *Alcian Blue* e *Oil Red*, respectivamente. Também houve confirmação com a marcação positiva dos anticorpos mesenquimais CD105 e CD90 com médias de 96,48% e 94,94% respectivamente, e marcação negativa dos anticorpos hematopoiéticos CD45 e CD11b com médias de 0,59% e 0,76% respectivamente.

Imuno-histoquímica

Com relação à marcação do anticorpo NF, pôde-se observar maior média de marcação no grupo ADSC, seguida pelo GC e FCM. Na marcação do anticorpo S-100, o padrão decrescente das médias foi oposto ao observado no NF, com menores médias de marcação no grupo ADSC, seguida pelo GC e FCM (Tabela 1). Portanto, nota-se uma relação de marcação inversamente proporcional entre os anticorpos NF e S-100. Porém, não foi observada diferença significativa quando comparada a marcação dos anticorpos entre os grupos (Figura 3).

Foi verificada diferença significativa, apenas em relação ao anticorpo S-100 entre os grupos FCM e ADSC, os quais não diferenciaram significativamente do GC como pode ser visualizado na tabela 1 e figura 3.

Apesar de ter ocorrido uma predominância do S-100 em relação ao NF, na maioria das amostras, não houve diferença significativa entre as porções (CP, CR e CD) e os momentos de biopsia (13ª e 26ª semana). Com relação à intensidade de marcação dos anticorpos NF e S-100 nas diferentes porções CP, CR e CD, houve predominância de valores do CR comparando-se aos do CP e CD em ambas as análises. Porém, o CD demonstrou-se inferior ao CR e superior ao CP, evidenciando maior concentração de marcação dos anticorpos no CR (Tabela 1).

TABELA 1 - Intensidades de marcação dos anticorpos NF e S-100 dos grupos experimentais e porções de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular. Valores referentes à média e desvio padrão.

	NF				S-100			
	CP	CR	CD	Média	CP	CR	CD	Média
GC1	18,118 ±19,057	30,100 ±13,495	22,945 ±19,514	23,777 ±16,839	19,834 ±14,527	25,910 ±10,188	24,256 ±11,890	23,333 ±11,721
GC2	16,637 ±9,412	23,214 ±8,134	13,040 ±6,130	17,958 ±8,661	29,487 ±6,398	32,984 ±3,3803	27,841 ±9,238	30,557 ±20,218
GC	20,867 ±13,469				26,223^a ±15,700			
FCM1	20,301 ±10,967	15,239 ±14,195	12,608 ±11,759	16,601 ±11,837	25,099 ±9,183	36,014 ±23,656	34,736 ±12,648	31,521 ±16,416
FCM2	17,005 ±8,367	19,632 ±8,628	31,607 ±35,505	22,115 ±19,377	18,283 ±7,984	24,795 ±8,126	28,108 ±7,21	23,416 ±10,872
FCM	19,689 ±16,418				27,318^{ab} ±14160			
ADSC1	30,633 ±5,151	34,037 ±13,509	13,616 ±10,929	26,706 ±13,490	12,940 ±7,705	28,275 ±19,357	18,033 ±6,554	19,749 ±13,412
ADSC2	17,874 ±7,310	26,645 ±8,148	32,463 ±17,742	25,175 ±12,132	13,728 ±8,388	14,122 ±12,894	15,206 ±6,924	14,352 ±10,438
ADSC	25,912 ±12577				17,050^{ac} ±12,123			

CP: coto proximal; CR: cabo de regeneração; CD: coto distal

Teste: Análise de Variância ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam a existência de diferença significativa entre grupos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

