



RENATO LUIZ CURSINO NICOLIELO

***“INSIGHTS PARA SIMPLIFICAÇÃO DE TERAPIA CELULAR NA LESÃO DE
NERVO ISQUIÁTICO EM CAMUNDONGOS”***

CAMPINAS
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de ciências médicas

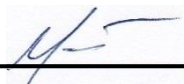
RENATO LUIZ CURSINO NICOLIELO

**“*INSIGHTS* PARA SIMPLIFICAÇÃO DE TERAPIA CELULAR NA LESÃO DE
NERVO ISQUIÁTICO EM CAMUNDONGOS”**

Orientador: Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat

Tese de Doutorado apresentada a Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médica da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELO ALUNO RENATO LUIZ CURSINO NICOLIELO E ORIENTADO PELO
PROF. DR. MARCUS ALEXANDRE FINZI CORAT.



Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

N545i Nicolielo, Renato Luiz Cursino, 1971-
Insights para simplificação de terapia celular na lesão de nervo isquiático em camundongos / Renato Luiz Cursino Nicolielo. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcus Alexandre Finzi Corat.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Terapia tecidual. 2. Células da medula óssea. 3. Células-tronco. 4. Nervo isquiático - Lesões. 5. Regeneração nervosa. I. Corat, Marcus Alexandre Finzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cell therapy on sciatic nerve injury: insights on simplification

Palavras-chave em inglês:

Tissue therapy

Bone marrow cells

Stem cells

Sciatic nerve, Injuries

Nerve regeneration

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Marcus Alexandre Finzi Corat [Orientador]

Marcelo Lancellotti

Ângela Cristina Malheiros Luso

Valdemar Antonio Paffaro Junior

Mário Ângelo Claudino

Data de defesa: 18-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

RENATO LUIZ CURSINO NICOLIELO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCUS ALEXANDRE FINZI CORAT

MEMBROS:

1. PROF. DR. MARCUS ALEXANDRE FINZI CORAT

2. PROF. DR. MARCELO LANCELLOTTI

3. PROF. DR. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

4. PROF. DR. VALDEMAR ANTONIO PAFFARO JUNIOR

5. PROF. DR. MÁRIO ÂNGELO CLAUDINO

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

À Lourdes de Fátima,

Minha esposa, meu Amor. Doze anos compartilhados com você; anos de alegrias e tristezas, mas principalmente de conquistas. Te amo e admiro, dia a dia cada vez mais, feliz por poder sonhá-los e vivenciá-los com você. Minha família, meu porto seguro.

Aos meus pais,

Com quem aprendi valores, moral e respeito. O que sou, devo a vocês.

Aos meus amigos,

Que me apoiaram e me ajudaram a crescer, sempre acreditando em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Marcus Corat, pelas oportunidades, confiança, amizade, pelos puxões de orelhar durante a orientação deste trabalho e por me mostrar que podemos fazer sempre melhor.

Ao Dr. Gustavo Simões, pela grandíssima ajuda nos desenvolvimentos do trabalho, da Tese e Defesa.

Ao Professor Dr. Alexandre, pela receptividade e oportunidade de trabalhar em seu laboratório com seus ótimos alunos.

A Mirian e Daniela, amigas do CEMIB, pelo ótimo ambiente de trabalho, por toda ajudam, pelas discussões relacionadas ao trabalho e, principalmente, pela amizade.

Ao departamento de Farmacologia e o Hemocentro pela grande atenção e ajuda no processamento do material.

Ao Centro Multidisciplinar para Investigação biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) pela permissão, apoio técnico e infraestrutura indispensável ao andamento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas de Unicamp por possibilitar a realização do meu doutorado.

Ao longo desses anos contei com a ajuda e incentivo de diversas pessoas e por isso agradeço a todos.

RESUMO

As lesões traumáticas de nervos periféricos têm sido objeto de numerosos estudos que tentam compreender os processos de reparação pós-lesão. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas, os resultados funcionais têm sido bastante decepcionantes, ao dependem do intervalo de tempo entre lesão e tratamento. Para tratamento rápido e eficaz de lesões nervosas, a terapia celular torna-se uma possibilidade no aumento do sucesso de reparo do nervo. Propõe-se então avaliar a eficácia da terapia celular, sobre os níveis de melhora funcional dos camundongos com o nervo isquiático lesionado e tratado com células progenitoras GFP da medula óssea em comparação com seus controles. No presente trabalho utilizou-se camundongos C57BL/6-HETGFP/J/Unib geneticamente modificados como doadores de células progenitoras GFP (“*green fluorescent protein*”) da medula óssea que foram usadas no tratamento via sistêmica em camundongos C57BL/6/J/Unib não marcados com GFP submetidos a esmagamento do nervo isquiático. Estes animais foram analisados quanto sua performance funcional, migração celular, imunohistoquímica de proteínas p75NTR e neurofilamento e contagem axonal em imagens de microscopia eletrônica. Através dos resultados obtidos verificou-se que houve uma significativa melhora funcional do grupo tratado de 224,9% quando comparado com o grupo controle, principalmente no início do processo de recuperação. Estes valores de melhora funcional coincidiram com a grande quantidade de células GFP, maior quantidade de axônios mielinizados e menor quantidade de axônios degeneradas encontradas no sitio da lesão, além do aumento de imunorreatividade da proteína p75NTR, envolvida no processo de regeneração nervosa. Tudo isto vem a demonstrar a eficiência da terapia celular utilizada com células progenitoras da medula óssea, com uma purificação não específica, tornando-a viável para uma terapia celular sistêmica rápida, simples e eficaz sendo assim uma possibilidade terapêutica para lesões de nervo.

ABSTRACT

Traumatic injuries of peripheral nerves have been the subject of numerous studies that attempt to understand the processes of repair after injury. Despite advances in surgical techniques, the functional results have been very disappointing to depend on the time interval between injury and treatment. For fast and effective treatment of nerve lesions, cell therapy becomes a possibility in increasing the success of nerve repair. Then proposes to evaluate the efficacy of cell therapy on levels of functional improvement of sciatic nerve injured mice with and progenitor cells treated with GFP bone marrow as compared with their controls. In this study we used C57BL/6-HETGFP/J/Unib genetically modified mice as donors of stem cells GFP ("green fluorescent protein") of bone marrow cells that were used in the systemic treatment of mice via C57BL/6/J/Unib not tagged with GFP underwent sciatic nerve crush. These animals were analyzed for their functional performance, cell migration, immunohistochemistry of p75NTR protein and neurofilament and axonal counts in electron microscope images. From the results obtained it was found that there was a significant functional improvement in the treated group 224.9% compared with the control group, especially at the beginning of the recovery process. These values of functional improvement coincided with the large amount of GFP cells, larger and smaller myelinated axons degenerate quantity found at the site of injury axons, and increased immunoreactivity of p75NTR protein involved in nerve regeneration process. All this is to demonstrate the efficiency of cell therapy used in bone marrow progenitor cells with a non-specific purification, making it feasible for a rapid, simple and effective cell therapy systemic therapy is therefore the possibility of injury to nerve. All this is to demonstrate the efficiency of cell therapy used in bone marrow progenitor cells with a non-specific purification, making it feasible for a quick, simple and effective systemic cell therapy is thus a therapeutic possibility for nerve injuries.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	43
2.	OBJETIVOS.....	53
2.1.	Objetivo Geral.....	55
2.2.	Objetivo Específico.....	55
3.	MATERIAL E MÉTODO.....	57
3.1.	Delineamento experimental.....	59
3.2.	Experimento “in vivo”.....	59
3.3.	Extração de células progenitoras GFP da medula óssea.....	61
3.4.	Citometria de fluxo e caracterização da fração obtida de células progenitoras GFP da medula óssea.....	62
3.5.	Procedimento cirúrgico – Axotomia por esmagamento do nervo isquiático.....	64
3.6.	Recuperação funcional motora do nervo isquiático.....	65
3.6.1.	Teste de caminhada de pista.....	65
3.6.2.	Teste de caminhada CatWalk.....	67
3.7.	Microscopia eletrônica de transmissão.....	71
3.7.1.	Eutanásia dos animais e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica de transmissão.....	71
3.7.2.	Quantificação das fibras mielinizadas e degeneradas.....	72
3.8.	Imunohistoquímica.....	72
3.9.	Quantificação das proteínas p75NTR e Neurofilamento por densidade integrada de pixels (d.i.p.).....	73
3.10.	Microscopia de fluorescência para observação das células GFP.....	74
3.11.	Testes estatísticos.....	74
4.	RESULTADOS.....	75
4.1.	Caracterização da fração celular injetada por citômetro de fluxo.....	77

4.2.	Análise da recuperação do nervo isquiático.....	78
4.2.1.	Imagens de fluorescência.....	78
4.2.1.1.	Migração das células GFP.....	78
4.2.1.2.	Migração das respectivas frações de células mononucleares e granulócitos para o nervo isquiático axotomizado.....	80
4.3.	Imunohistoquímica.....	81
4.3.1.	Expressão de p75NTR em animais axotomizados e tratados com células progenitoras GFP da medula óssea.....	81
4.3.2.	Expressão de neurofilamento em animais axotomizados e tratados com células progenitoras GFP da medula óssea.....	82
4.4.	Análise estrutural após esmagamento do nervo isquiático.....	84
4.5.	Análise da recuperação funcional do nervo isquiático.....	86
4.5.1.	Teste de pista de caminhada.....	86
4.5.2.	Teste de pista CatWalk.....	88
5.	DISCUSSÃO.....	91
6.	CONCLUSÃO.....	99
6.1.	Conclusão final.....	101
6.2.	Conclusões específicas.....	101
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
9.	ANEXOS.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

AVC	acidente vascular cerebral
CEMIB	centro multidisciplinar para investigação biológica
CONCEA	conselho nacional de controle de experimentação animal
CY-2	anticorpo com corante cianina tipo 2
CY-3	anticorpo com corante cianina tipo 3
DAPI	4'-dimino-2-fenillindol
FACS	classificação de células por fluorescência
FBS	soro bovino fetal
FSC	dispersão de luz frontal
FL1	fluorescência 1
G-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos
GFP	proteína verde fluorescente
GMP	boas práticas de produção
IPSC	células tronco pluripotentes induzidas
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MNC	célula mononuclear
MSCs	células tronco mesenquimais
NaCl	cloreto de sódio
NF	neurofilamento
NGF	fator de crescimento de nervo
P-75NTR	receptor de baixa afinidade para neurofilamento
PBS	salina tamponada com tampão fosfato
SDF-1	fator 1 de células derivadas do estroma

SSC	dispersão de luz lateral
TNF	fator de necrose tumoral
TrkA	tirosina cinase

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema de funcionamento de um citômetro de fluxo. – Pág. 63

FIGURA 2 – Imagens da cirurgia de axotomia por esmagamento. – Pág. 64

FIGURA 3 – Imagem das patas traseiras gravadas no papel branco. – Pág. 66

FIGURA 4 - Parâmetros de medida das pegadas dos camundongos. – Pág. 67

FIGURA 5 – Imagens do aparelho de análise funcional CatWalk. – Pág. 70

FIGURA 6 - Presença de células GFP no nervo isquiático lesionado. – Pág. 79

FIGURA 7 - Presença das frações de células GFP no nervo isquiático lesionado. – Pág. 80

FIGURA 8 – Imunorreação anti-p75NTR para neurofilamento. – Pág. 81

FIGURA 9 - Imunorreação anti-NF para neurofilamento. – Pág. 83

FIGURA 10 – Presença de axônios degenerados e mielinizados. – Pág. 84

FIGURA 11 - Evolução da melhora funcional pós axotomia. – Pág. 87

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Caracterização de células por dispersão de luz. – Pág. 77

GRÁFICO 2 - Densidade integrada em pixels da imunorreação p75NTR dos grupos tratados e não tratados axotomizados e não axotomizados. – Pág. 82

GRÁFICO 3 - Densidade integrada em pixels da imunorreação neurofilamento dos grupos tratados e não tratados axotomizados e não axotomizados. – Pág. 83

GRÁFICO 4 – Número de axônios mielinizados e número de axônios degenerados. – Pág. 85

GRÁFICO 5 - Melhora funcional entre o grupo tratado com células GFP e controle. – Pág. 86

GRÁFICO 6 - Melhora funcional, em momentos isolados, entre o grupo tratado com células GFP via sistêmica e não tratado. – Pág. 88

GRÁFICO 7 – Melhora funcional entre o grupo tratado com células GFP via sistêmica, via local e não tratado. – Pág. 89

LISTA DE TABELAS E CRONOGRAMAS

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Resumo dos grupos para análise funcional. - Pág. 60

TABELA 2 - Resumo dos grupos para análise de fluorescência. – Pág. 60

LISTA DE CRONOGRAMAS

CRONOGRAMA 1 - Amostra dos dias em que foram realizadas as caminhadas dos camundongos em pista de papel. – Pág. 65

CRONOGRAMA 2 - Amostra dos dias em que foram realizadas as caminhadas dos camundongos na pista do aparelho “CatWalk”. – Pág. 67

1. INTRODUÇÃO

Lesões traumáticas dos nervos periféricos, comum em todas as idades (FAWCETT *et al.*; 1990), resulta em significativo tempo de recuperação e dores neuropáticas debilitantes para quem o sofre (SAMII *et al.*; 2003). No passado, o processo de regeneração do tecido nervoso era visto como questionável por não se saber se células nervosas se regeneravam (LOPES-FILHO *et al.*; 2011). Hoje é objeto de estudo em uma tentativa de compreender o processo de reparo pós-lesão (GRECCO *et al.*; 2003).

Sabe-se que o processo inicial de reparação do sistema nervoso periférico (SNP) o faz dotado de um potencial intrínseco de regeneração após a lesão que pode levar a uma recuperação quase completa. No entanto, se a recuperação não progredir rapidamente, a regeneração do nervo, muitas vezes falha causando um processo degenerativo do nervo, como em casos de lesão do nervo proximal, perda axonal, ou insultos crônicos, devendo sua recuperação ser o mais rápida possível evitando perdas neuronais irreversíveis (GRIFFIN *et al.*; 2010). Por isso, axotomia por esmagamento do nervo isquiático é um modelo amplamente utilizado de neuropatia aguda que estuda a degeneração e regeneração do SNP (MARCONI; 2012) além de ter a vantagem de não ser introduzidas, no modelo experimental, variáveis dependentes da técnica de sutura e da habilidade do cirurgião em fazê-la, pois o arcabouço do nervo é preservado parcialmente dependendo da intensidade do esmagamento (MONTE-RASO; 2006).

Axotomia ou esmagamento de um nervo periférico leva a degeneração do coto distal do nervo, denominado degeneração Walleriana. Degeneração Walleriana é um processo bem descrito caracterizado principalmente pela quebra da bainha de mielina e degeneração das fibras nervosas (ZOCHODNE; 2008). Concomitantemente, ocorre um recrutamento dos macrófagos, bem como a proliferação e multiplicação das células de Schwann envolvidas no recrutamento dos leucócitos que atuam na fagocitose das mielinas fragmentadas e dos restos de axônios em degeneração (RUTKOWISK *et al.*; 1999). Os macrófagos secretam fatores de crescimento e citocinas, os quais

agem como fatores quimiotáticos para as células de Schwann aos neurônios lesados (STOLL *et al.*; 1989) evidenciando seu papel importante na remodelação e mecanismos de reparo do tecido lesionado além de serem envolvidos em interações neuroimunes modulando a atividade funcional dos nervos periféricos (PITTENGER *et al.*; 1999).

O processo de regeneração do nervo inicia imediatamente após a lesão, ocasionando alterações metabólicas e morfológicas no segmento nervoso distal e proximal, bem como no músculo. No segmento distal, onde ocorre a degeneração Walleriana, envolve mudanças histológicas com fragmentação do axônio e da mielina, desarranjo dos neurofilamentos e outros. (BURNETT *et al.*; 2004). Já a regeneração axonal inicia-se poucas horas após a lesão de onde partem de 2 a 3 brotos de cada axônio que seguirão até o órgão-alvo, mediados por fatores tróficos secretados pelas células de Schwann (FAWCETT *et al.*; 1990; JOHNSON *et al.*; 2005). No final do processo degenerativo e regenerativo, temos a recuperação quase que completa do nervo lesionado pela técnica de esmagamento.

O citoplasma neural é composto por proteínas organizadas na forma de fibrilas, constituindo o citoesqueleto, que possui três estruturas filamentosas principais: os microtúbulos, os microfilamentos e os filamentos intermediários como os neurofilamentos (Karp, 2005; Lent, 2005). 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 (Bear *et al.*, 2008; Nolte, 2008). Os NF são compostos por três grupos distintos de proteínas: NF-L, NF-M, e NF-H. Esses dois últimos polipeptídeos possuem prolongamentos que se

projetam para a superfície, que mantêm as propriedades de espaçamento entre os neurofilamentos proporcionando sustentação ao axônio (Karp, 2005).

Neurônios axotomizados induz o aumento da expressão de fatores de crescimento de nervo (NGF) que por sua vez se liga a receptores de alta afinidade tirosina cinase (TrkA) e de baixa afinidade p75NTR (um membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF)) (FRANÇA; 2007). O TNF é considerado um dos principais mediadores de resposta inflamatória. A sua produção é realizada principalmente pelos fagócitos mononucleares, embora também possa ser secretadas por células T ativadas, células NK e mastócitos (ABBAS et al, 2008). Assim a ativação do receptor p75NTR pode ser um dos primeiros passos que iniciam a apoptose celular após lesão do nervo e que pode ajuda a controlar a sobrevivência neural (FRANÇA; 2007), durante os processos inflamatórios.