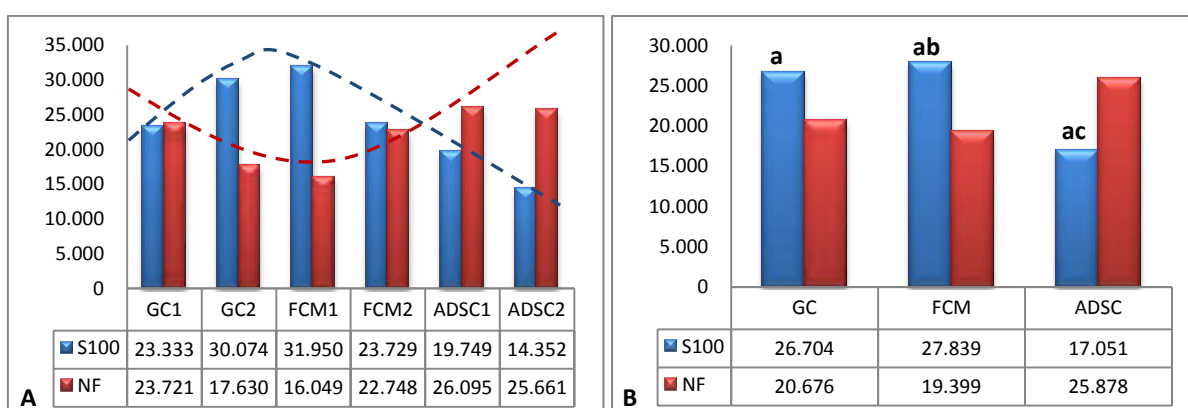


FIGURA 3 - Padrão de marcação dos anticorpos NF e S-100 de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular. A: médias de marcações de todos os grupos, com demonstração, em linha, da marcação inversamente proporcional entre os dois anticorpos. B: médias de marcações dos três grupos. Letras minúsculas diferentes indicam a existência de diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação à marcação dos anticorpos FGF-2 e GDNF, ambos apresentaram médias inferiores àquelas de NF e S-100 em todos os grupos. Tanto para FGF-2, como GDNF, o GC apresentou as maiores médias de marcação, seguidas pelo grupo FCM e, por último, o grupo ADSC com valores consideravelmente menores (Figura 4 e Tabela 2). Na comparação entre os três grupos, os GC e FCM diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) do grupo ADSC, porém apenas para o anticorpo GDNF, sem significância nas comparações do anticorpo FGF-2 (Figura 4 e Tabela 2).

No entanto, com relação aos momentos de biopsia, verificou-se significância ($p < 0,05$) entre os momentos de 13^a e 26^a semanas apenas para o anticorpo FGF-2 no grupo FCM (Figura 4 e Tabela 2).

Foi observada correlação positiva entre os anticorpos FGF-2 e GDNF apenas no grupo FCM ($p < 0,05$, $r = 0,4335$) e no momento de biopsia de 13 semanas ($p < 0,05$, $r = 0,3633$). Entretanto, quando se analisou a correlação entre os anticorpos S-100 e GDNF, verificou-se correlação positiva ($p < 0,05$) nos três grupos (GC, $r = 0,63$; FCM, $r = 0,39$; e ADSC, $r = 0,4512$) e nos tempos de biopsia (13 e 26 semanas).

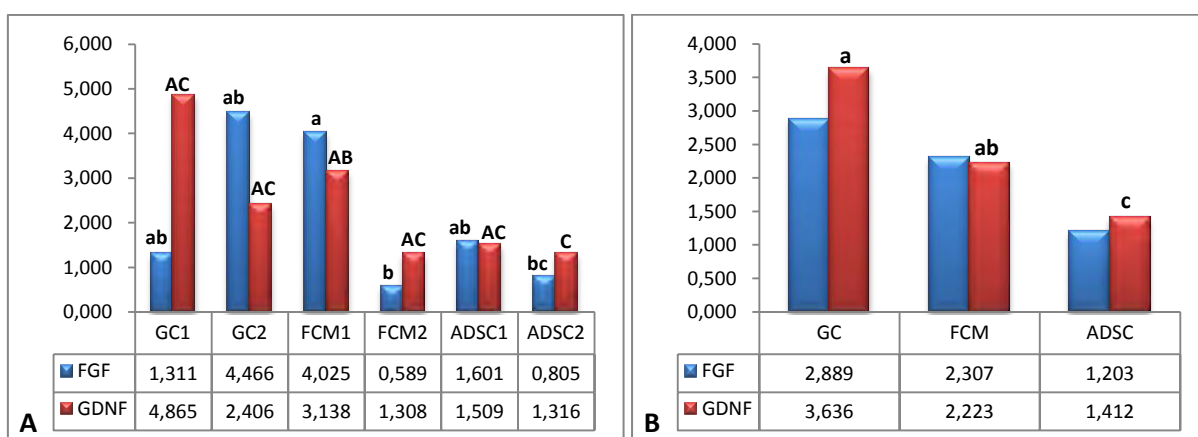


FIGURA 4 - Padrão de marcação dos anticorpos FGF-2 e GDNF de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular. A: médias de marcações de todos os grupos. B: médias de marcações dos três grupos. Letras maiúsculas ou minúsculas diferentes indicam a existência de diferença significativa entre grupos (da mesma variável) pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

TABELA 2: Intensidades de marcação dos anticorpos FGF-2 e GDNF dos grupos experimentais e porções de nervos periféricos de equinos, submetidos à técnica de tubulização e terapia celular. Valores referentes à média e desvio padrão.

	FGF-2				GDNF			
	CP	CR	CD	Média	CP	CR	CD	Média
GC1	0,336 ±0,237	1,745 ±1,208	1,852 ±2,799	1,311^{ab} ±0,846	1,129 ±0,639	2,495 ±2,319	10,971 ±20,87	4,865^{ac} ±5,332
GC2	4,057 ±6,556	5,285 ±9,917	4,057 ±6,687	4,466^{ab} ±0,709	2,057 ±1,828	1,408 ±1,703	3,753 ±5,214	2,406^{ac} ±1,211
GC				2,889 ±2,231				3,636^A ±1,739
FCM1	2,057 ±1,302	4,618 ±3,567	5,402 ±7,001	4,025^a ±1,749	2,937 ±1,912	2,888 ±2,599	3,589 ±3,20	3,138^{ab} ±0,391
FCM2	0,496 ±0,492	0,761 ±1,027	0,512 ±0,266	0,589^b ±0,148	1,297 ±0,483	1,141 ±1,06	1,487 ±2,279	1,308^{ac} ±0,173
FCM				2,307 ±2,430				2,223^{AB} ±1,294
ADSC1	1,037 ±1,535	2,564 ±3,088	1,203 ±3,406	1,601^{ab} ±0,837	0,675 ±0,583	1,613 ±2,364	2,241 ±4,118	1,509^{ac} ±0,788
ADSC2	0,739 ±0,551	0,713 ±0,482	0,963 ±1,027	0,805^{bc} ±0,137	0,252 ±0,169	1,613 ±2,364	2,083 ±1,703	1,316^c ±0,950
ADSC				1,203 ±0,563				1,413^C ±0,136

CP: coto proximal; CR: cabo de regeneração; CD: coto distal

Letras diferentes na mesma coluna indicam a diferença significativa entre grupos (maiúsculas) e momentos de biopsia (minúsculas) pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo utilizou-se o silicone, um polímero misto, como invólucro, que é largamente empregado em pesquisas de reparação nervosa periférica. De acordo com STANG et al. (2009) e MADDURI & GANDER (2012), os biomateriais desempenham um papel central no desenvolvimento de condutos ou invólucros nervosos, os quais influenciam significativamente na adesão, proliferação e migração celular. Com isso, KEILHOFF & FANSA (2011) e MADDURI & GANDER (2012) sugerem, não apenas o invólucro como guia e proteção, mas também a

utilização de terapias complementares como células ou fatores de crescimento e de informação topográfica como orientadores nano ou microestruturas. Adicionalmente à técnica de tubulização, neste experimento, valeu-se da terapia com CTM provenientes de dois locais, um da MO e o outro do tecido adiposo, ambas submetidas ao marcador nanocristal, com intuito de obter melhor visualização dos resultados da regeneração nervosa periférica.

Com relação à regeneração nervosa, observou-se relação inversamente proporcional dos anticorpos S-100 e NF, o que confirma uma maior atuação das CSc anteriormente a um crescimento axonal. O mesmo pode ser extrapolado à possibilidade de aceleração deste processo aos grupos que receberam células (FCM e ADSC), já que se verificou maior marcação do anticorpo S-100 no GC e menor no FCM e ADSC respectivamente, contrapondo ao observado para o anticorpo NF. Assim, presume-se que, enquanto o GC ainda estava na fase de proliferação de CSc e início de formação das bandas de Bungner e dos cones neurais, os grupos experimentais, já haviam passado por esta fase, já apresentando maior formação dos cones axonais e consequente expressão de NF em direção distal. Em ambos os anticorpos e em todos os grupos, houve predominância de marcação no CR em direção ao CD, reafirmando o processo de proliferação e crescimento celular em direção à porção distal do nervo. No entanto, apesar dessa diferença nas marcações entre os grupos experimentais e controle, as mesmas não foram significativas ($p > 0,05$), quando se comparou os dois anticorpos entre os grupos e as porções, mostrando que apesar de presentes, as alterações foram sutis. Apenas com relação ao anticorpo S-100 verificou-se diferença significativa entre os grupos FCM e ADSC, reafirmando a aceleração no processo de regeneração no grupo ADSC.

Neste estudo, foram implantadas duas concentrações celulares diferentes, de $2,15 \times 10^6$ células no grupo FCM e $3,15 \times 10^5$ no ADSC, o que está dentro dos valores citados por AQUINO et al. (2006) e HU et al. (2007), que sugerem quantidades entre 4×10^3 a 2×10^7 células por implantação. Nesse sentido, a menor quantidade de células injetadas no grupo ADSC, em relação ao FCM, não influenciou negativamente no processo de regeneração. Ao contrário, pôde-se observar melhor qualidade no resultado da regeneração nervosa no grupo ADSC, mesmo com valores inferiores, sugerindo a superioridade dessas células frente a um processo regenerativo nervoso. Com isso, apesar da ausência de diferenças

significativas entre o GC e grupos experimentais, houve, principalmente do grupo ADSC, melhor evidência do direcionamento axonal pela marcação com o anticorpo NF na direção de CR para CD.

Com relação aos fatores de crescimento produzidos pelas CSc, pôde-se visualizar correlação positiva da marcação de S-100 com o fator de crescimento GDNF ($p < 0,05$), demonstrando relação diretamente proporcional dos dois componentes. Nos grupos que apresentaram maior marcação de S-100 também foi encontrada maior marcação de GDNF, sendo que o GC apresentou o maior índice e o grupo ADSC o menor. Esses dados comprovam o fato do grupo ADSC ter apresentado os maiores valores de NF, possivelmente por estar em uma fase mais adiantada do processo de regeneração nervosa. De forma semelhante, o fator FGF-2 manteve a mesma orientação de marcação do fator GDNF, demonstrando relação de atuação entre os dois fatores, conforme relatado por BARNETT et al. (2002) e GUILLEMOT & ZIMMER (2011).