Uma ferramenta muito usada hoje, no processo de regeneração de nervos periféricos é a terapia com células tronco (SCs) (também conhecidas como células pluripotentes). Nos últimos anos, estudos com SCs vêm apresentando inúmeras descobertas possibilitando a melhora regenerativa do nervo e sucesso no reparo; (LOPES-FILHO *et al.*; 2011).

A interação das células tronco com células hospedeiras, melhora o processo terapêutico, devido à sua atividade na regeneração dos tecidos, especificamente relacionado com o microambiente em que se encontram (POULSON *et al.*; 2002). De acordo com Zago e colaboradores, este tipo celular é identificado através de três características principais: as células não são diferenciadas e nem especializadas, são capazes de se multiplicar e autorenovar por longos períodos de tempo, e têm a propriedade de se diferenciar em células especializadas num tecido específico. Tais células pluripotentes podem ser obtidas a partir de diferentes tipos de tecido embrionário e adulto, bem como serem produzidas a partir de células somáticas, em cultura, chamadas de células tronco pluripotentes induzidas (IPSC).

De acordo com Mota e colaboradores, a utilização de células progenitoras a partir de tecidos adultos não envolve os mesmos critérios éticos e religiosos que os observados com o uso de células tronco embrionárias, como exemplo de células progenitoras, as obtidas a partir de medula óssea (BMC), que será o foco deste trabalho. A facilidade de obtenção e purificação destas células medular abre novos horizontes em terapia celular, tornando-se possível a utilização de um tratamento autólogo, o que diminui a possibilidade de uma rejeição imunológica.

A partir de protocolo de centrifugação diferencial em gradiente, três frações de células progenitoras da medula óssea podem ser obtidas devido às características granular de seus núcleos, como: fração de granulócitos (precursores de granulócitos e granulócitos em diferentes graus de diferenciação); fração de MNC, em sua maioria de células progenitoras hematopoiéticas, com pequenas quantidades de células tronco mesenquimais (MSCs); fração de eritrócitos e restos ósseos.

Experimentos com células mononucleares (MNCs), obtidas a partir de uma punção de células troco hematopoiéticas da medula óssea, demonstraram um aumento na taxa de regeneração de células neuronais; levando a uma melhora clínica da medula espinal e do nervo lesionado (RAHEJA *et al.*; 2012). Também demonstraram efeitos benéficos em isquemia de miocárdio e cerebral (PITTENGER *et al.*; 1999; POULSON *et al.*; 2002; RAAP *et al.*; 2008); e promoção da recuperação funcional em nervos periféricos lesionados (HASEGAWA *et al.*; 2006; CHEN *et al.*; 2007; FERNANDES *et al.*; 2008; JEONG *et al.*; 2009).

A fração MNCs, a mais utilizada, consiste principalmente de células precursoras de alguns grupos celulares, tais como células hematopoiéticas em diferentes graus de diferenciação, o que dá origem a células sanguíneas (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, plaquetas e glóbulos vermelhos), células endoteliais, envolvidas no processo de angiogênese e proteção do endotélio e finalmente, em quantidade muito pequena, as MSCs que são as melhores células pluripotentes entre

essas e que podem dar origem às células musculares, hepatócitos, osteócitos, condrócitos, adipócitos, entre outras do organismo (FRIEDENSTEIN *et al.*; 1968).

Estas MSCs têm sido usadas na terapia celular como um grupo de células multipotentes que podem ser isoladas a partir de diversos tecidos do corpo por purificação especializada. A descoberta de MSCs em 1960 (FRIEDENSTEIN *et al.*; 1966) ganhou popularidade entre os pesquisadores que trabalham com células tronco, devido à sua capacidade de se autorenovar e diferenciar-se em muitos tipos de células diferentes (HAYNESWORTH *et al.*; 1992; BRUDER *et al.*; 1997; PITTENGER *et al.*; 1999). Estudos com MSCs relataram sua transdiferenciação em células de diferentes folhetos embrionários como células ectodérmicas (KOPEN *et al.*; 1999) e endodérmicas (JU *et al.*; 2010; SUN *et al.*; 2007). Além disso, as MSCs têm sido aplicadas clinicamente em pacientes com cardiomiopatia dilatada, doença da cartilagem, acidente vascular cerebral e doenças autoimunes com resultados muito encorajadores (BANG *et al.*; 2005; KARUSSIS *et al.*; 2008; CHIN *et al.*; 2010; GUPTA *et al.*; 2010). O potencial terapêutico das MSCs é forte, principalmente devido seu poder de diferenciação. Terapias com a diferenciação *in vitro* de células especializadas do organismo, bem como o seu potencial para a modificação genética incluindo a engenharia de órgãos em laboratório, faz das MSCs um alvo importante para os estudos de regeneração médica (DEVINE *et al.*; 2000). No entanto, sua utilização em terapia é dispendiosa devido a um reduzido número delas em tecidos. A purificação e produção das MSCs dependem de uma cultura de longo prazo na obtenção de células suficientes para sua utilização em terapias celulares. Para terapias autólogas, dependente de um tratamento rápido, na fase aguda da lesão, é praticamente impossível de utilizar MSC, exigindo protocolos alternativos que sejam mais rápidos, mais barato, e ainda, eficiente.

Neste ponto, a fração mononuclear da medula óssea vem a ser uma fonte bastante segura para este tipo de tratamento (ORKIN; 2000; WEISSMAN *et al.*; 2001). Pesquisas com tais células contam com literatura consistente, nos quais foram também utilizados em modelos de reparos de isquemia

cerebral (MÄKELÄ *et al.*; 2013) além de recuperação de nervo facial (MARTINS *et al.*; 2009), regeneração de cartilagem articular (GAO *et al.*; 2012) e tratamento da Diabetes Mellitus2 (HU *et al.*; 2012). Experimentos recentes com células mononucleares da medula óssea em modelos de corte transversal do nervo isquiático (Axotomia) de ratos sugere seu papel benéfico na regeneração nervosa (RAHEJA *et al.*; 2012).

Há também outra porção celular encontrada entre as células tronco hematopoiéticas da medula óssea, como os granulócitos, que podem exercer um importante papel no processo de migração de células tronco hematopoiéticas para a corrente sanguínea, mostrando potencial de reparação em tecidos danificados (LEE *et al.*, 2005). Estudos demonstraram também que as células da medula óssea mediada por G-CSF foram mobilizadas para um local significativo de lesão no nervo isquiático de rato, participando da sua regeneração (CHENG *et al.*; 2013). Outra experiência com G-CSF demonstrou potencial para a angiogênese e a regeneração do nervo isquiático após lesão (PAN *et al.*; 2009). Estudos utilizando estratégias semelhantes para a mobilização de células da medula óssea através de G-CSF foram realizados em isquemia do miocárdio, isquemia cerebral e lesão medular (KODA *et al.*; 2007; CHENG *et al.*; 2008; TOTH *et al.*; 2008).

Além disso, os granulócitos pode estimular o processo inflamatório através de liberação de histaminas e leucotrienos. Outros estudos realizados com células precursoras da medula óssea, entre elas precursoras de granulócitos, através da estimulação com fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) demonstraram que tais células participam de um importante papel no sistema nervoso central e é de grande relevância em inúmeras situações neurológicas (SHAKE *et al.*; 2002). A princípio, células medulares como os granulócitos através do G-CSF diminuiu o volume de infartos em curso em modelos de roedores (SCHABTIZ *et al.*; 2003; SIX *et al.*; 2003), e em outros estudos, o G-CSF indicou um potencial efeito protetor direto sobre as células do cérebro (KOMINE-KOBAYASHI *et al.*; 2006). Os mecanismos que conduzem a estes efeitos benéficos possíveis inclui

uma combinação de atividade anti-apoptótico em neurônios (HARTUNG *et al.*; 1995; HUANG *et al.*; 2007), estimulação da neurogênese (HARTUNG *et al.*; 1995), efeitos sistêmicos anti-inflamatórios (HARTUNG *et al.*; 1995), formação de vasos (LEE *et al.*; 2005) e mobilização de células derivadas da medula óssea (KAWADA *et al.*; 2006). Há alguns anos, as ações benéficas do G-CSF em modelos de AVC foram demonstrados por vários investigadores independentes em todo o mundo (SHABTIZ *et al.*; 2003; SIX *et al.*; 2003; SCHNEIDER *et al.*; 2005; HUANG *et al.*; 2007; TOTH *et al.*; 2008). Six e colaboradores, em 2003, usaram a oclusão da artéria cerebral média transiente em modelo de camundongos e relataram uma redução no tamanho do infarto e drástica melhora de mortalidade ao fim de 4 dias, quando o tratamento com G-CSF foi iniciada 24 h após o início da isquemia. Outros autores especularam sobre um mecanismo indireto de ação do G-CSF que poderia ter induzido a mobilização de células tronco derivadas da medula óssea as quais invadiram o cérebro infartado e melhoraram o resultado após o AVC (CHOPP *et al.*; 2002; LI *et al.*; 2002).

Esta capacidade das células se mobilizarem vem da formação de pseudópodes conhecidos como lamellipódias que podem mover a célula tronco em uma direção particular. Um estímulo é recebido em uma extremidade da célula que leva à ativação do complexo protéico Arp2/3 e consequente formação de filamentos de actina que empurram a membrana do lamelipódio para fora na direção do estímulo atrativo (Karp G. 1999).

Hoje uma ferramenta fundamental para análise da mobilização de células transplantadas em terapias celular é a proteína fluorescente verde (GFP), derivada da medusa *Aequorea victoria*, que utilizada na criação de muitos modelos experimentais importantes, permite a marcação do sujeito experimental além de identificação fácil e clara do seguimento fornecido por fluorescência (YANG *et al.*; 1996). Inúmeros modelos transgênicos foram gerados, entre eles, os camundongos transgênicos EGFP utilizados em nossos experimentos (OKABE *et al.*; 1997), que contendo um promotor de actina que expressa a proteína EGFP em todas as células do organismo, tem sido um modelo muito útil para

o estudo do comportamento de células aplicadas na terapia celular (CANTZ *et al.*; 2004; SOARES; 2004).

Portanto, a utilização de um protocolo, simples e rápido em terapia celular, utilizando células progenitoras GFP da medula óssea contendo uma diversidade de células em vários estágios de diferenciação (devido a uma purificação não específica), pode ser uma alternativa adicional no tratamento de lesões de nervos periféricos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia da terapia celular, sobre os níveis de melhora funcional dos camundongos com o nervo isquiático lesionado e tratado com uma fração heterogênea de células da medula óssea em comparação com seus controles não tratados.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a participação da fração de células progenitoras da medula óssea contendo uma diversidade de células em vários estágios de diferenciação na regeneração do nervo isquiático.
- Avaliar a melhora funcional dos camundongos lesionados tratados com células progenitoras GFP da medula óssea em comparação com seus controles não tratados.
- Avaliar a migração celular e sua correlação com o desempenho funcional e a expressão das proteínas p75NTR e neurofilamento.
- Avaliar a estrutura do nervo através de microscopia eletrônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Neste trabalho foram realizadas cirurgias de axotomia por esmagamento do nervo isquiático esquerdo em camundongos para causar uma lesão motora. Após quatro dias pós-lesão, iniciou-se o monitorado do processo de recuperação do nervo com e sem a terapia celular num total de trinta dias. O monitoramento foi através de análise funcional (por caminhada de pista em papel e aparelho computadorizado “CatWalk”), migração celular, expressão das proteínas p75NTR e neurofilamento e análise microscópica estrutural do nervo.

3.2. Experimento “*in vivo*”

Todos os animais deste estudo foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com o status SPF. O protocolo para a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, CEEA-IB-Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Número da autorização: 2289-1A/2010); (em anexo) que coincide com os Princípios Éticos para Pesquisa Animal instituído pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a legislação brasileira nº 11.794/2008.

Foram utilizados camundongos transgênicos C57BL/6-HETGFP/J/Unib machos com seis a oito semanas e com 20-25g (n = 10) como doadores de medula óssea cujas células são marcadas com Proteína Fluorescente Verde (GFP). Foi utilizada outra cepa de camundongos com o mesmo perfil genético, C57BL/6/j/Unib sem expressão GFP Unib machos com seis a oito semanas com 20-25g, os quais tiveram axotomia por esmagamento do nervo isquiático e foram divididos em grupos tratados com células progenitoras GFP da medula óssea e grupos controles não tratados, para análise funcional, e análise histológica (Tabelas 1 e 2).

GRUPOS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA					
Grupo	Experimento	Microscopia Eletrônica	Imunohistoquímica NF	Imunohistoquímica p75NTR	Fluorescência GFP
1	Axotomia + Células Progenitoras GFP	5	5	5	15
2	Axotomia + Células Mononucleares GFP	-	-	-	5
3	Axotomia + Granulócitos GFP	-	-	-	5
4	Axotomia sem Tratamento	5	3	3	-
5	Sem Axotomia	-	3	3	-
Total		10	11	11	25

Tabela 1: Resumo dos grupos para análise de fluorescência dos camundongos submetidos à axotomia por esmagamento do nervo isquiático.

GRUPOS PARA ANÁLISE FUNCIONAL			
Grupo	Experimento	Teste Caminhada de Pista	Teste CatWalck
1	Axotomia + GFP via Local	–	10
2	Axotomia + GFP via Sistêmica	10	10
3	Axotomia	10	10
Total		20	30

Tabela 2: Resumo dos grupos para análise funcional dos camundongos submetidos à axotomia por esmagamento do nervo isquiático.

3.3. Extração de células progenitoras GFP da medula óssea

As células progenitoras GFP da medula óssea foram extraídas do fêmur e da tíbia dos camundongos transgênicos C57BL/6-HETGFP/J/Unib machos naturalmente marcados com a proteína fluorescente verde (GFP). Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de xilazina (xilazina, Koning 10mg/kg) e cetamina (Cetamin, Fort Dodge, 50mg/kg) em água destilada (1:1:3). Após a anestesia foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida, dissecados. Os ossos da tíbia e do fêmur foram extraídos e limpos em solução fisiológica.

As extremidades do osso (epífise) foram extraídas, e a medula óssea foi lavada com uma agulha usando meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM). A medula óssea foi extraída, suspendida e lavada em 10 mL de meio DMEM e depois centrifugada a 1250xg durante 10 min a 4°C. Em seguida foi ressuspensa em 10 mL de meio DMEM. Esta solução de células foi cuidadosamente vertida sobre uma solução de Histopaque obtida pela mistura de HISTOPAQUE®-1119 (Sigma) com HISTOPAQUE®-1077 (Sigma) na relação de 1:1. A solução de células vertida na solução de Histopaque 1:1 foi mantida num tubo cônico de 15 mL e centrifugado a 2300xg durante 15 min a 4°C. O anel de células foi recolhido e lavado duas vezes em meio DMEM com centrifugação a 1250xg durante 10 min. As células foram ressuspensas em 1 mL de DMEM, quantificadas e verificada sua viabilidade com solução de corante vital azul de tripano a 0,1% (w/v).

Usando o mesmo procedimento anterior separamos da fração de células progenitoras GFP, uma fração de granulócitos e uma de células mononucleares, não misturando as soluções de HISTOPAQUE®-1119 (Sigma) com HISTOPAQUE®-1077 (Sigma), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

3.4. Citometria de fluxo e caracterização da fração obtida de células progenitoras GFP da medula óssea

Para a caracterização celular, o Citômetro de Fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA), utilizou uma análise automatizada de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “*Forward scatter*” - FSC, granulosidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “*Side Scatter*” - SSC) e intensidade relativa de fluorescência (FL1). A suspensão celular é injetada no citômetro, dirigindo-se para o núcleo central contido na câmara de fluxo. Nesta câmara existe um líquido de envolvimento (Sheath fluid) que não se mistura com a suspensão celular. No núcleo central as células formam um fluxo laminar que mantém, hidrodinamicamente, as células alinhadas de forma que estas passem uma a uma em frente ao feixe luminoso (Research antibody division of MorphoSys [<http://www.abdserotec.com/>]).

A interação das células ou das partículas com o feixe luminoso origina sinais que vão ser alcançados por detectores adequados. A informação recolhida pode agrupar-se em dois tipos fundamentais: a que é originada pela dispersão da luz e a que esta relacionada com a emissão de luz por fluorocromos presentes na célula ou na partícula, ao serem excitados pela fonte luminosa (Figura 1).

A dispersão da luz é um processo físico em que uma célula interage com a luz incidente e muda a direção da luz. As características celulares que contribuem para a dispersão da luz são o tamanho celular, a membrana celular, o núcleo e o material granular do interior da célula. A luz não se dispersa de igual forma em todas as direções. A luz que dispersa para frente (FSC) é uma medida do tamanho celular, enquanto a luz que é dispersa em ângulo reto (SSC) depende da complexidade celular. Os sinais vão depois ser convertidos em dados digitais através de um sistema computadorizado contendo o software CELLQuest™ para aquisição, armazenamento e análise imediata ou posterior dos dados

referentes ao material estudado. Os resultados serão representados através de gráficos Dot Plot monoparamétricos por dispersão de luz e complexidade – SSC.