KANG et al. (2012) estabeleceram cultivo e diferenciação de ADSC em matriz contendo FGF-2 e demonstraram maior adesão e diferenciação das ADSC. Os autores concluíram que os mecanismos de adesão celular mediados pela interação entre heparina, FGF e integrinas influenciam diretamente na diferenciação de células-tronco, o que pode ser utilizado posteriormente para avaliação ou controle do destino dessas células em terapias celulares com o uso de biomateriais. Isso corrobora, em parte, os resultados deste trabalho, no qual observou-se maior índice de NF no grupo ADSC, o que sugere maior interação prévia das ADSC com o FGF e GDNF, o que pode ter favorecido os mecanismos de atuação das CTM.

Ainda, segundo SULAIMAN & GORDON, (2000) e WALSH et al. (2012), ao longo do tempo de denervação, as CSc tornam-se refratárias à neurotrofinas e neuregulinas, diminui sua ação nos receptores necessários, e acaba por falhar na sua capacidade para interagir com axônios e outras células não-neuronais. Com isso, a utilização apenas do cultivo de ADSC, como realizado no grupo ADSC, torna-se uma opção interessante do ponto de vista da aceleração dos processos de interação celulares, pois sendo uma população maior e mais homogênea de CTM, ocorre otimização quanto à atuação celular no local e à possibilidade de diferenciação celular. Isso pôde ser observado neste trabalho, pelos menores índices de S-100 e dos fatores de crescimento nos grupos experimentais, em contraste a maior quantidade de NF, inferindo redução da necessidade de atuação

dos fatores de crescimento com as CSc por já haver formação dos cones axonais. Uma alternativa para debelar a queda na produção dos fatores de crescimento pelas CSc, seria a aplicação exógena de fatores de crescimento em lesões crônicas de nervos periféricos, como sugerido por MAY et al. (2008), MADDURI et al. (2009), GORDON (2010) e MADDURI et al. (2010).

A utilização de FCM e ADSC se mostrou satisfatória, visto que os grupos experimentais obtiveram melhores resultados em relação ao grupo controle, quanto à maior marcação do anticorpo NF e direcionamento axonal do cabo de regeneração para o cabo distal, demonstrando uma melhor regeneração axonal nesses dois grupos, mas particularmente no grupo ADSC, enfatizando a superioridade de tais células nas condições do estudo. Porém, sugere-se que há a necessidade de um tempo maior para ocorrer completa regeneração do tecido nervoso periférico após lesão.

Portanto, a utilização de terapias auxiliares para melhorar a regeneração nervosa periférica, seja com células-tronco, fatores de crescimento ou biomateriais como enxertos, deve ser cuidadosamente avaliada e mensurada, para que se chegue a um consenso final de qual a melhor forma de utilização de cada uma delas, como afirmado por PAN et al. (2006) e KEILHOFF & FANSA (2011).

CONCLUSÃO

A terapia celular com FCM e ADSC, especialmente com ADSC, favorece a regeneração axonal do nervo ulnar de equinos, por otimizar a síntese de neurofilamentos e direcionamento do cabo de regeneração ao coto distal.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Edital N^o 17/2008) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF – Edital N.º 05/2008) pelo apoio financeiro cedido ao projeto. Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (EVZ/UFG) pela concessão da bolsa de auxílio à pesquisa (CNPq). À prof. Dra. Carolina Madeira Lucci (Instituto de Ciências

Biológicas /UnB) pelo apoio e espaço concedido à execução do cultivo celular. À Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Distrito Federal (SEAPA-DF) pela cessão dos animais utilizados no projeto. À Universidade de Brasília (UnB), em especial ao Hospital Veterinário de Grandes Animais por permitir a utilização das instalações para realização das coletas de medula óssea, tecido adiposo, procedimentos cirúrgicos e internação dos animais.

REFERÊNCIAS

1. AQUINO, J. B.; HJERLING-LEFFLER, J.; KOLTZENBURG, M.; EDLUND, T.; VILLAR, M. J.; ERNFORS, P. In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. **Experimental Neurology**, Nova Iorque, v. 198, n. 2, p. 438–449, 2006.
2. BARNETT, M. W.; FISHER, C. E.; PERONA-WRIGHT, G.; DAVIES, J. A. Signalling by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) requires heparan sulphate glycosaminoglycan. **Journal of Cell Science**, Londres, v. 115, n. 23, p. 4495-4503, 2002.
3. BARREIRA, A. P. B. **Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultrassonográfica e imuno-histoquímica**. 2005. 98f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
4. BOYD, J. G.; GORDON, T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. **Molecular Neurobiology**, Clifton, v. 27, n. 3, p. 277–324, 2003.
5. BRAVO, M. O.; MORAES, J. M.; DUMMONT, C. B. S.; FILGUEIRAS, R. R.; HASHIMOTO, H. H.; GODOY, R. F. Isolamento, expansão e caracterização de