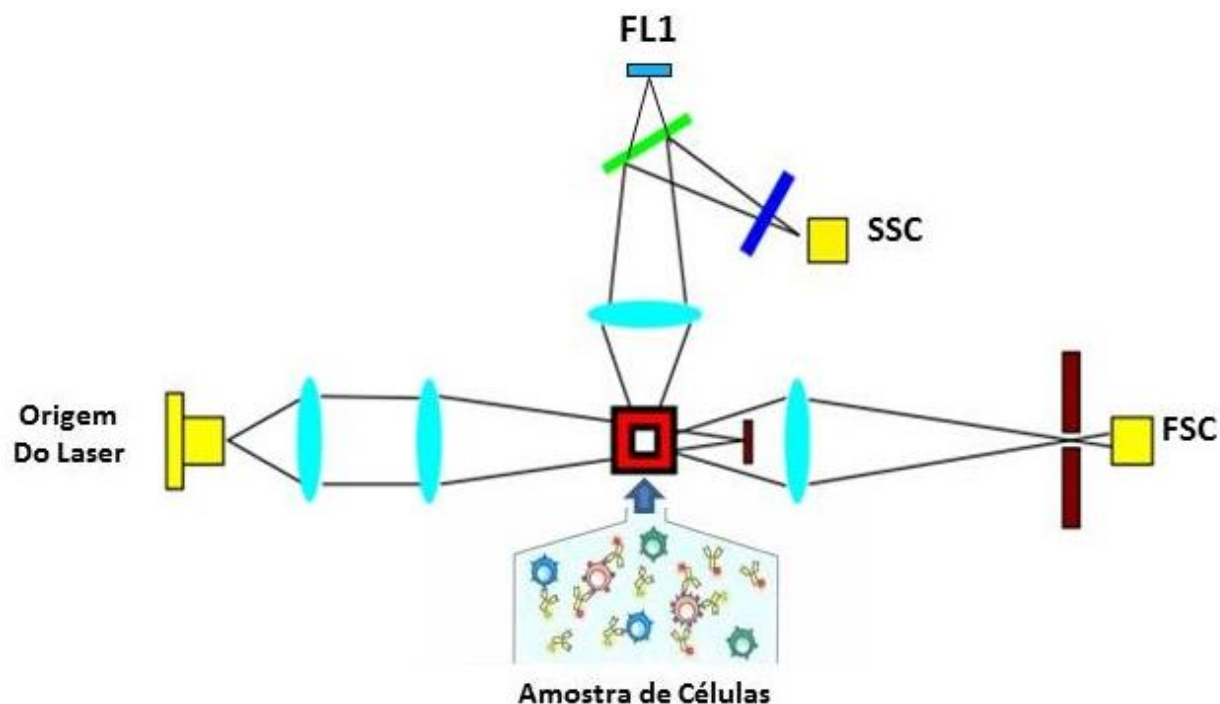


Figura 1. Esquema de funcionamento de um citômetro de fluxo.

Foi feita a contagem por tamanho e granulosidade diferenciando-se Granulócitos e células Mononucleares através de uma alíquota da fração de células na medula óssea de camundongos C57BL/6-GFP. Nessa contagem se define regiões (*gates*) onde serão determinados critérios para a aceitação ou não de eventos que compõem uma população. Estes critérios são pré-escolhidos e salvos pelo usuário de acordo com o interesse da análise. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo e os dados obtidos correspondem, pelo menos, a 50.000 eventos.

3.5. Procedimento cirúrgico – Axotomia por esmagamento do nervo isquiático

Camundongos C57BL/6 machos, sem qualquer transgênese foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de xilazina (xilazina, Koning 10mg/kg) e cetamina (Cetamin, Fort Dodge, 50mg/kg) em água destilada (1:1:3). Após anestesia, foi feita a tricotomia na coxa esquerda e a incisão cirúrgica foi realizada paralela ao fêmur do animal (Figura 2A). Para a exposição do nervo isquiático foi realizada a retração da fáscia e do músculo (Figura 2B). O Processo de esmagamento do nervo isquiático foi padrão para todos os animais submetidos à cirurgia. Primeiro, o esmagamento foi realizada durante 10s de compressão usando uma pinça fina de nº4. Sequencialmente, para ampliar a área de lesão, uma pinça hemostática foi usada por duas vezes no mesmo local do primeiro esmagamento, durando cada uma 10s de compressão (Figura 2C). O músculo e tecido subcutâneo foram devolvidos e em seguida, a pele foi suturada adequadamente (Figura 2D).

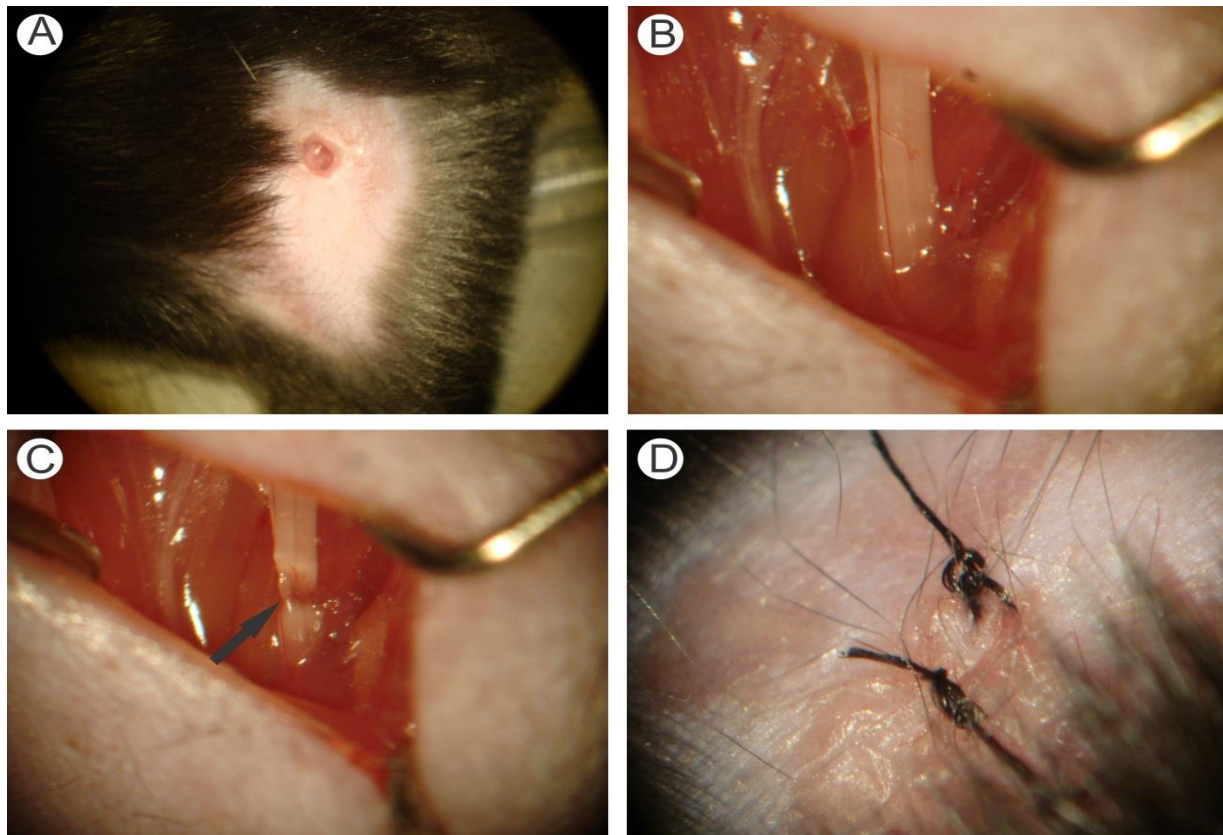


Figura 2 – Figura A – Tricotomia e incisão da coxa esquerda paralela ao fêmur. B – A musculatura da coxa foi afastada, expondo o nervo isquiático para a realização das lesões pela técnica de esmagamento. C – Figura mostrando o nervo isquiático lesionado indicado pela seta. D – Mostrando o final da cirurgia com a pele suturada. (Imagens cedidas por Gustavo Simões)

Após esse procedimento, as frações das células progenitoras GFP da medula óssea dos camundongos transgênicos diluídas em meio DMEM, foram injetadas intravenosamente através do plexo retro orbital no grupo dos camundongos não transgênicos com o nervo isquiático lesionado tratado via sistêmica e injetado diretamente no local da lesão durante a cirurgia no grupo dos camundongos não transgênicos com o nervo isquiático lesionado tratado via local (concentração de 3×10^6 células por animal). Para o controle, foi injetado apenas o veículo (DMEM).

3.6. Recuperação funcional motora do nervo isquiático

3.6.1. Teste de caminhada de pista

Os testes de desempenho foram realizados três vezes por semana com três repetições para todos os animais de ambos os grupos axotomizado tratado com células GFP medular e controle axotomizado não tratado (n=10/cada grupo) cerca de 10 dias pré-operatório e 27 dias pós-operatório num total de 37 dias de análise (Cronograma 1).

Desempenho Funcional em pista de papel

10ºDia	5ºDia	<u>Lesão/ Tratam</u>	4ºDia	6ºDia	10ºDia	12ºDia	14ºDia	18ºDia	21ºDia	24ºDia	27ºDia	<u>Sacr</u>

Cronograma 1: Amostra dos dias em que foram realizadas as caminhadas dos camundongos em pista de papel.

Avaliações funcionais foram realizadas utilizando o "teste de caminhada de pista", onde os animais foram colocados em uma passarela, com papel branco para gravar suas trilhas. A pata traseira esquerda lesionada e direita normal foi identificada com tinta atóxica para que o animal pudesse

gravar suas pegadas na plataforma (Figura 3). A intensidade do sinal deixado pela tinta variou de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal no papel de registo. Estes sinais foram digitalizados e as respectivas dimensões foram medidas, tal como proposto por De Medinaceli *et al.* em 1982.

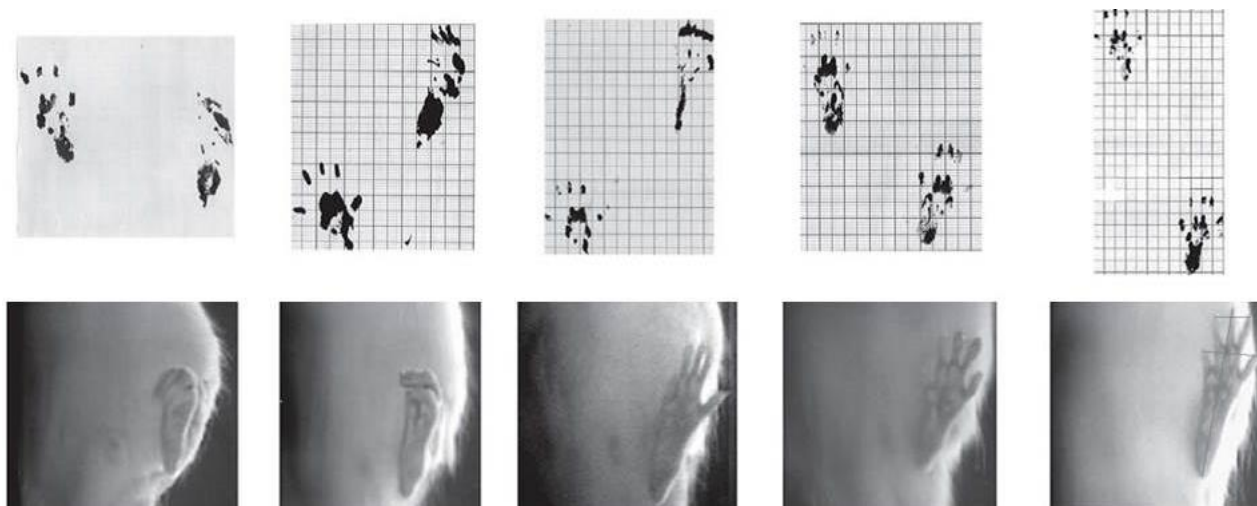


Figura 3: Os animais foram colocados em uma passarela com papel branco e tinta atóxica nas patas traseiras para gravar suas trilhas. (Costa J. et. al., Fisioter. Mov., 2008).

A taxa de recuperação motora para o nervo isquiático foi analisada pelo índice funcional isquiático (SFI), com a relação entre as medições efetuadas a partir de dois parâmetros: a distância entre o primeiro e quinto dedo (propagação do dedo do pé, TS) e a distância entre o terceiro dedo do pé e calcanhar (comprimento de impressão, PL). Estes parâmetros foram utilizados para medir as pegadas da pata traseira esquerda (lesionado) e as da pata posterior direita (normal) (Figura 4). Os resultados de valor foram construídos a partir da seguinte fórmula: $SFI = 118,9 ((ITS - NTS) / NTS) - 51,2 ((IPL - NPL) / NPL) - 7,5$ como descrito por Inerra *et al.* (1998); (I = lado ferido, N = lado normal).

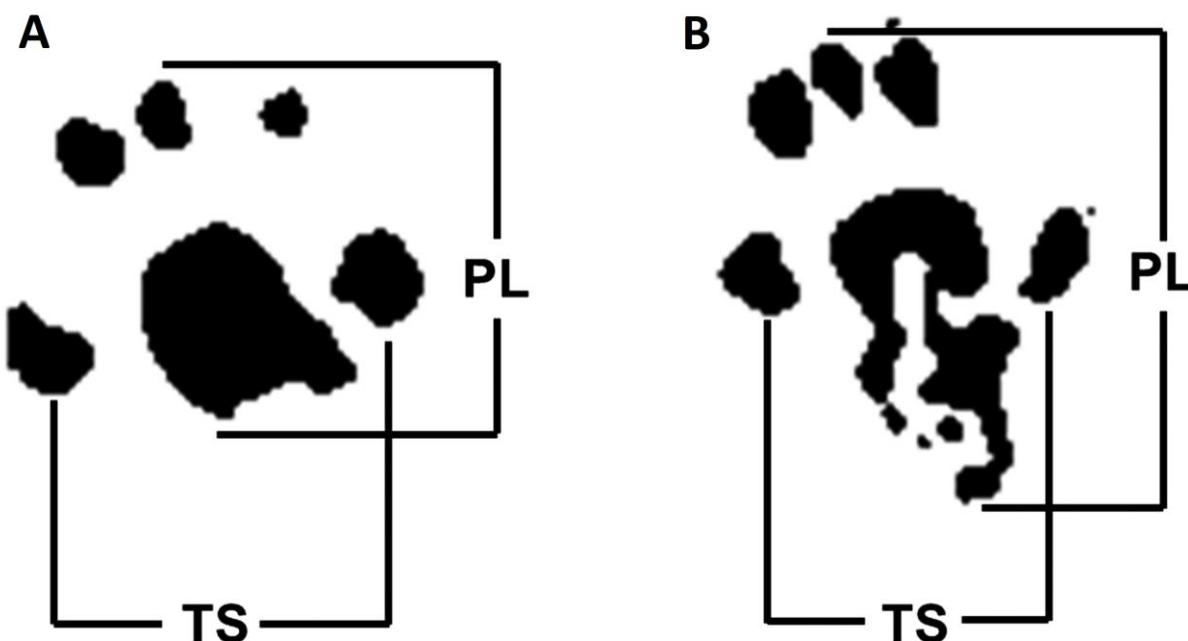
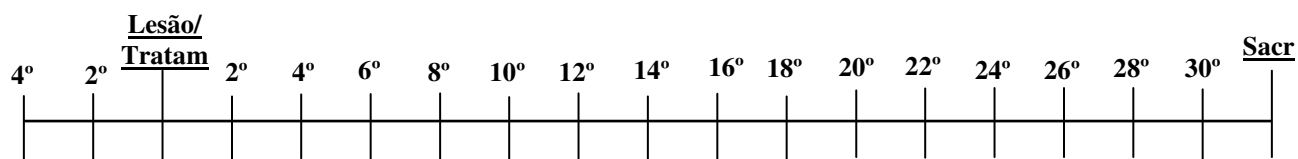


Figura 4: Parâmetros utilizados para medir as pegadas das patas traseiras do camundongo. A: Normal, B: Lesionado.

3.6.2. Teste de caminhada *CatWalk*

Foram realizadas avaliações motoras em todos os animais dos três grupos experimentais, axotomizado não tratado, axotomizado tratado via sistêmica e axotomizado tratado via local (n = 10/cada grupo) quatro, e dois dias antes da lesão do nervo isquiático e a cada dois dias pós-lesão por 30 dias (Cronograma 2) através do “walking track test” (*CatWalk*) (Figura 5A e 5B). O grupo axotomizado tratado via sistêmica e via local foram comparados entre si para análise de desempenho, verificando qual tratamento apresentaria uma resposta de melhora motora maior.

Desempenho Funcional em pista *CatWalk*



Cronograma 2: Amostra dos dias em que foram realizadas as caminhadas dos camundongos na pista do aparelho “CatWalk”.

Os animais foram colocados para andar ao longo de uma passarela com um assoalho de vidro (100 cm comprimento x 15 cm largura x 0.6 cm espessura) localizado em uma sala escura. Uma lâmpada fluorescente marcou somente onde houve pontos de contato no assoalho de vidro (Figura 5C), ou seja, pressão das patas dos animais caminhando. Através de um espelho, o assoalho desse corredor foi monitorado por uma câmera Pulnix TM-765E CCD equipada com uma objetiva grande angular (Cosimar 8,5 mm) que detecta a média de intensidade em pixels (Figura 5A – Detalhe em círculo). A intensidade do sinal variou de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal (Figura 5D). Quanto maior a pressão exercida pela pata do animal, maior o contato da pele com o assoalho e então maior o brilho dos pixels (Figura 5E). Esses sinais foram digitalizados pelo PCImage-SG quadro a quadro (Matrix vision GmH, Oppenheimer, Alemanha) (Figura 5 F e 5G). O programa CatWalk adquiriu, armazenou e analisou os vídeos dos animais caminhando pelo corredor. As medições foram feitas de acordo com vários parâmetros:

- 1- A sequência de passos e suas respectivas frequências;
- 2- Medida da coordenação entre os membros; $RI = \frac{NSPN \times 4}{CP \times 100\%}$ onde NSPN é o número de sequência de passos normais e CP é o número da posição das pegadas;
- 3- Intensidade da pressão exercida pela pegada;
- 4- Duração da fase de apoio;
- 5- Duração da fase de balanço. Como os valores da deambulação dependem da velocidade das passadas, esses parâmetros serão transformados na seguinte fração: fase de deambulação/fase de deambulação + fase de apoio;
- 6- Índice de recuperação motora do nervo isquiático. As medições serão feitas de acordo com dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo (toe spread, TS) e entre o terceiro dedo e o calcanhar (print length, PL). Estes parâmetros serão utilizados para a medição das pegadas das patas posterior esquerda (lesionada) e posterior direita (normal) e os valores serão plotados na

seguinte fórmula descrita por Inserra *et al* (1998): $SFI = 118,9 \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right) - 51,2 \left(\frac{ELP-NLP}{NLP} \right) - 7,5$ (E=lado lesionado, N=lado normal), conforme mostrado na figura 2 do teste de caminhada de pista.

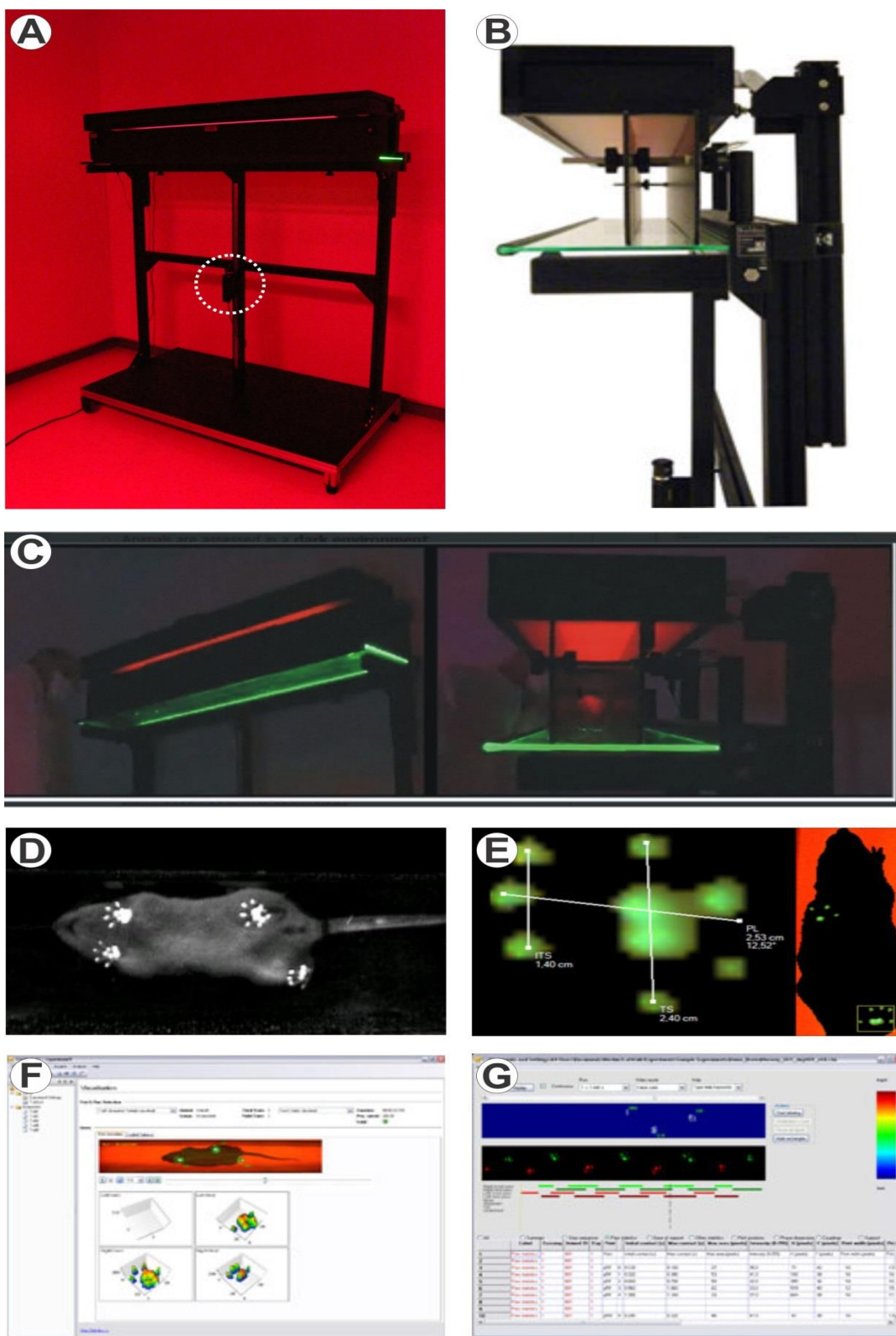


Figura 5: Sistema "CatWalk" (Walking Track Test), Figura A e B - Imagem do equipamento com a câmera de alta resolução em destaque no interior do círculo (Figura A). C – Equipamento ligado destacando a plataforma onde os camundongos realizaram as corridas. D e E - Sistema em funcionamento com destaque para as impressões plantares. F e G - Tela do software enquanto o teste está ocorrendo com destaque para os gráficos 3D e os resultados estatísticos fornecidos pelo próprio sistema ao final do teste. Fonte: <http://www.noldus.com/animal-behavior-research/products/catwalk>

3.7. Microscopia eletrônica de transmissão

3.7.1. Eutanásia dos animais e processamento dos espécimes para microscopia eletrônica de transmissão

Os camundongos de dois grupos de animais; axotomizado tratado com célula progenitoras GFP da medula óssea e o controle (axotomizado não tratado), após 10 dias de axotomia, foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de xilazina (xilazina, Koning 10mg/kg) , cetamina (Cetamin, Fort Dodge, 50mg/kg) em água destilada (1:1:3) e submetidos à toracotomia. A seguir foram perfundidos transcardiacamente com auxílio de uma bomba perfusora do tipo peristáltica. Inicialmente, visando à lavagem dos vasos e órgãos, os animais foram perfundidos com 150mL de uma solução salina tamponada e heparinizada (NaCl 0,9% em PB 0,1M, pH 7,4). A fixação foi realizada pela subsequente perfusão de 300mL de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em PB 0,1M, pH 7,4. Posteriormente a fixação, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior do tubo e autoenxerto foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 12 horas a uma temperatura de 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em PB 0,1M, pH 7,4 e dissecados sob lupa, sendo os cotos proximal e distal separados. Os fragmentos foram colocados individualmente em frascos contendo PB 0,1M, pH 7,4. Estes foram então pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em PB 0,1M, pH 7,4. Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescentes de acetona e incluídos em resina (Epon 812, EMS). Os blocos foram desbastados e as secções semi-finas (0,5µm) obtidas foram observadas ao microscópio de luz. A seguir, algumas regiões foram selecionadas para realização dos cortes ultrafinos (500Å; Ultramicrotomo LKB, Bromma 8800) os quais foram coletados em telas de cobre (200 Mesh). Após contraste em acetato de uranila e citrato de chumbo, os espécimes foram observados ao microscópio eletrônico Zeiss Leo 906, operando a 60kv. Imagens das amostras foram adquiridas pela vídeo-

câmera Eagle 2K (FEI Company, Holanda) conectada ao microscópio e a um sistema computadorizado em aumento de 11.000X.

3.7.2. Quantificação das fibras mielinizadas e degeneradas

A quantificação das fibras foi feita manualmente através das imagens adquiridas pela vídeo-câmera Eagle 2K (FEI Company, Holanda) delimitada da área lesiona. Foi contabilizada como axônios mielínicos degenerados ou em degeneração aqueles que apresentavam em corte transversal, cercados por mielina adicional com aspecto rugoso e forma acebolada (de cebola). Já os axônios mielínicos em regeneração ou mielinizados foram contabilizados os axônios contendo, em corte transversal, um axoplasma claro cercado por um anel intensamente manchado de mielina (Mnatsakanyan *et al.*; 2011).

3.8. Imunohistoquímica

Os camundongos de três grupos; axotomizado tratado com células progenitoras GFP da medula óssea, o controle (axotomizado não tratado) e não axotomizado foram anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de xilazina (xilazina, Koning 10mg/kg) e cetamina (Cetamin, Fort Dodge, 50mg/kg) em água destilada (1:1:3) e submetidos à toracotomia. Os camundongos foram perfundidos transcardiacamente com auxílio de uma bomba de infusão contendo 20 ml de solução salina (NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,38) para uma lavagem total dos vasos e órgãos. Para a fixação foi realizada a perfusão de 20 mL de uma solução de formalina (10%) em tampão fosfato de sódio, pH 7,38.

Após a fixação, os espécimes foram dissecados e mantidos em fixador por 12 horas a uma temperatura de 4°C. Passado este período, os nervos isquiáticos direito e esquerdo foram congelados e incluídos em *Tissue-Tek* (Miles Inc., USA). Cortes histológicos longitudinais com 7µm de espessura

foram obtidos em criostato. As secções foram então transferidas para lâminas e estocadas a -20°C até a realização das imunomarcações.

Para a realização da imunohistoquímica as lâminas foram inicialmente climatizadas e imersas em PBS 0,01M + Triton X100 (3%), sendo posteriormente incubadas em câmara úmida com 150µl de solução contendo BSA 3% em PBS por 1 hora. A seguir as secções foram lavadas em PBS 0,01M e os anticorpos primários foram aplicados, sendo o período de incubação de 3 horas. Foram empregados os seguintes anticorpos primários: camundongo anti-Neurofilamento (1:100, Chemicon) e cabra anti-p75NTR (1:400, Santa Cruz). Em sequência à primeira incubação, as lâminas foram lavadas em PBS 0,01M e incubadas com os anticorpos secundários CY-2 (Jackson Lab., USA) para neurofilamento e CY-3 (Jackson Lab., USA) para proteína p75NTR, por 50 minutos. Os espécimes foram novamente lavados em PBS 0,01M e montados em glicerol/PBS 0,01M (3:1), sendo observado e documentado imagens (50µm) utilizando-se sistema confocal (BioRad MRC-1024UV) acoplado a um microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 100, Zeiss) utilizando-se os filtros para fluoresceína (CY-2, 488nm) e rodamina (CY-3, 568nm).

3.9. Quantificação das proteínas p75NTR e Neurofilamento por densidade integrada de pixels (d.i.p.)

Cinco imagens de nervo apresentando imunorreatividade para p75NTR com fluorescência vermelha, foram capturadas de cada um dos onze camundongos que formaram os três grupos envolvidos na análise (n=3/não axotomizado, n=3/controle (axotomizado não tratado) e n=5/tratado (axotomizado tratado via sistêmica)), totalizando cinquenta e cinco imagens quantificadas para p75NTR. A quantificação para ambas as análises foram realizadas, utilizando-se o software *IMAGE J* (versão 1.33u, *National Institutes of Health*, USA). A partir destas imagens, cinco áreas de 0,012mm² representativas de cada uma das cinquenta e cinco imagens foram documentadas aleatoriamente para

quantificação da densidade integrada de pixels. Uma média aritmética destas áreas foi calculada para cada grupo e através da análise desses valores, foram realizadas as comparações entre os grupos p75NTR. O mesmo processo foi realizado para a Imunohistoquímica de neurofilamento com fluorescência verde.

3.10. Microscopia de fluorescência para observação das células GFP

As amostras nas lâminas foram cortadas em criostato a 7µm de espessura, em seguida, coberta com uma solução de 300 nM de 4',6- diamidino -2-fenilindol, Dilactate (DAPI) para a coloração nuclear, juntamente com uma lamínula. Após 5 min, foram observados com um microscópio de fluorescência CPU Leica DM-5000B modelo CPR5000 utilizado um filtro de excitação modelo BP490/20 num comprimento de onda de 490nm (verde), BP405/10 em comprimentos de 405nm (azul) e luz visível para um controle da morfologia do tecido.

3.11. Testes estatísticos

As análises estatísticas foram realizadas com o programa *Graphpad Prism 5*. Curva de regressão não linear foi usada para a função de comparação entre curvas de recuperação funcional dos camundongos tratados e não tratados. Teste U de Mann-Whitne foi utilizado para comparar os dois grupos na análise de contagem de axônios mielinizados e degenerados. *Iway ANOVA* foi usada para fazer a análise geral dos valores obtidos nos grupos, assim como a comparação dos grupos entre si, na análise de expressão de p75NTR e Neurofilamento. O teste *2way ANOVA* foi usado para o mesmo tipo de comparação que o teste anterior envolvendo uma linha temporal, para a análise de recuperação motora do nervo isquiático. Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão e a significância foi considerado $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da fração celular injetada por citômetro de fluxo

A análise por Citômetro de Fluxo (FACScalibur – BECTON DICKINSON, San Jose, EUA), através de dispersão de luz, gerou gráficos *Dot Plot* (gráfico de pontos) monoparamétricos de tamanho (FSC) X granulidade (SSC), sendo possível separar as células progenitoras da medula óssea (selecionadas dentro do *gate* R1), com uma proporção de 89,95%, dos outros componentes presentes no sangue, como plaquetas, *debris* celulares e células em maior grau de diferenciação (selecionadas fora do *gate* R1), tendo estas, proporção de 10,05% (Gráfico 1A). Já o gráfico ao lado, em vermelho (Gráfico 1B) mostra as células selecionadas pelo *gate* R1, porém apresentando uma nova seleção (*gate* R2) onde encontramos dentro 54,40% de células da fração de Granulócitos e fora de 45,60% de células da fração Mononuclear.

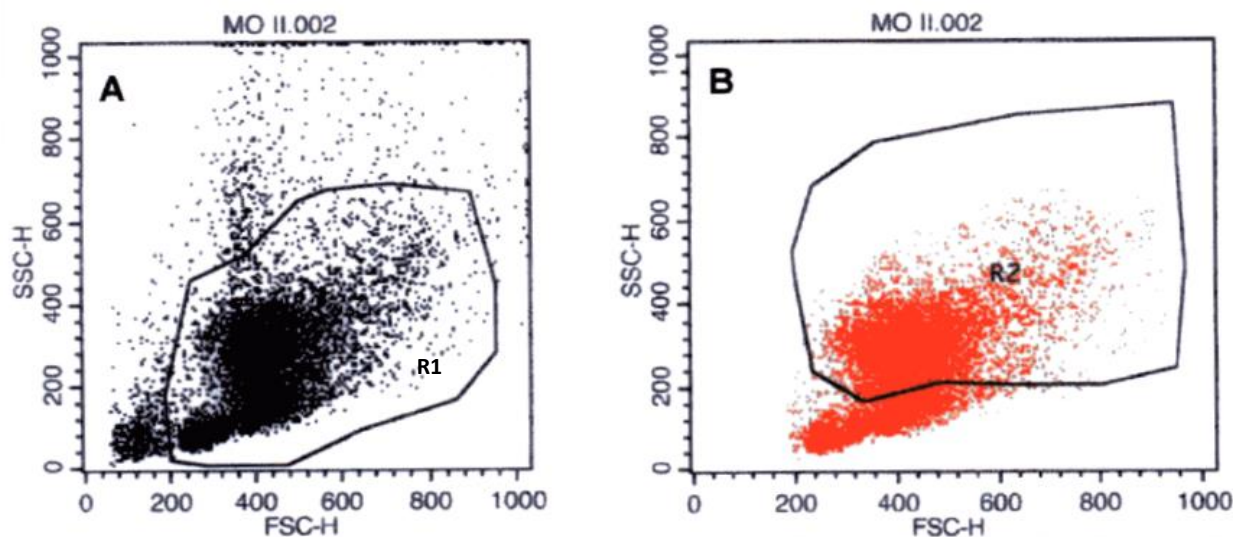


Gráfico1: A - Gráficos *Dot Plot* monoparamétricos apresentando *gate* R1 selecionando a população da fração de células progenitoras da medula óssea. B - Gráfico *Dot Plot* monoparamétrico representando dentro do *gate* R2, as frações de granulócitos e fora as células mononucleares.

4.2. Análise da recuperação do nervo isquiático

4.2.1. Imagens de fluorescência

4.2.1.1. Migração das células GFP

Através de uma análise do nervo isquiático lesionado nos tempos 5, 15 e 30 dias pós-tratamento, foi possível observar a presença ou ausência de células de GFP (cor verde) durante o processo de regeneração do nervo, bem como o processo de organização do tecido nervoso como mostrado na figura 6.

Nos primeiros cinco dias, observaram-se uma grande quantidade de células GFP injetadas, ao longo do nervo isquiático lesionado esquerdo na figura 6A e 6B (setas vermelhas em 6B), o que demonstrou uma migração destas células especificamente para o tecido lesionado; pois as células GFP não foram observadas no nervo correspondente direito não lesionado (dados não mostrados), mostrando a especificidade da migração de células à lesão. Em mais detalhe, a presença de lamellipodia nas células foi verificado, o que demonstra o carácter migratório destas células (triângulos vermelhos na figura 6A - detalhe). As células GFP foram ainda observadas com quinze dias após o tratamento, durante o processo de regeneração do nervo, no entanto, sem lamellipodia demonstrado na figura 6C e 6D (setas vermelhas em 6D). Após trinta dias, quando a regeneração do nervo foi completada, já não havia mais a presença das células GFP como demonstrado na figura 6E e 6F.

Nas fotos sobrepostas ao lado direito, vemos claramente a evolução do processo de regeneração do tecido lesado, juntamente com a sua organização. Como evidenciado pela desorganização da orientação nuclear do tecido (Figura 6B), com quinze dias vemos os rearranjos das fibras nervosas caracterizando o processo de regeneração (Figura 6D), até se completar em trinta dias (Figura 6F), onde se apresenta o tecido organizado. Além disso, o grande número de núcleos corados em azul pelo

DAPI (Figura 6B) demonstrou a presença de um número grande de células causadoras de processo inflamatório agudo, que certamente migraram para a área lesionada neste período.