- células-tronco do tecido adiposo de equinos. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.28, n.2, 66-74, 2012
6. BUNNELL, B. A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. **Methods**, São Diego, v. 45, p. 115-120, 2008.
 7. COLOMÉ, L. M.; GOMES, C. G.; CROSIGNANI, N.; PAZ, A. H.; LUGO, A. A.; GUIMARÃES, K. M.; FOERSTROW, L. P.; TESSARI, J. P.; COLOMÉ, L. M.; GRAÇA, D. L.; MEURER, L.; PASSOS, E. P.; PIPPI, N. L.; CONTESINI, E. A.; LIMA, E. O. C. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2529-2534, 2008.
 8. GORDON, T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. **Journal of Communication Disorder**, Nova Iorque, v. 43, p. 265-273, 2010.
 9. GOULD, T. W.; ENOMOTO, H. Neurotrophic modulation of motor neuron development. **The Neuroscientist**, Baltimore, v. 15, n. 1, p. 105-116, 2009.
 10. GUILLEMOT, F.; ZIMMER, C. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. **Neuron**, Cambridge, v. 71, p. 574-588, 2011.
 11. HU, J.; ZHU, Q. T.; LIU, X. L.; XU, Y. B.; ZHU, J. K. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. **Experimental Neurology**, Nova Iorque, v. 204, p. 658-666, 2007.
 12. KANG, J. M.; HAN, M.; JUNG, Y.; KIM, S. H.; KIM, S. H. Adhesion and differentiation of adipose-derived stem cells on a substrate with immobilized fibroblast growth factor. **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 8, n. 5 p. 1759-67, 2012.

13. KEILHOFF, G.; FANSA, H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. A real hope or just an empty promise? **Experimental Neurology**, Nova lorque, v. 232, p. 110-113, 2011.
14. KINGHAM, P.J.; KALBERMATTEN, D.F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S.J.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, Nova lorque, v. 207, n. 2, p. 267–274, 2007.
15. MADDURI, S.; PAPALOÏZOS, M.; GANDER, B. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. **Neuroscience Research**, Limerick, v. 65, p. 88-97, 2009.
16. MADDURI, S.; FELDMAN, K.; TERVOORT, T.; PAPALOÏZOS, M.; GANDER, B. Collagen nerve conduits releasing the neurotrophic factors GDNF and NGF. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 143, p. 168-174, 2010.
17. MADDURI, S.; GANDER, B. Growth factor delivery systems and repair strategies for damaged peripheral nerves. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 274-282, 2012.
18. MAY, F.; MATIASEK, K.; VROEMEN, M.; CASPERS, C.; MRVA, T.; ARNDT, C.; SCHLENKER, B.; GAIS, P.; BRILL, T.; BUCHNER, A.; BLESCH, A.; HARTUNG, R.; STIEF, C.; GANSBACHER, B.; WEIDNER, N. GDNF-Transduced Schwann cell grafts enhance regeneration of erectile nerves. **European urology**, Nova lorque, v. 54, p. 1179-1187, 2008.
19. MCINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; MITCHELL, J. B.; FLOYDE, Z. E.; HAMMILL, L.; KLOSTER, A.; DI HALVORSEN, Y.; TING, J. P.; STORMS, R. W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J. M. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. **Stem Cells – Tissue Specific Stem Cells**, Nova lorque, v. 24, n. 6, p. 1246-1253, 2006.

20. MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.
21. MIOT, H. A.; BRIANEZI, G. Análise morfométrica do colágeno dérmico a partir da segmentação por conglomerados (clusters) de cor. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 3, p. 361-364, 2010.
22. NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlim, v. 174, p. 249–282, 2006.
23. NIE, X.; ZHANG, Y.-J.; TIAN, W.-D.; JIANG, M.; DONG, R.; CHEN, J.-W.; JIN, Y. Improvement of peripheral nerve regeneration by a tissue–engineered nerve filled with ectomesenchymal stem cells. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 36, n. 1, p. 32–38, 2007.
24. NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J.L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 69, p. 928–937, 2008.
25. PAN, H. C.; YANG, D. Y.; CHIU, Y. T.; LAI, S. Z.; WANG, Y. C.; CHANG, M. H.; CHENG, F. C. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. **Journal of Clinical Neuroscience**, Melbourne, v. 13, p. 570-575, 2006.
26. PERONI, D.; SCAMBI, I.; PASINI, A.; LISI, V.; BIFARI, F.; KRAMPERA, M.; RIGOTTI, G.; SBARBATI, A.; GALIE, M. Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. **Experimental Cell Research**, Nova Iorque, v. 314, n. 2, p. 603-615, 2008.

27. SHIM, S.; MING, G. Roles of channels and receptors in the growth cone during PNS axonal regeneration. **Experimental Neurology**, Nova Iorque, v. 223, p. 38-44, 2010.
28. STANG, F.; KEILHOFF, G.; FANSA, H. Biocompatibility of different nerve tubes. **Materials**, Basel, v. 2, p. 1480-1507, 2009.
29. SULAIMAN, A. R. O.; GORDON, T. Effects of short-and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. **Glia**, Nova Iorque, v. 32, p. 234–246, 2000.
30. TOGNOLI, G. K.; OLSSON, D. C.; MARTINS, D. B.; SANTOS JÚNIOR, E. B.; SALBEGO, F. Z.; OLIVEIRA, G. K.; BRAGA, F. V. A.; RAISER, A. G.; DEZENGRINI, R.; DA CRUZ, F. S. F.; CASTRO, M. B.; ROSA, M. C.; CARREGARO, A. B.; PIPPI, N. L. Transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea em úlcera de córnea experimental em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 148-155, 2009.
31. UEMURA, R.; XU, M.; AHMAD, N.; ASHRAF, M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. **Circulation Research**, Baltimore, v. 98, p. 1414-1421, 2006.
32. VIOLINI, S.; RAMELLI, P.; PISANI, L. F.; GORNI, C.; MARIANI, P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by *in vitro* exposure to BMP-12. **BMC Cell Biology**, Londres, v. 10, n. 29, p. 1-10, 2009.
33. WALSH, S. K.; KUMAR, R.; GROCHMAL, J. K.; KEMP, S. W. P.; FORDEN, J.; MIDHA, R. Fate of stem cell transplants in peripheral nerves. **Stem Cell Research**, Kidlington, v. 8, p. 226-238, 2012.
34. ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human

adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, São Francisco, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

35. ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, H.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 13, n. 2, p. 4279–4295, 2002

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A regeneração nervosa, tanto central como periférica, é alvo de intensas pesquisas, por ser de ocorrência extremamente frequente e normalmente aliada a grandes perdas funcionais nos pacientes afetados. Devido à sua alta complexidade e conseqüentemente grande probabilidade de insucesso, a regeneração de nervos periféricos está sendo cada vez mais estudada e elucidada com a utilização de técnicas de genética e biologia molecular. Estudos recentes vêm demonstrando que inúmeras moléculas e células, como os fatores e crescimento, células de Schwann (CSc) e fibroblastos, são o suporte essencial para uma regeneração nervosa bem sucedida, tanto para regenerar os axônios corretamente, como para restabelecer as conexões com seus tecidos alvos.

Com isso, três conceitos principais foram estabelecidos e são frequentemente estudados na engenharia de tecidos para regeneração nervosa periférica: 1. bainhas nervosas combinadas com fatores de crescimento; 2. bainhas nervosas adicionadas com CSc cultivadas; e 3. bainhas nervosas adicionadas com diferentes tipos de células-tronco. Atualmente, as células-tronco adultas (CTA) estão no auge das pesquisas de engenharia de tecidos e medicina regenerativa por possuírem propriedades desejáveis de diferenciação, autorrenovação e mecanismos celulares parácrinos de interação local.

Frente a esses conceitos já consagrados na literatura, a realização deste trabalho considerou a possibilidade de que as CTA, quando injetadas no local da lesão nervosa, pudessem melhorar o processo de regeneração tecidual, devido às suas características mencionadas acima. Assim, diante de tal perspectiva, considerou-se a utilização das CTA obtidas tanto da medula óssea (MO), a fração de células mononucleares (FCM), como do tecido adiposo, para uma avaliação dos efeitos destas células na regeneração nervosa periférica de equinos. Além disso, averiguar também qual dos dois tipos celulares atuariam melhor nesse processo regenerativo, já que são duas fontes potenciais de obtenção de CTA em humanos e animais domésticos.

Com a utilização das CTA, foi possível observar tanto diminuição dos processos celulares degenerativos, como uma melhora estrutural dos nervos ulnares, com maior reorganização tecidual e direcionamento axonal para o coto

distal de maneira mais evidente. Aliado a isso, o fato de se ter observado maior marcação do S-100 e fatores de crescimento no grupo controle, reitera essa possibilidade de aceleração no processo regenerativo com o uso das CTA, uma vez que, a maior autação das CSc é precedente ao crescimento do cone axonal em direção distal.

Comparando-se os dois tipos celulares utilizados, as ADSC promoveram resultados superiores aos da FCM, o que possivelmente pode estar correlacionado a uma maior potencialidade de proliferação deste tipo celular, aumentando assim, a população celular local que atuaria no processo regenerativo. Isso pode ser confirmado pela marcação realizada com o nanocristal, em que a ausência de marcação nas ADSC sugeriu a ocorrência exacerbada de proliferação celular, já que é uma população mais homogênea de CTM em relação à FCM, tendo assim, maior capacidade de autorrenovação.

Desta maneira, as CTA, mas principalmente as ADSCs, demonstraram boas expectativas quanto à possibilidade de emprego na regeneração tecidual, como uma alternativa promissora para futura aplicação clínica na medicina regenerativa e engenharia de tecidos. As visíveis vantagens da utilização das CTA estão, no momento, direcionando a comunidade científica a investigar de que maneira e em quais os fenótipos celulares essas células podem se diferenciar *in vitro* e *in vivo* e quais os subsídios fornecidos para a recuperação dos nervos periféricos lesionados.

Para a realização de tal estudo na espécie equina, foi selecionado o nervo ulnar como material de análise, tanto por ser de fácil acesso cirúrgico, como por ser um nervo apenas sensitivo para esta espécie, não acarretando complicações motoras aos animais. Além disso, inerva uma região que é amparada por outros nervos importantes, como radial e mediano, que suprem a ausência do nervo ulnar mediante uma lesão. Assim, foi possível realizar todo o procedimento experimental, sem ocasionar problemas locomotores e sensitivos aos animais, que foram todos destinados à adoção após o término do projeto.

ANEXOS

ANEXO1



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 01 de outubro de 2008.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"CÉLULAS-TRONCO NA REGENERAÇÃO DO NERVO ULNAR DE EQUÍNOS"**, UnBDOC nº 75944/2008, sob responsabilidade do Prof. Luiz Augusto Batista Brito, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA

ANEXOS 2

Quadro 1: Análise qualitativa e estatística pelo teste Qui-Quadrado das variáveis histológicas avaliadas pela coloração de HE nos grupos controle e experimentais.

Variável	Escores	Controle (N=10)		FCM (N=9)		ADSC (N=10)		p
		n	%	n	%	n	%	
Hemorragia	Ausente	4	40,0	7	77,8	2	20,0	0,019
	Discreto	6	60,0	–	0,00	7	70,0	
	Moderado	–	0,0	2	22,2	1	10,0	
Hiperemia	Ausente	1	10,0	3	33,3	5	50,0	0,297
	Discreto	7	70,0	5	55,6	5	50,0	
	Moderado	2	20,0	1	11,1	–	0,0	
Degeneração Walleriana	Ausente	–	0,0	1	10,0	–	0,0	0,007
	Discreto	–	0,0	4	40,0	8	80,0	
	Moderado	4	40,0	3	30,0	2	20,0	
	Acentuado	6	60,0	2	20,0	–	0,0	
Reorganização fascicular	Ausente	1	10,0	1	11,1	1	11,1	0,785
	Discreto	5	50,0	5	55,6	3	33,3	
	Moderado	2	20,0	3	33,3	4	44,4	
	Acentuado	2	20,0	–	0,0	1	11,1	
Infiltrado inflamatório								
Linfoplasmocitário	Ausente	1	10,0	2	20,0	5	50,0	0,093
	Discreto	7	70,0	8	80,0	5	50,0	
	Moderado	2	20,0	–	0,0	–	0,0	
Neutrófilico	Ausente	9	90,0	10	100,0	10	100,0	0,355
	Discreto	1	10,0	–	0,0	–	0,0	
Eosinófilico	Ausente	7	70,0	7	70,0	2	20,0	0,042
	Discreto	2	20,0	3	30,0	8	80,0	
	Moderado	1	10,0	–	0,0	–	0,0	
Linfocitário	Ausente	10	100,0	10	100,0	6	60,0	0,010
	Discreto	–	0,0	–	0,0	4	40,0	

Quadro 2: Análise qualitativa e estatística pelo teste Qui-Quadrado das variáveis histológicas avaliadas pela coloração de HE nos tempos de biopsia (13ª e 26ª semana).

Variável	Escores	13ª semana (N=15)		26ª semana (N=14)		p
		n	%	n	%	
Hemorragia	Ausente	9	60,0	4	28,6	0,083
	Discreto	6	40,0	7	50,0	
	Moderado	–	0,0	3	21,4	
Hiperemia	Ausente	5	33,3	4	28,6	0,791
	Discreto	8	53,3	9	64,3	
	Moderado	2	13,3	1	7,1	
Degeneração Walleriana	Ausente	–	0,0	1	6,7	0,072
	Discreto	3	20,0	9	60,0	
	Moderado	6	40,0	3	20,0	
	Acentuado	6	40,0	2	13,3	
Reorganização fascicular	Ausente	3	21,4	–	0,0	0,013
	Discreto	9	64,3	4	28,6	
	Moderado	1	7,1	8	57,1	
	Acentuado	1	7,1	2	14,3	
Infiltrado inflamatório						
Linfoplasmocitário	Ausente	1	6,7	7	46,7	0,026
	Discreto	12	80,0	8	53,3	
	Moderado	2	13,3	–	0,0	
Neutrofílico	Ausente	14	93,3	15	100,0	0,309
	Discreto	1	6,7	–	0,0	
Eosinofílico	Ausente	6	40,0	10	66,7	0,260
	Discreto	8	53,3	5	33,3	
	Moderado	1	6,7	–	0,0	
Linfocitário	Ausente	15	100,0	11	73,3	0,100
	Discreto	–	0,0	4	26,7	

Quadro 3: Análise qualitativa e estatística pelo teste Qui-Quadrado das variáveis histológicas avaliadas pela coloração de HE nas porções de cabo proximal (CP), cabo de regeneração (CR) e cabo distal (CD).