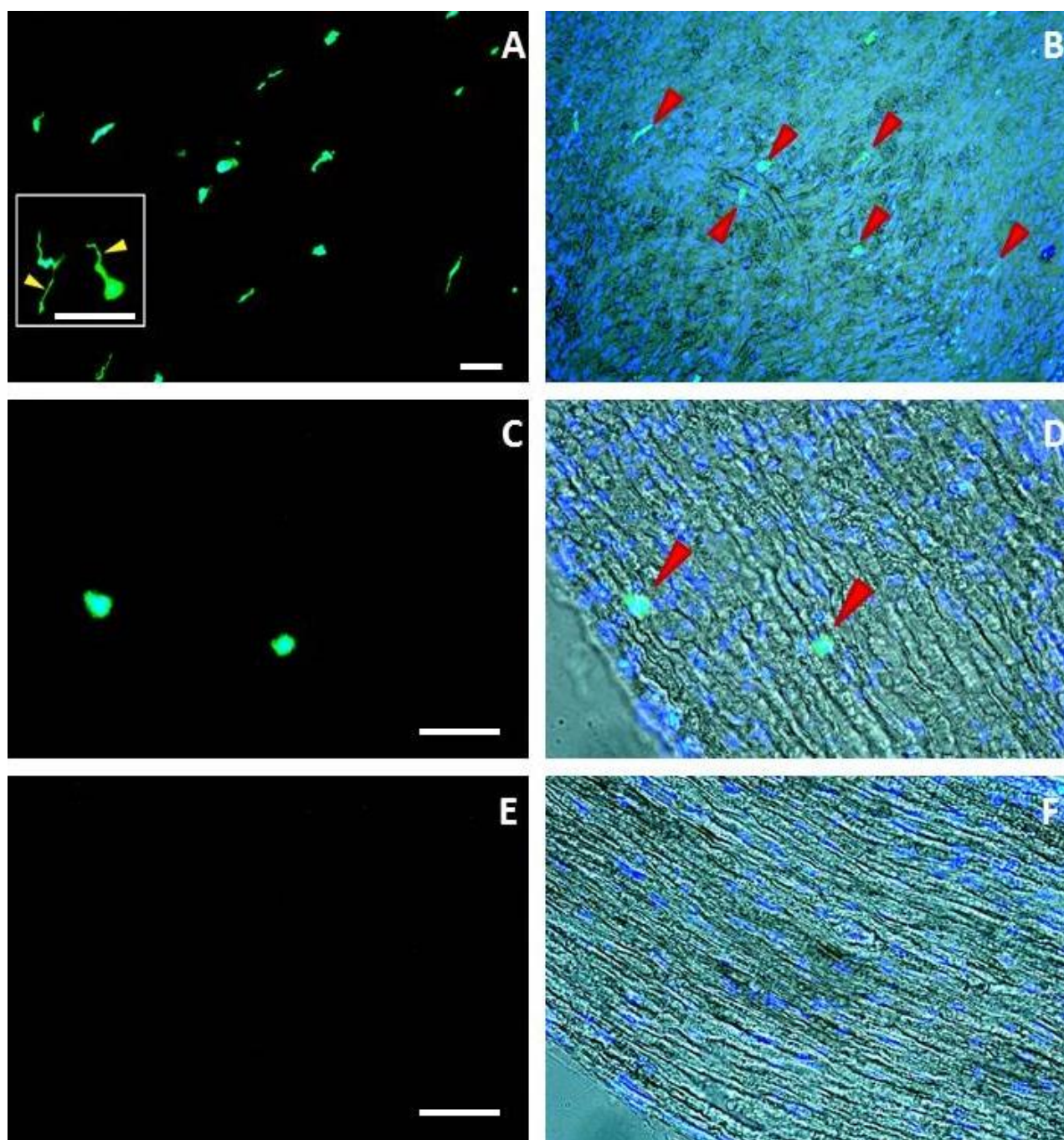


Figura 6: Presença de células GFP (proteína fluorescente verde) no nervo isquiático lesionado (setas vermelhas, figuras B e D) depois de cinco dias (A e B), quinze dias (C e D) e ausência das células GFP em trinta dias (E e F) após a cirurgia de esmagamento do nervo e tratamento. Autofluorescência ou não das células GFP (A, C e E). Detalhe em A (setas amarelas), mostra a presença de lamellipodia, demonstrando o caráter migratório destas células. Sobreposição de imagens de tecido do nervo isquiático em respectivo tempo de tratamento celular (B, D e F). Autofluorescência das células GFP (verde) foi observados a 490 nm. Coloração de núcleos de células com DAPI (azul) foram observadas em 402 nm e contrastadas com luz visível. Barra de referência: 50µm.

4.2.1.2. Migração das respectivas frações de células mononucleares e granulócitos para o nervo isquiático axotomizado.

Para assegurar que ambas as frações de células mononucleares e granulócitos migraram para a lesão e estava presente no processo de cicatrização, uma alíquota das células progenitoras da medula óssea foi usada para a extração destas duas frações em separado, não misturando as soluções de HISTOPAQUE®-1119 (Sigma) com HISTOPAQUE®-1077 (Sigma) e seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. As duas frações celulares foram utilizadas separadamente no tratamento e em seguida, verificou-se sua migração. Observou-se que ambas as frações migraram para a lesão no início do processo de cura, cinco dias após a lesão (Figura 7). Observa-se a presença de granulócito nas figuras 7A e 7B (seta vermelha em 7B) e de células mononucleares nas figuras 7C e 7D (setas vermelhas em 7D).

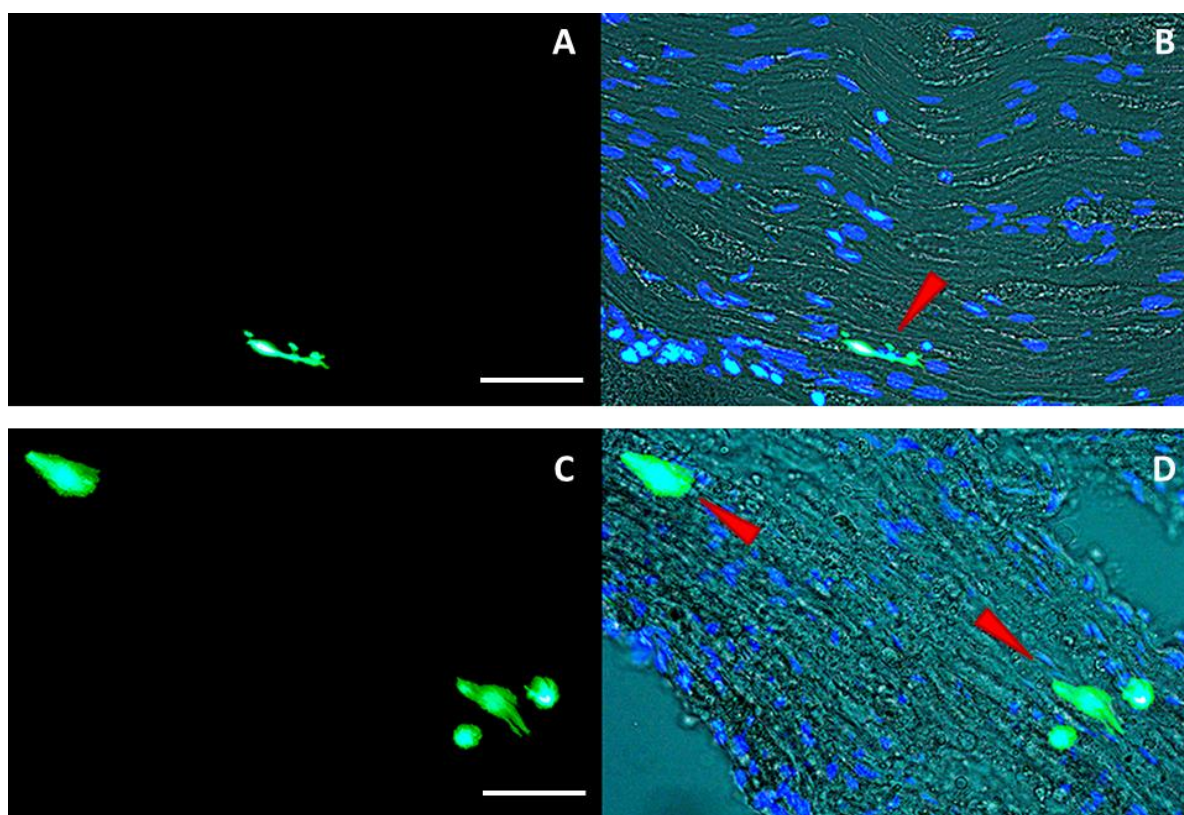


Figura 7: Presença de células de GFP (proteína fluorescente verde) a partir de frações de granulócitos (A e B) e mononucleares (C e D) (setas vermelhas, figuras B e D), que apresentam extensões (lamellipodia) indicativas das células migratórias no nervo isquiático. Imagem mostra autofluorescência das células GFP (A e C) e sobreposição do tecido do nervo isquiático (B e D). Autofluorescência das células GFP (verde) foram observados a 490 nm. Coloração de núcleos de células com DAPI (azul) foram observadas em 402 nm e contrastadas com a luz visível. Barra de referência: 50µm.

4.3. Imunohistoquímica

4.3.1. Expressão de p75NTR em animais axotomizados e tratados com células progenitoras GFP da medula óssea.

Cinco dias após a axotomia por esmagamento do nervo isquiático, o grupo não axotomizado (Figura 8A), praticamente não se encontrou imunorreatividade para p75NTR, com $2,53 \pm 0,12$ d.i.p. Já o grupo controle (axotomizado não tratado) (Figura 8B), foi encontrada uma imunorreatividade para proteína p75NTR, de $11,93 \pm 0,15$ d.i.p. (densidade integrada em pixels) e, em maior grau, no grupo tratado (axotomizado tratado via sistêmica) (Figura 8C), com $13,94 \pm 0,29$ d.i.p.

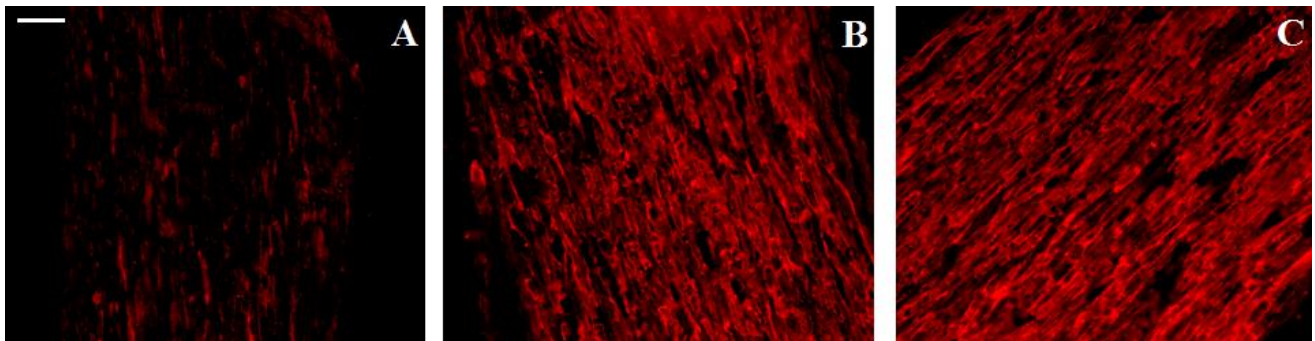


Figura 8: Imunomarcações anti-p75NTR, cinco dias após axotomia por esmagamento do nervo isquiático. (A) Nervo não axotomizado; (B) nervo axotomizado por esmagamento, não tratado. (C) nervo axotomizado por esmagamento tratado com células progenitoras da medula óssea GFP. Barra de referência de 50 μ m.

Após cinco dias da lesão do nervo isquiático, notou-se significativamente que houve uma maior imunorreatividade para p75NTR (como esperado) nos grupos axotomizados controle e tratado com células GFP quando comparados ao grupo não axotomizado. Quando foram comparados os dois grupos axotomizados (controle e tratado), também houve diferença significativa, sendo que o grupo tratado apresentou maior nível de expressão de p75NTR que o controle (Gráfico 2).

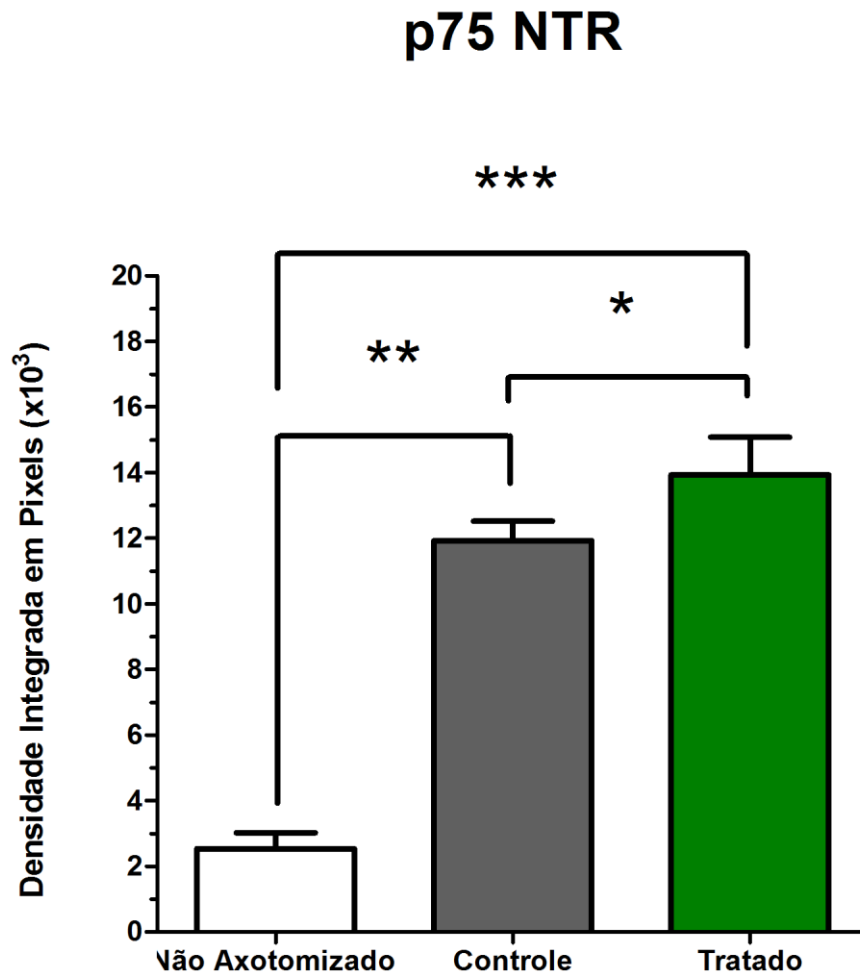


Gráfico 2: Análise quantitativa da densidade integrada de pixels para p75NTR entre os grupos não axotomizados (branco), controle (cinza) e tratados (verde). (média $\pm$ S.E.M.; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ por 1 way ANOVA).

4.3.2. Expressão de neurofilamento em animais axotomizados e tratados com células progenitoras GFP da medula óssea.

Cinco dias após a axotomia por esmagamento do nervo isquiático, a imunorreatividade para NF (Neurofilamento) não foi significativa para nenhum dos três grupos. O grupo não axotomizado (Figura 9A), obteve $13,90 \pm 0,19$ d.i.p. Entre os grupos axotomizados o grupo controle (Figura 9B) obteve $13,14 \pm 0,20$ d.i.p. e o grupo tratado (Figura 9C) obteve $13,38 \pm 0,38$ d.i.p.

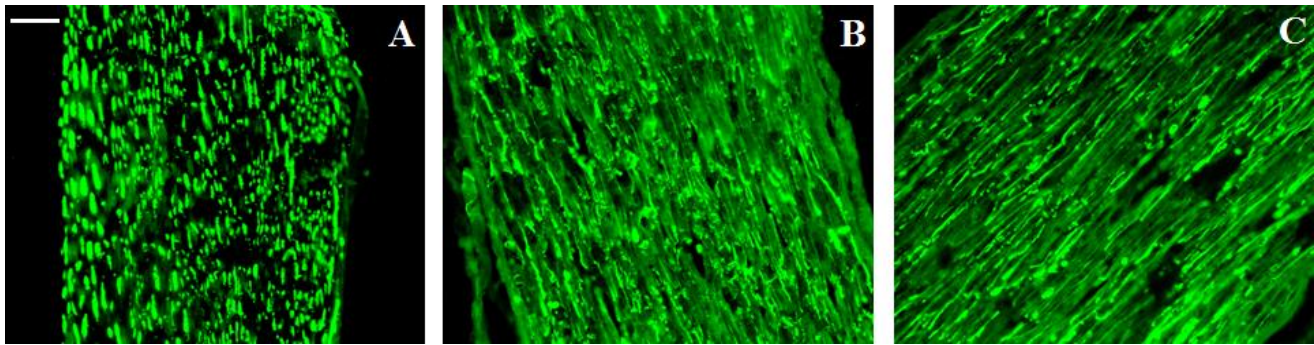


Figura 9: Imunomarcção anti-NF, cinco dias após axotomia por esmagamento do nervo isquiático. (A) Nervo não axotomizado; (B) nervo axotomizado por esmagamento, não tratado. (C) nervo axotomizado por esmagamento tratado com células progenitoras da medula óssea GFP. Barra de referência de 50 μ m.

Não houve diferença significativa entre os três grupos: não axotomizados, axotomizados controle e tratado (Gráfico 3).