Variável	Escores	CP (N=17)		CR (N=9)		CD (N=3)		p
		n	%	n	%	n	%	
Hemorragia	Ausente	9	52,9	3	33,3	1	33,3	0,585
	Discreto	7	41,2	4	44,4	2	66,7	
	Moderado	1	5,9	2	22,2	–	0,0	
Hiperemia	Ausente	5	29,4	3	33,3	1	33,3	0,667
	Discreto	9	52,9	6	66,7	2	66,7	
	Moderado	3	17,6	–	0,0	–	0,0	
Degeneração Walleriana	Ausente	1	5,9	–	0,0	–	0,0	0,214
	Discreto	3	17,6	6	66,7	2	66,7	
	Moderado	6	35,3	2	22,2	1	33,3	
	Acentuado	7	41,2	1	11,1	–	0,0	
Reorganização fascicular	Ausente	2	11,8	–	0,0	1	50,0	0,306
	Discreto	9	52,9	3	33,3	1	50,0	
	Moderado	5	29,4	4	44,4	–	0,0	
	Acentuado	1	5,9	2	22,2	–	0,0	
Infiltrado inflamatório								
Linfoplasmocitário	Ausente	2	11,8	3	33,3	2	66,7	0,219
	Discreto	13	76,5	6	66,7	1	33,3	
	Moderado	2	11,8	–	0,0	–	0,0	
Neutrófilico	Ausente	16	94,1	9	100,0	3	100,0	0,694
	Discreto	1	5,9	–	0,0	–	0,0	
Eosinofílico	Ausente	10	58,8	4	44,4	1	33,3	0,726
	Discreto	6	35,3	5	55,6	2	66,7	
	Moderado	1	5,9	–	0,0	–	0,0	
Linfocitário	Ausente	17	100,0	6	66,7	2	66,7	0,037
	Discreto	–	0,0	3	33,3	1	33,3	

Quadro 4: Análise qualitativa e estatística pelo teste Qui-Quadrado das variáveis histológicas avaliadas pelas colorações de Tricrômio de Masson e Luxol *fast blue* nos grupos controle e experimentais.

Escores Tricrômio Masson	Controle (N=19)		FCM (N=19)		ADSC (N=19)		p
	n	%	n	%	n	%	
Discreto	7	36,8	10	52,6	13	68,4	0,264
Moderado	9	47,4	7,0	36,8	6	31,6	
Acentuado	3	15,8	2,0	10,5	–	0,0	
Escores Luxol <i>fast blue</i>	Controle (N=30)		FCM (N=28)		ADSC (N=30)		p
	n	%	n	%	n	%	
Ausente	14	46,7	18	64,3	21	70,0	0,289
Discreto	10	33,3	8	28,6	7	23,3	
Moderado	6	20,0	2	7,1	2	6,7	

Quadro 5: Análise qualitativa e estatística pelo teste Qui-Quadrado das variáveis histológicas avaliadas pelas colorações de Tricrômio de Masson e Luxol *fast blue* nos tempos de biopsia (13ª e 26ª semana).

Escores Tricromio Masson	13ª semana (N=28)		26ª semana (N=29)		p
	n	%	n	%	
Discreta	12	42,9	18	62,1	0,205
Moderada	12	42,9	10	34,5	
Acentuada	4	14,3	1	3,4	
Escores Luxol <i>fast blue</i>	13ª semana (N=44)		26ª semana (N=44)		p
	n	%	n	%	
Ausente	28	63,6	25	56,8	0,767
Discreto	11	25,0	14	31,8	
Moderado	5	11,4	5	11,4	

Quadro 6: Análise qualitativa e estatística pelo teste Qui-Quadrado das variáveis histológicas avaliadas pela coloração de Luxol *fast blue* nas porções de cabo proximal (CP), cabo de regeneração (CR) e cabo distal (CD).

Escores	CP (N=29)		CR (N=30)		CD (N=29)		p
	n	%	n	%	n	%	
Ausente	4	13,8	25	83,3	24	82,8	0,001
Discreto	15	51,7	5	16,7	5	17,2	
Moderado	10	34,5	–	0,0	–	0,0	

Quadro 7: Valores médios, desvios padrão e Análise de Variância das marcações dos anticorpos NF e S-100 nos grupos controle e experimentais, e nos tempos de biopsia (13ª e 26ª semana).

Grupo / Variável	n	Média	Desvio Padrão	P
NF				
Controle	28	20867	13469	0,243
FCM	25	19689	16418	
ADSC	27	25912	12577	
S-100				
Controle ^A	25	26223	15700	0,012
FCM ^{A;B}	27	27318	14160	
ADSC ^{A;C}	30	17050	12123	
Período / Variável	n	Média	Desvio Padrão	P
NF				
13ª semana	38	22702	14617	0,768
26ª semana	42	21749	14088	
S-100				
13ª semana	43	24558	14372	0,389
26ª semana	39	21761	14847	

Quadro 8: Valores médios, desvios padrão e análise estatística das marcações dos anticorpos FGF-2 e GDNF nos grupos controle e experimentais, e nos tempos de biopsia (13ª e 26ª semana).

Grupo / Variável	n	Média	Desvio Padrão	P
FGF-2				
Controle	30	2,88	5,47	0,35
FCM	28	2,43	3,70	
ADSC	30	1,20	1,60	
GDNF				
Controle ^A	30	3,63	8,79	0,0017
FCM ^{AB}	29	2,24	2,15	
ADSC ^C	30	1,17	2,07	
Período / Variável				
FGF-2				
13ª semana	45	2,31	3,23	0,057
26ª semana	43	2,02	4,62	
GDNF				
13ª semana	45	3,17	7,25	0,06
26ª semana	44	1,51	2,22	

Teste: Kruskal-wallis (grupos) e Wilcoxon (tempos de biopsia).
Letras diferentes indicam a existência de diferença significativa