Neurofilamento

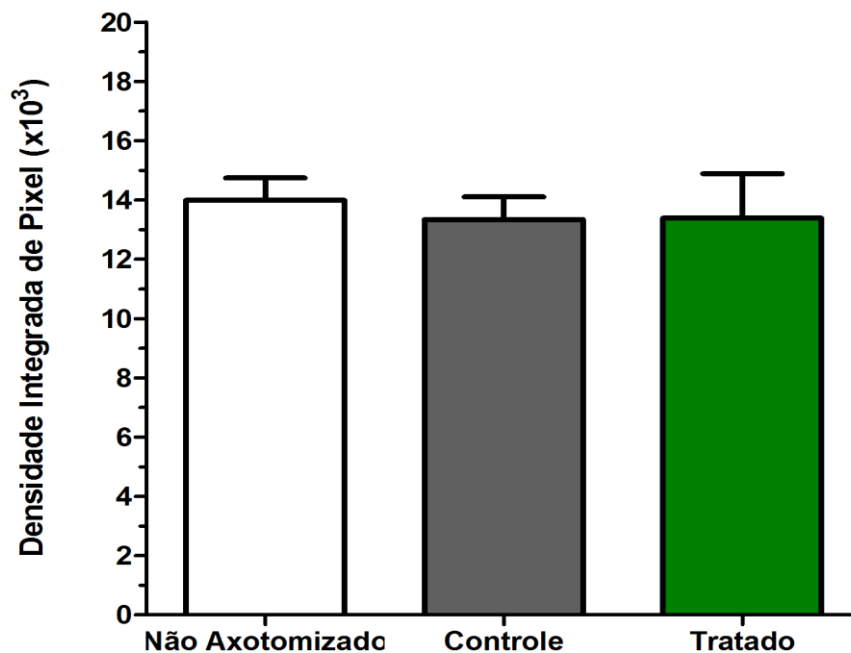


Gráfico 3: Análise quantitativa da densidade integrada de pixels para Neurofilamento entre os grupos não axotomizados (branco), controle (cinza) e tratado (verde). (média $\pm$ S.E.M.; por 1 way ANOVA).

4.4. Análise estrutural após esmagamento do nervo isquiático.

Após dez dias da axotomia por esmagamento do nervo isquiático os camundongos C57BL/6, do grupo controle e tratado, foram sacrificados e os nervos isquiáticos processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e, posterior, contagem dos neurônios degenerados e mielinizados. A quantificação das fibras mielínicas e fibras degeneradas dos nervos submetidos ao esmagamento do grupo controle e tratado (Figura 10). A quantificação do grupo tratado (axotomizado tratado via sistêmica) apresentando um maior número de axônios mielinizados com $33,65 \pm 0,86$; e menor número de mielinas degeneradas com $5,40 \pm 0,29$ (Figura 10A); quando comparada com o grupo controle (axotomizado não tratado) apresentando menor número de axônios mielinizados com $30,62 \pm 0,57$; e maior número de mielinas degeneradas com $8,20 \pm 0,47$ (Figura 10B).

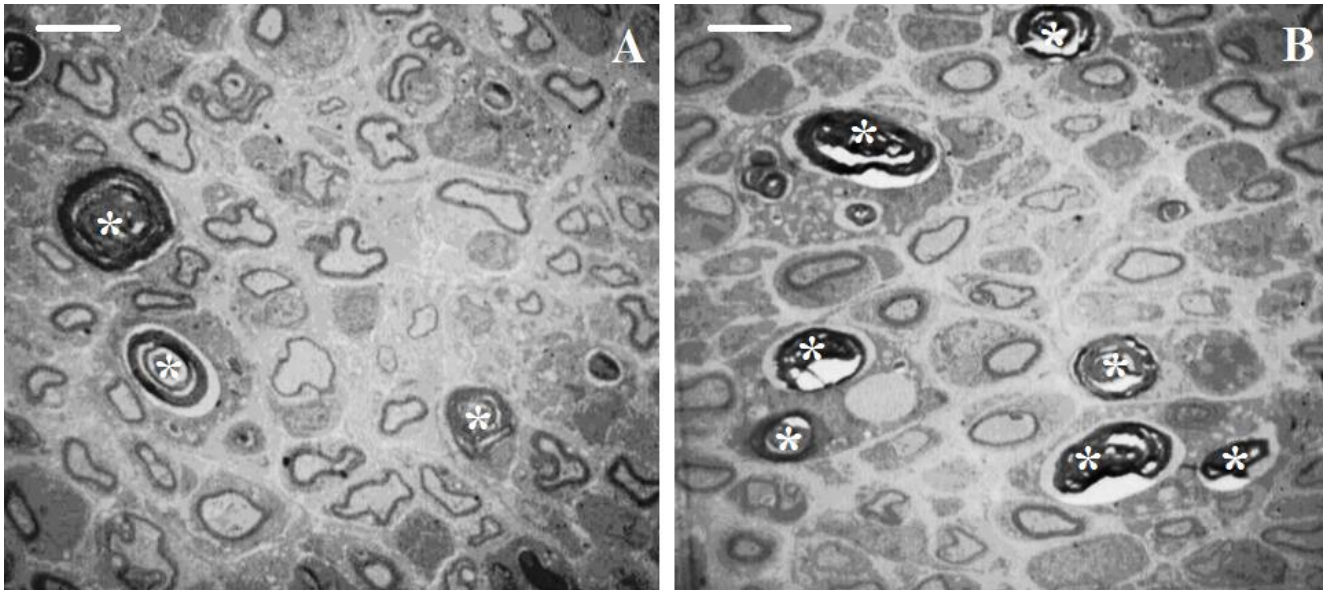


Figura 10: Fotomicrografias eletrônicas representativas do nervo isquiático pós-lesão dos dois grupos: tratado via sistêmica (A) e não tratado controle (B) com células progenitoras da medula óssea GFP (* representa axônios com mielinas degeneradas). Barra de referência: 5µm.

A análise estatística demonstrou que houve diferença significativa dos axônios mielinizados entre os grupos tratados via sistêmica e não tratado controle com $p = 0,0140$. Também demonstrou que houve diferença extremamente significativa na contagem dos axônios degenerados entre os mesmos grupos com $p = 0,0007$ (Gráfico 4).

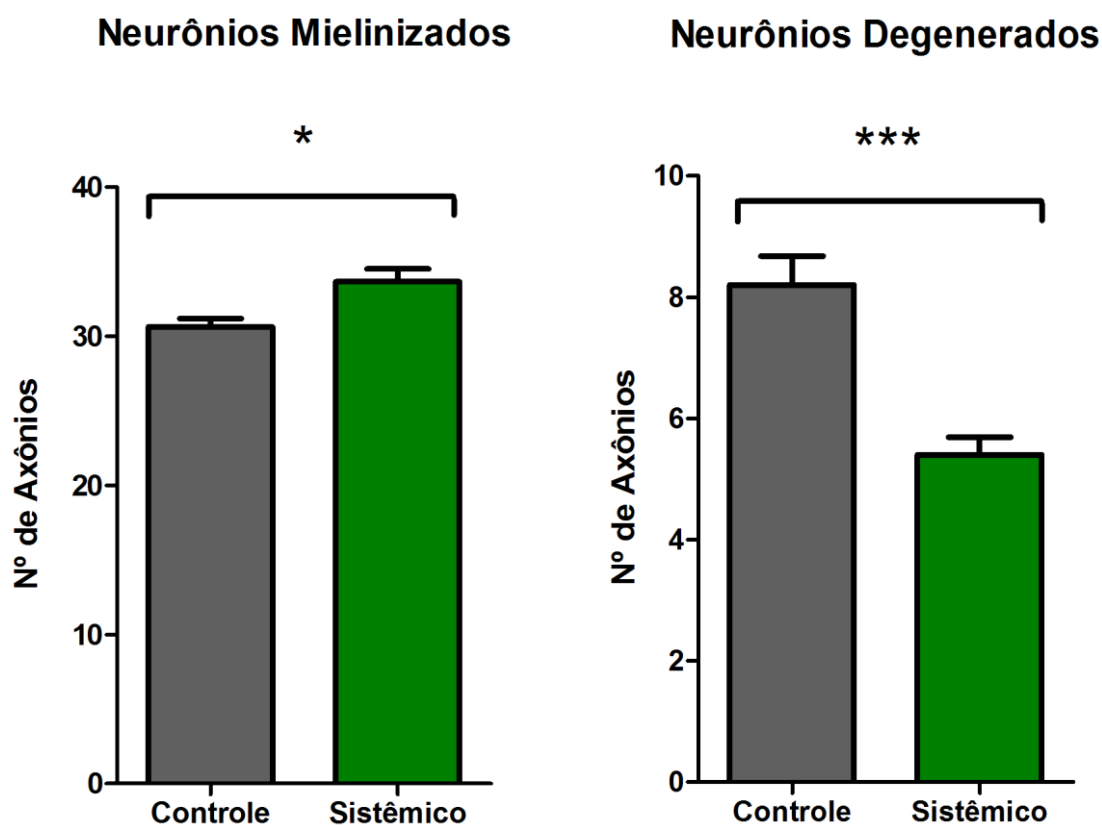


Gráfico 4: Análise quantitativa da ultraestrutura dos axônios. Amostra dos números de axônios mielinizados e degenerados em ambos os grupos não tratado controle e tratado via sistêmica com células progenitoras GFP. (média $\pm$ S.E.M.; * $p = 0,0140$; *** $p = 0,0007$ ambos por Teste U de Mann-Whitney).

4.5. Análise da recuperação funcional do nervo isquiático

4.5.1. Teste de pista de caminhada

Análises funcionais foram realizadas com o teste de pista de caminhada em prancha com tinta atóxica e papel branco para verificar a recuperação motora dos animais, com e sem tratamento celular. Observou-se a funcionalidade das patas lesionadas ao qual indiretamente proporcionou a observação da regeneração e recuperação da atividade do nervo isquiático. Esta análise do grupo tratado com células progenitoras GFP da medula óssea, mostrou uma melhora significativa em relação ao grupo controle não tratado. Isto foi mais acentuado nos primeiros dias após o tratamento (Gráfico 5), com o ponto 0 (Zero) como o dia da cirurgia. Antes do ponto zero, foram dias de pré-corrida (10 e 5 dias antes) e após ponto zero foram dias de corrida (4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 17, 19, 21 e 24 dias). A curva correspondente aos animais tratados (linha verde) manteve-se superior em termos de funcionalidade, quando comparado com a curva dos animais controle (linha cinza), desde o início até o décimo sétimo dia quando ambos foram se igualando.

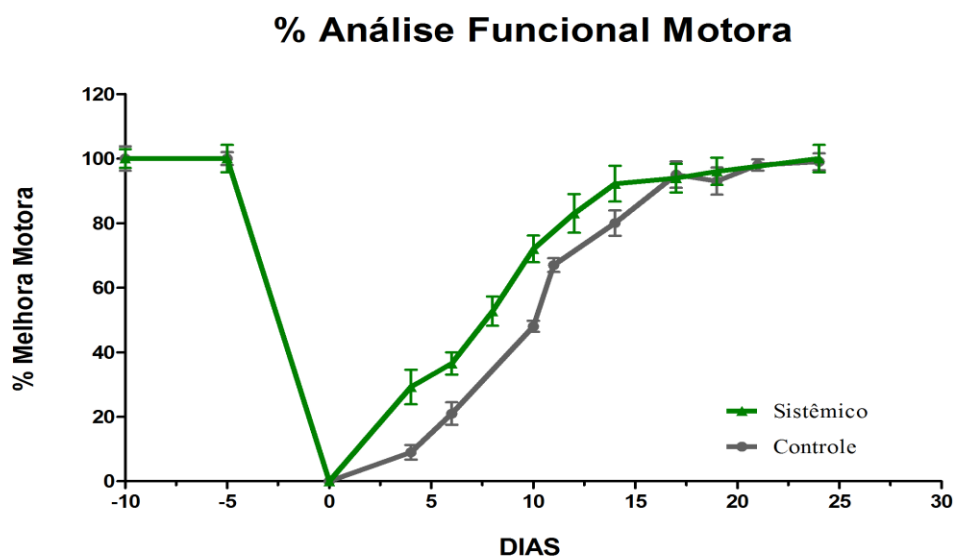


Gráfico 5: Gráfico representando a melhora funcional do grupo tratado com células progenitoras GFP da medula óssea via sistêmica (linha verde) em comparação com o grupo controle não tratado (linha cinza). (média $\pm$ S.E.M.; $n = 4-9$; $p < 0,001$ por *Nonlin fit test*).

Observa-se uma diferença na distância entre os três dedos do meio do camundongo axotomizado tratado via sistêmica, mais abertos a partir do sexto dia quando comparado com o padrão dos dedos do camundongo axotomizado controle não tratado (Figura 11). Nota-se que após a lesão do nervo isquiático, a sequência de recuperação motora foi acelerada, nos primeiros dias, pelo tratamento com células progenitoras GFP da medula óssea.

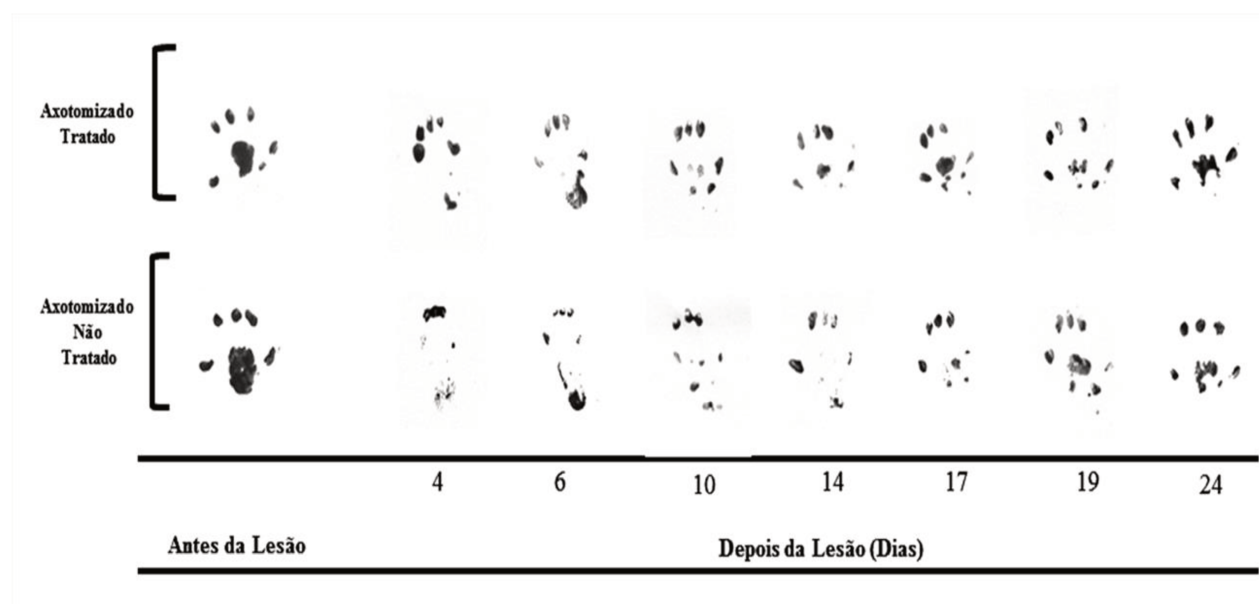


Figura 11: Teste de caminhada – Impressão da pata esquerda traseira antes e depois da lesão do nervo isquiático. Amostra da recuperação motora da pata de camundongo tratado com células progenitoras GFP via sistêmica na primeira linha (Axotomizado Tratado) e de camundongo não tratados controle na segunda linha (Axotomizado não Tratado).

A maior diferença se deu no início dos primeiros quatro dias, em que a significância foi evidente no grupo axotomizado tratado via sistêmica, atingindo 224,9 % de melhoria que excedeu o grupo axotomizado controle sem tratamento (Gráfico 6). Esta diferença foi reduzida com a progressão da melhora funcional até o décimo quarto dia, onde não houve mais diferença significativa entre os grupos até o vigésimo quarto dia, mostrando, assim, a importância da terapia celular nos primeiros dias de lesão.

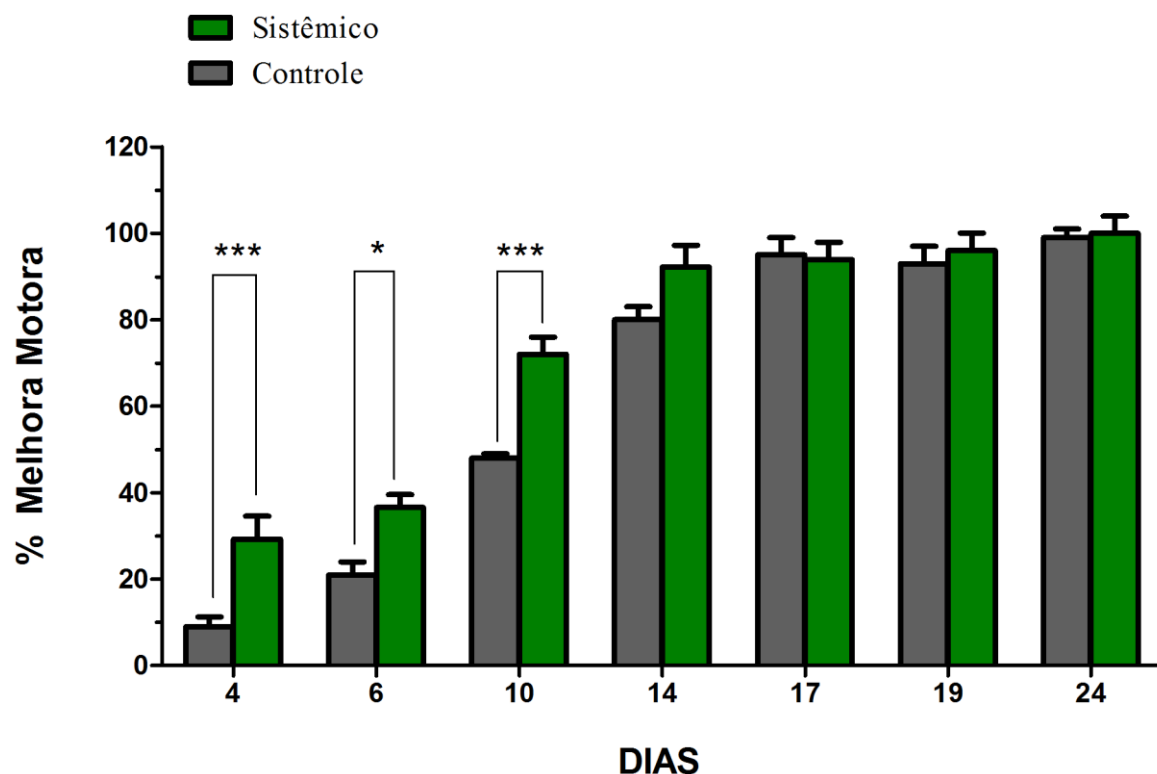


Gráfico 6: Gráfico comparativo do desempenho funcional dos grupos em tempos isolados: Tratados via Sistêmica (verde) e não tratados controle (cinzas). (média $\pm$ S.E.M.; $n = 4-9$; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ por Teste 2 way ANOVA).

4.5.2. Teste de pista CatWalk

Análises funcionais realizadas com o teste de pista de caminhada CatWalk verificou a recuperação motora de um grupo axotomizado de animais com tratamento celular via local, e, comparou-o com os grupos dos animais axotomizados tratados via sistêmica e controle. Observou-se a funcionalidade das patas lesionadas ao qual indiretamente proporcionou a observação da regeneração e recuperação da atividade do nervo isquiático. As curvas correspondem ao grupo dos animais tratados via local (linha marrom) e via sistêmica (linha verde) (Gráfico 7). Estes se mantiveram superiores, em termos de funcionalidade, quando comparado com a curva do grupo dos animais controle (linha cinza), desde o início até o vigésimo quarto dia, quando foram igualadas. Já

a curva correspondente ao grupo dos animais tratados via local em comparação com o grupo dos tratados via sistêmica não demonstraram diferença significativa.

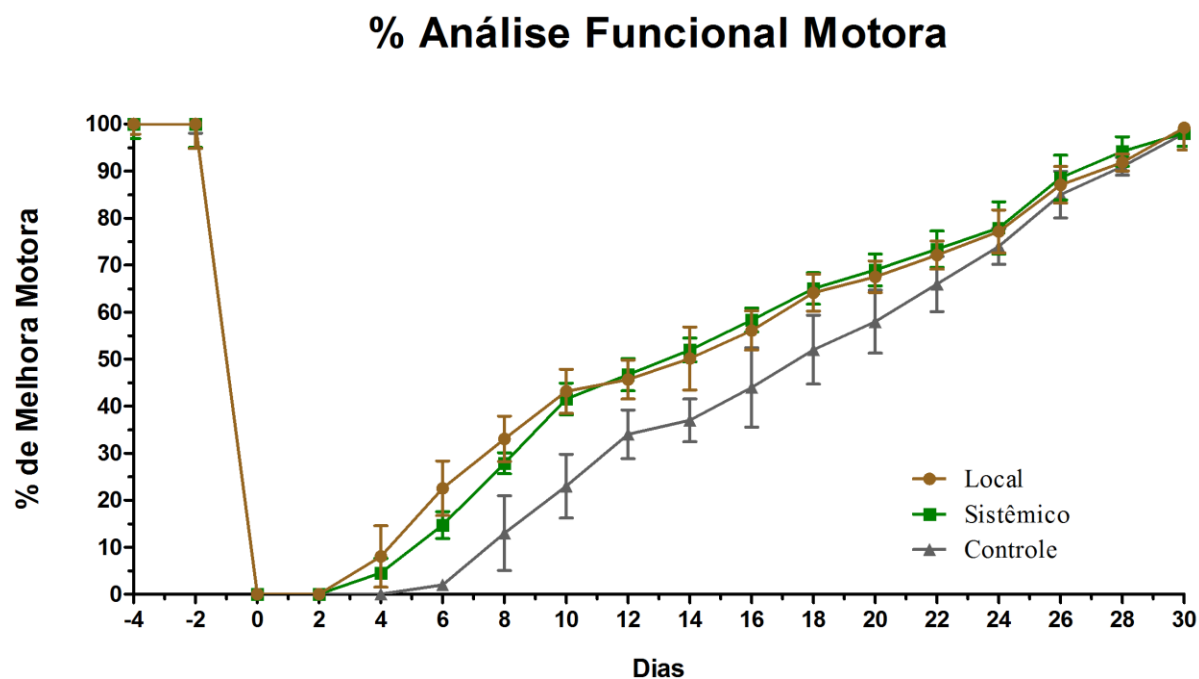


Gráfico 7: Gráfico comparativo do desempenho funcional dos grupos tratados com células progenitoras GFP via local (linha marrom) e via sistêmica (linha verde) em comparação com o grupo controle não tratado (linha cinza), (média $\pm$ S.E.M.; $n = 25$; $p < 0,05$ por *Nonlin fit test*).

5. DISCUSSÃO

A terapia celular nos dias de hoje está dando muita ênfase ao uso terapêutico de células tronco mesenquimais, devido ao seu grande potencial de diferenciação e sua capacidade de moderar processos inflamatórios no organismo (DEVINE *et al.*; 2000). No entanto, devido a seu pequeno número encontrado nos tecidos do organismo, sua utilização se torna bastante onerosa em termos financeiros, trabalho e tempo de obtenção destas células até sua viabilidade para tratamento. Para produzir doses de células clinicamente relevantes, a expansão destas células necessita estar em conformidade com as boas práticas de fabricação (GMP). No entanto, a falta de padronização e harmonização parece dificultar seu rápido progresso de expansão. A maioria dos protocolos ainda usa soro bovino fetal (FBS) para expandir as MSCs o que acarreta para as condições de cultivo uma alta variabilidade celular de lote para lote e risco de contaminação. Estas variações celulares são chamadas de xenogênicos-livres. Desta forma, meios quimicamente definidos é a última conquista em termos de padronização. Estes meios, no entanto, precisam manter todas as características celulares e relevância terapêutica das MSCs. Por causa das variações celulares do FBS, o desenvolvimento de tais meios quimicamente definidos com uma composição ideal está apenas começando. Enquanto isso, os vários componentes derivados do sangue humano estão sob investigação, incluindo, plasma, soro, soro do cordão umbilical, plaquetas e plaquetas lisadas (KINZEBACH *et al.*; 2013).

Por tanto, para tornar o tratamento de lesões acometidas no sistema nervoso periférico mais próximo da realidade clínica no dia a dia da medicina, propomos neste trabalho a terapia celular a partir de uma fração de células GFP extraídas da medula óssea com uma vasta diversidade de células progenitoras. A fração aqui utilizada contém uma porção ao redor de 74,62% de células indiferenciadas em vários graus de diferenciação tendo, nesta porção, uma grande quantidade de células mononucleares (45,60%) e de granulócitos (54,40%). Os granulócitos foram aqui adicionados com o intuito de verificar se de alguma forma participam do processo regenerativo e

se sua atividade influenciaria no processo de recuperação promovido pela terapia celular, uma vez que os resultados confirmaram que foram tanto a porção mononuclear quanto a porção de granulócitos da medula óssea que migraram para o local da lesão.

Nas análises histológicas, verificou-se que houve a migração das células GFP para os nervos lesionados tratados, comprovando que o esmagamento causado no nervo, possibilitou o surgimento de uma região preferencial e específica de migração destas células, à região de lesão. Isto sugere a ativação de um processo de sinalização desta região no recrutamento das células progenitoras GFP da medula óssea através de uma quimiotaxia ao tecido lesionado. Esta resposta de quimiotaxia é uma característica importante das células tronco já conhecidos e que poderia justificar esta migração específica das células GFP ao local da lesão (STOLL *et al.*; 1989; RUTKOWISK *et al.*; 1999). O principal mediador para o tráfego de células tronco no corpo são as quimiocinas inflamatórias específicas cujo aumento da concentração promove o processo de diapedese destas células e as encaminha para a área lesionada. As quimiocinas SDF1 (CXCL12) e CXCR4 são moléculas de sinalização conhecidos por estar envolvidos neste processo (BHAKTA *et al.*; 2006), que justificaria o sucesso da terapia celular por via sistêmica. Essas quimiocinas tem sido observadas em muitos casos, como em infarto do miocárdio (BROOKE *et al.*; 2007), em lesão renal (CHAMBERLAIN *et al.*; 2007), lesão cerebral (JOYCE *et al.*; 2010) entre outros estudos. Isto pode indicar que este processo de sinalização celular e comunicação celular têm ajudado na melhora observada aqui neste estudo, no entanto, testes mais específicos são necessários para confirmar provável hipótese.

A presença das células injetadas na estrutura dos nervos lesionados em processo de diapedese com quatro dias após o tratamento, evidenciado pela lamellipodia (prolongamentos para locomoção celular indicativos de células migratórias), corrobora com estudos que mostraram que as células infundidas na circulação periférica têm a habilidade de migrar para sítios específicos de

injúria (SHAKE *et al.*; 2002; WANG *et al.*; 2002; BHAKTA *et al.*; 2006; BROOK *et al.*; 2008; CHAMBERLAIN *et al.*; 2007; JOYCE *et al.*; 2010. Foi descartada a possibilidade de rejeição dos animais para com as células GFP injetadas, visto que os animais que as receberam, eram do mesmo fundo genético da linhagem dos doadores, considerando assim a simulação de um tratamento autólogo. Percebeu-se que nos primeiros dias após o esmagamento do nervo isquiático (quatro dias), foi considerável a presença de células GFP da medula óssea. Com quatorze dias, houve uma diminuição grande da quantidade destas células no local da lesão até sua total ausência no final de trinta dias, indicando a não participação estrutural destas na regeneração do tecido nervoso (Figura 6). Ou seja, nenhuma célula GFP positiva foi encontrada após a regeneração total do tecido nervoso, o que seria esperado caso estas células tivessem se diferenciado em algum tipo celular estrutural, uma vez que o transgene GFP presente nestas células responde a expressão de um promotor ubíquo que estaria ativo nos diferentes tipos celulares encontrados no tecido nervoso, onde mesmo diferenciada as células expressariam a proteína fluorescente. Indicando por tanto a não diferenciação celular destas células, sugerindo uma ação parácrina destas na regeneração do tecido principalmente no momento inicial de recuperação da lesão, provavelmente atuando na estimulação de células intrínsecas ao tecido, no recrutamento de outras células que possam se modificar e por sua vez participar estruturalmente na regeneração (STOLL *et al.*; 1989; RUTKOWISK *et al* 1999; ZOCHODNE *et al.*; 2008). Assim como, através de mecanismos como o sequestro de radicais livres, na modulação da atividade inflamatória e na atividade anti-apoptótica, promovendo a preservação funcional neural, porém tais situações precisariam ser mais bem investigadas (DE MEDINACELI *et al.*; 1982; HIROUCHI *et al.*; 2002). Desta maneira, consegue-se assegurar a sobrevivência das células nervosas danificadas auxiliando numa regeneração inicial acelerada e assim promovendo uma melhor recuperação tecidual (STOLL *et al.*; 1989; FAWCETT *et al.*; 1990; SIX *et al.*; 2003;

SAMII *et al.*; 2003; CHEN *et al.*; 2007). Todas estas hipóteses de como o processo regenerativo ocorreu precisam ser testadas em experimentos futuros para melhor entender o mecanismo de ação destas células.

As células GFP da porção mononuclear e da porção de granulócitos da medula óssea participaram do processo de regeneração no início do processo inflamatório, uma vez que estas células foram apenas encontradas até o décimo quarto dia de tratamento. Isso indica que a participação primária das células medulares na regeneração do nervo lesionado é de crucial importância para o sucesso da regeneração. Tanto os resultados de análise de fluorescência quanto os resultados de análise funcionais mostraram claramente a maior participação das células injetadas, principalmente na fase aguda da inflamação, mostrando que o fator temporal é importante para o sucesso do tratamento deste tipo de lesão com terapia celular, principalmente pela participação parácrina destas células que podem ter períodos cruciais para efetivação e interferência da sinalização no local da lesão promovendo o sucesso deste tipo de terapia.

Neurônios axotomizados induz o aumento da expressão de receptores de baixa afinidade como p75NTR que se ligam a fatores de crescimento de nervo (NGF) e ajudam a controlar a sobrevivência neural (FRANÇA; 2007). Devido a isso, a expressão de p75NTR foi mensurada em três grupos de camundongos, sendo grupo não axotomizado (sem lesão do nervo isquiático), grupo axotomizado (com lesão do nervo isquiático) tratado com células progenitoras GFP da medula óssea e grupo axotomizado controle (sem tratamento), após cinco dias de lesão do nervo. O grupo tratado via sistêmico apresentou diferença significativa entre o grupo não tratado controle e entre o grupo não axotomizado. Mesmo o grupo axotomizado controle apresentou uma diferença significativa quando comparado ao grupo não axotomizado. Isto demonstra que o grupo tratado via sistêmica teve uma presença de proteína p75NTR maior que o grupo controle no auxílio da sobrevivência neuronal.

Já 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. (Bear et al., 2008; Nolte, 2008) e por isso sua expressão também foi mensurada para avaliar a quantificação destas estruturas entre os mesmos três grupos de camundongos após cinco dias submetidos à axotomia por esmagamento do nervo isquiático. Assim os três grupos não demonstraram significativa diferença entre a expressão de neurofilamento, corroborando com os resultados obtidos por Zanon e colegas, em 2010, onde camundongos que sofreram axotomia por esmagamento do nervo isquiático não apresentaram diferença quantitativa significativa de neurofilamento. Estes resultados mostram que não houve variação quantitativa na estrutura de neurofilamentos dos nervos com lesão por esmagamento tanto nos grupos axotomizados tratado e controle quanto no grupo não axotomizado.

Analisando o processo de degeneração e regeneração nervosa depois de dez dias do esmagamento unilateral dos nervos isquiáticos, os camundongos C57BL/6, do grupo tratado com células progenitoras GFP da medula óssea e do grupo controle sem tratamento, foram sacrificados e os nervos isquiáticos processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e posterior contagem dos axônios degenerados e mielinizados. Durante análise ultraestrutural, podemos observar que houve diferença estatística significativa entre os dois grupos tanto para axônios mielinizados, quanto para axônios degenerados mostrando que o grupo axotomizado tratado teve maior quantidade de axônios mielinizados e menor quantidade de axônios degenerados comparado com o grupo axotomizado controle não tratado.

Na análise funcional em caminhada de pista de papel entre o grupo tratado e não tratado com células progenitoras GFP da medula óssea, observou-se uma melhora significativa do grupo tratado com relação ao grupo controle com aumento de 224,9% de melhora no quarto dia quando comparados aos camundongos com o isquiático lesionado sem tratamento. Esse aumento foi

ainda de 73,9 % no sexto dia. No décimo dia o grupo tratado obteve uma melhora de 50 %. Já no décimo quarto dia até o final da análise a diferença na melhora não foi mais estatisticamente relevante (Gráfico 5). Esse resultado coincide com a presença das células GFP (Figura 6), que nos primeiros dias migraram para o local da lesão em grande quantidade, quando houve grande melhora funcional dos camundongos. Com o passar dos dias, a presença das células GFP foi diminuindo o que também coincidiu com uma melhora mínima na análise funcional dos mesmos. Inferindo assim a ação destas células no processo de melhora funcional destes animais tratados.

Já análises funcionais realizadas com o teste de caminhada de pista *CatWalk* verificou a recuperação motora do grupo axotomizado tratado via local, ou seja, administração da fração de células progenitoras GFP da medula óssea diretamente no local da lesão durante o procedimento cirúrgico, e comparou-o com os grupos de animais axotomizados tratados via sistêmica e controle (Gráfico 7). Observou-se a funcionalidade das patas lesionadas ao qual indiretamente proporcionou a observação da regeneração e recuperação da atividade do nervo isquiático. A melhora funcional dos animais tratados via local e via sistêmica foram superiores quando comparado com a curva do grupo dos animais controle, desde o início até o vigésimo quarto dia, quando foram igualadas. Já entre os grupos tratados via local e via sistêmica não mostraram diferença significativa demonstrando que tanto o tratamento via sistêmica quanto via local favorecem a regeneração nervosa e consequente reabilitação motora logo nos primeiro dias pós-lesão e tratamento.

6. CONCLUSÃO

6.1. Conclusão final

Neste trabalho, provamos a eficácia e a segurança de um protocolo simples, utilizando uma fração heterogênea de células da medula óssea na regeneração de nervo isquiático de camundongos, especialmente quando o tratamento é feito na fase inicial da lesão.

6.2. Conclusões específicas

- A fração de células progenitoras GFP da medula óssea contendo uma diversidade de células em vários estágios de diferenciação demonstrou sucesso na participação regenerativa do nervo isquiático.
- A recuperação funcional dos camundongos tratados com o nervo isquiático lesionado, tanto via sistêmica quanto via local, foi mais evidente nos primeiros dias após o tratamento celular quando comparado com os camundongos lesionados controles, demonstrando a importância do tratamento pós-lesão nesse período.
- A quantidade de células GFP encontradas no sítio da lesão do grupo tratado via sistêmica coincidiram com os valores de melhora funcional e maior expressão de p75NTR no início da recuperação neuronal, inferindo a presença das células injetadas à necessidade de melhora do nervo.
- A terapia celular promoveu melhor manutenção estrutural do axônio do nervo demonstrado 10 dias após cirurgia pela maior quantidade de axônios mielinizados e menor quantidade degenerados quando comparados ao não tratado.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muito tem sido estudada sobre uma fração celular ótima para a utilização em terapia celular, e o quanto a purificação é necessária. Isto inclui o número de células, e qual a melhor quantidade para a terapia, assim como a forma de administração, local e/ou sistêmica. Várias destas perguntas aumentam o rigor da escolha das células e do tratamento escolhida pela prática clínica e cirúrgica, aumentando também as dificuldades à sua aplicação. Neste trabalho, propomos (via sistêmica e local) um método simples de purificação e tratamento prático, seguro e eficaz, utilizando terapia celular na prática clínica. Estas células progenitoras da medula óssea têm sido utilizadas em transplantes de medula desde o final dos anos 1950 e por isso sua confiabilidade e efeitos desejados são seguros e claros. Por isso, nossos resultados levantam questões sobre qual o tipo de célula e sua quantidade necessária para o sucesso da recuperação do tecido lesionado, trazendo à tona algumas preocupações sobre o melhor tratamento celular. Respostas para estas questões podem sanar tais preocupações no que diz respeito à terapia com células-tronco em ensaios clínicos, como já foram discutidos (BROOKE *et al.*; 2008).

A recuperação funcional de camundongos com o nervo isquiático lesionado foi evidente durante os primeiros dias após o tratamento quando as células atingiram a melhora de 224,9% em comparação com os camundongos não tratados. Esta diferença diminuiu progressivamente após tratamento nos dias dez e quatorze, quando não houve nenhuma diferença significativa entre as amostras tratadas e não tratadas, demonstrando a importância do tratamento nos primeiros dias da lesão. A fração de células progenitoras da medula óssea continha uma diversidade de tipos de células progenitoras, em diferentes estágios de diferenciação, o que demonstra o sucesso da terapia, mesmo quando é utilizada quase que a fração completa de células progenitoras da medula óssea (contendo células inespecíficas, devido a pouca purificação). Esta fração de células progenitoras com pouca purificação reforça ainda mais a discussão de quanto às células mesenquimais se faz fundamental para o tratamento relacionado, questionando assim o quanto as

células auxiliares na terapia poderia desempenhar um papel central nos processos regenerativos do corpo, como se é demonstrado apenas pelas MSC.

Os procedimentos descritos neste trabalho foram usados para melhorar a funcionalidade do nervo isquiático lesionado, especialmente quando o tratamento é feito rapidamente. A utilização de células progenitoras da medula óssea no tratamento de lesões do nervo isquiático “purificada grosseiramente” é um tipo simples e eficaz de terapia celular e poderá tornar-se uma alternativa adicional para o tratamento da lesão do nervo periférico. Dada à simplicidade deste tipo de terapia, supõe-se que pode ser incluído em procedimentos de “primeiros socorros” como em pacientes poli-traumatizados por acidentes, uma vez que a célula pode identificar a lesão e iniciar o processo de cura. Além disso, pode ser usado em outros processos prejudiciais, o que poderia ocorrer em cirurgias invasivas programadas. O trabalho clínico inicial seria extraí-los a partir da medula óssea do paciente, purificá-los, e apresentá-los sistemicamente num tempo razoável. Esta poderia ser uma alternativa promissora para pacientes recém-traumatizados, bem como uma opção para melhor sucesso do tratamento com procedimentos terapêuticos atuais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro. Elsevier. 2008. p. 66-71.
2. Bang OY, Lee SJ, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*. 2005; 58(4): 653–654.
3. Bear, MF. Connors, BW. Paradiso, MA. *Neurociências: Desvendando o sistema nervoso*. 3º edição. Porto Alegre: Artmed. 2008. p. 857.
4. Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Revasc Med*. 2006; 7: 19-24.
5. Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2007; 18:846–858.
6. Brooke G, Rossetti T, Ilic N, Murray P, Hancock S, Pelekanos R et al. Points to Consider in Designing Mesenchymal Stem Cell-Based. *Clinical Trials Transfus Med Hemother*. 2008; 35:279–285.
7. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997; 64(2): 278–294.
8. Burnet MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus*. 2004; 15;16(5):E1
9. Cantz T, Sharma AD, Jochheim-richter A, Arseniev L, Klein C, Manns MP et al. Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant*. 2004; 13(6): 659-666.

10. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007; 25:2739-2749.
11. Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW et al. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol*. 2007.; 204: 443–453.
12. Cheng FC, Sheu ML, Su HL, Chen YJ. The effect of exercise on mobilization of hematopoietic progenitor cells involved in the repair of sciatic nerve crush injury. *J Neurosurg*. 2013; 118(3): 594-605.
13. Cheng Z, Liu X, Ou L, Zhou X, Liu Y, Jia X et al. Mobilization of mesenchymal stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in rats with acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2008; 22: 363–371.
14. Chin SP, Poey AC, Wong CY, Chang SK, Teh W, Mohr TJ et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cell treatment is safe and feasible for severe dilated ischemic cardiomyopathy. *Cytotherapy*. 2010; 12(1): 31–37.
15. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol*. 2002; 1: 92-100.
16. Costa J, Camargo VM, André ES. Desenvolvimento de um método de baixo custo para avaliação da marcha em ratos. *Fisiot. Mov*. 2008; 21(2):115-123.
17. De Medinaceli L, Freed W.J., Wyatt R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982; 77: 634–643.
18. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cell in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2000; 7(6): 358-363.
19. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 1990; 13: 43–46.

20. Fernandes M, Valente SG, Fernandes MJ, Félix EP, Mazzacoratti MDA G, Scerni DA et al. Bone marrow cells are able to increase vessels number during repair of sciatic nerve lesion. *J Neurosci Methods*. 2008; 170: 16–24.
21. França GR. 2007. A apoptose e sua importância na fisiopatologia dos sistemas biológicos. 2007. <http://www.farmaceuticovirtual.com.br/html/guilherme.htm>.
22. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow: analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6(2): 230-247.
23. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966; 16(3): 381–390.
24. Gao SJ, Wei JC, Lu B, Shao DC, Li T, Chen JQ et al. Experimental research on repairing full-thickness articular cartilage defects by transplantation of autologous uncultured bone-marrow-derived mononuclear cells in combination with micro-fracture. *Chinese Med J*. 2012; 92(35): 2463-2466.
25. Grecco M, Leite V M, Albertoni WM, Santos JBG, Hirakawa CK, Faloppa F et al. Estudo da regeneração nervosa em nervos tibiais de ratos Wistar utilizando o Fluro-Gold® como marcador neuronal. *Acta Ortop Bras*. 2003; 11(4): 225-229.
26. Griffin JW, Pan B, Polley MA, Hoffman PN, Farah MH. Measuring nerve regeneration in the mouse. *Exp Neuro*. 2010; 223: 60.
27. Gupta ED, Nayyer N, Chin SP, Cheok CY, Cheong SK. Clinical safety and efficacy of autologous bone marrow mesenchymal stem cell injection for the treatment of severe osteoarthritis. *Inter J Rheumatic Disease*. 2010; 13(1): 40–43.
28. Hartung T. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*. 1995; 5(3): 221-225.

29. Hasegawa T, Kosaki A, Shimizu K, Matsubara H, Mori Y, Masaki H et al. Amelioration of diabetic peripheral neuropathy by implantation of hematopoietic mononuclear cells in streptozotocin- induced diabetic rats. *Exp Neurol*. 2006; 199: 274–280.
30. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992; 13(1): 81–88.
31. Hirouchi M, Ukai Y. Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2002; 120: 107-113.
32. Hu J, Li C, Wang L, Zhang X, Zhang M, Gao H et al. Long term effects of the implantation of autologous bone marrow mononuclear cells for type 2 diabetes mellitus. *Endocr J*. 2012; 59 (11): 1031-1039.
33. Huang X, Choi JK, Park SR, Ha Y, Park H, Yoon SH et al. GM-CSF inhibits apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptosis-related proteins. *Neurosci Res*. 2007; 58: 50–57.
34. Inserra MM, Bloch DA, Terris DJ. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery*. 1998; 18:119-224
35. Jeong JO, Kim MO, Kim H, Lee MY, Kim SW, Ii M et al. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation*. 2009; 119: 699–708.
36. Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury Int. J. Care Injured*. 2005; 36 Suppl 4: S24-29.
37. Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolta JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regenerative Medicine*. 2010; 5: 933–946.

38. Ju S, Teng GJ, Lu H, Jin J, Zhang Y, Zhang A et al. In vivo Differentiation of magnetically labeled mesenchymal stem cells into hepatocytes for cell therapy to repair damaged liver. *Investigative Radiology*. 2010; 45(10): 625–633.
39. Karp G. O Citoesqueleto e a motilidade celular. In Karp, G. *Biologia medular e molecular*: Edição 3°. Ed. Malone. Barueri S.P. 2005; p. 333-396.
40. Karp G. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos*. Edição 3°. Ed. Malone. Barueri S.P. 1999; p. 389.
41. Karussis D, Kassis I, Kurkalli BGS, Slavin S. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/ neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 2008; 265(1-2): 131–135.
42. Kawada H, Takizawa S, Takanashi T, Morita Y, Fujita J, Fukuda K et al. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation*. 2006; 113(5): 701-710.
43. Kinzebach S, Bieck K. Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Xenogenic-Free Culture Conditions. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013; 129: 33-57
44. Koda M, Nishio Y, Kamada T, Someya Y, Okawa A, Mori C et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice. *Brain Res*. 2007; 1149: 223–231.
45. Komine-Kobayashi M, Zhang N, Liu M, Tanaka R, Hara H, Osaka A et al. Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 6(3): 402-413.

46. Kopen GC, Prockop, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(19): 10711–10716.
47. Lee ST, Chu K, Jung KH, Ko SY, Kim EH, Sinn DI et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2005; 1058(1-2): 120-128.
48. Lent, R. Cem bilhões de neurônios. Conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 698.
49. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*. 2002; 59: 514-523.
50. Lopes-Filho JD, Caldas HC, Santos FC, Mazzer N, Simões GF, Kawasaki-Oyama RS et al. Microscopic evidences that bone marrow mononuclear cell treatment improves sciatic nerve regeneration after neurorrhaphy. *Microsc Res Tech*. 2011; 74: 355–363.
51. Mäkelä T, Yannopoulos F, Alestalo K, Mäkelä J, Lepola P, Anttila V et al. Intra-arterial bone marrow mononuclear cell distribution in experimental global brain ischaemia. *Scand Cardiovasc J*. 2013; 47(2): 114-120.
52. Marconi S. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Systemically Injected Promote Peripheral Nerve Regeneration in the Mouse Model of Sciatic Crush. *Tissue Eng*. 2012; 18(11- 12): 1264-1272.
53. Martins DM. Mononuclear cells in vii cranial nerve regeneration: experimental study. *Catarinenses Archive of Med*. 2009; 38(01).

54. Mnatsakanyan L, Ross-Cisneros FN, Carelli V, Wang MY, Sadun AA. Axonal degeneration in peripheral nerves in a case of Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *J Neuroophthalmol*. 2011; 31(1):6 – 11.
55. Monte-Raso VV. Índice funcional do isquiático nas lesões por esmagamento do nervo isquiático de ratos: Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores (Tese – Doutorado). Colégio Médico de Ribeirão Preto (SP). Universidade de São Paulo. 2006; 14(3): 133-136.
56. Mota ACA, Soares MBP, Santos RR. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do hematologista. *Ver Bras Hematol Hemoter*. 2005; 27(2):126-132.
57. Nicol GD, Vasko MR. Unraveling the story of NGF-mediated sensitization of nociceptive sensory neurons: ON or OFF the Trks? *Mol Interv*. 2007; 7:26–41.
58. Nolte J. Células do sistema nervoso. In: Nolte J. *Neurociência*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 1-11, 256.
59. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters*. 1997; 407: 313-319.
60. Orfão, A; Buitrago, JMG. Fundamentos de la citometria de flujo. In: Orfao A. Buitrago JMG. *La Citometria de flujo en el Laboratorio clínico*. Madrid: Soc Esp de Bioquí Clín y Pat Mol; 1995.11-50.
61. Orkin SH. Diversification of hematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*. 2000; 1: 57-64.
62. Pan HC, Wu HT, Cheng FC, Chen CH, Sheu ML, Chen CJ. Potentiation of angiogenesis and regeneration by G-CSF after sciatic nerve crush injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 382: 177–182.

63. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage Potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143–147.
64. Poulson R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol*. 2002; 197: 441-456.
65. Raap U, Wardlaw AJ. A new paradigm of eosinophil granulocytes: neuroimmune interactions. *Exp. Dermatol*. 2008; 17(9): 731-738.
66. Raheja A, Suri V, Suri A, Sarkar C, Srivastava A, Mohanty S et al. Dose-dependent facilitation of peripheral nerve regeneration by bone marrow–derived mononuclear cells: a randomized controlled study. *J Neurosurg*. 2012; 117: 1170–1181.
67. Rutkowski J L, Tuite G F, Lincon P M, Boyer P J, Tennekoon G I, Kunkel S L. Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol*. 1999; 101: 47-60.
68. Samii A, Carvalho GA, Samii M. Brachial plexus injury: factors affecting functional outcome in spinal accessory nerve transfer for the restoration of elbow flexion. *J Neurosurg*. 2003; 98: 307–312.
69. Schäbitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Schölzke MN et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2003; 34: 745-751.
70. Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*. 2005; 115: 2083-2098.
71. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002; 73(6): 1919-1956.

72. Six I, Gasan G, Mura E, Bordet R. Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 2003; 458: 327-328.
73. SoareS MBP, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Pontes-De-Carvalho L, Campos-De-Carvalho AC et al. Transplanted bone marrow stem cell repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Path.* 2004; 164(2): 441-447.
74. Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD. Wallerian degeneration I the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in treatment. *J Neurocytol.* 1989; 18(5): 671-683.
75. Sun Y, Chen L, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Sun L et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chinese Med J.* 2007; 120(9): 771–776.
76. Toth ZE, Leker RR, Shahar T, Pastorino S, Szalayova I, Asemenew B et al. The combination of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow-derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia. *Blood.* 2008; 111: 5544–5552.
77. Wang L, Li Y, Chen J, Gautam SC, Zhang Z, Lu M et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol.* 2002; 30(7): 831–836.
78. Weissman IL, Anderson DJ, Gage FH. Stem end progenitor cells: origins, phenotype, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17: 387-403.
79. Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotech.* 1996; 14: 1246-1251.
80. Zago MA & Covas DT. Células-tronco: A Nova Fronteira da Medicina. Ed.126. São Paulo: Atheneu. 2006; p-263.

81. Zanon RG, Cartarozzi LP, Victório SCS, Moraes JC, Morari J, Oliveira ALR. Interferon (IFN) beta treatment induces major histocompatibility complex (MHC) class I expression in the spinal cord and enhances axonal growth and motor function recovery following sciatic nerve crush in mice. *British Neuropat Soc.* 2010; 36, 515-534.
82. Zochodne DW. *Neurobiology of peripheral nerve regeneration*. New York: Cambridge Univerisity Press. 2008. p-44.

9. ANEXOS



CEUA/Unicamp

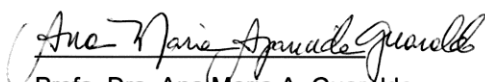
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

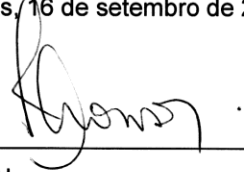
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Insights para simplificar o tratamento de lesão de nervo ciático com células da medula óssea injetadas via sistêmica - camundongos transgênicos C57BL/6-HETGFP/J/Unib machos e C57BL / 6 / j / Unib machos" (protocolo nº 2289-1(A)), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat / Renato Luiz Cursino Nicolielo, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 16 de setembro de 2013.

Campinas, 16 de setembro de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

Manuscript Number:

Title: Cell Therapy on Sciatic Nerve Injury: Insights on Simplification

Article Type: Research Paper

Keywords: Bone Marrow Cell; Sciatic Nerve Injury; Cell Therapy; Tissue Regeneration; Animal Model

Corresponding Author: Dr. Marcus A. F. Corat,

Corresponding Author's Institution: UNICAMP

First Author: Renato Nicolielo

Order of Authors: Renato Nicolielo; Mirian M Machado; Monique B Bonavita; Renata G Zanon; Gustavo F Simões; Adriana Duarte; Fabiano Ferreira; Alexandre Oliveira; Marcus A. F. Corat

Abstract: The present study aimed to show how effective was the treatment of acute injury of the sciatic nerve by cell therapy when used low-specificity cells fraction from bone marrow. For this purpose, transgenic male mice naturally marked with the Green Fluorescent Protein (GFP) were used as donors of heterogeneous population of BMC. Other strain with the same genetic background, without GFP expression, had crushed left sciatic nerve and then divided into treated with BMC and untreated. The treated group demonstrated migration of large amount of BMC to the injured sciatic nerve on the first days after crushing. Functional analysis by walking track test showed greatest improvement at the first days which was decreasing along further days. It has demonstrated successfully early treatment of crushed sciatic nerve with heterogeneous population of BMC.

Suggested Reviewers: Hung-Chuan Pan
hcpan2003@yahoo.com.tw

RAQUEL SALOMONE
raquelsalomone@yahoo.com.br

Satoshi Kuroda
skuroda@med.hokudai.ac.jp

Alane B Ramos
alane@biof.ufrj.br

Sushil K Haggardwal
doc.sushil.pgi@gmail.com

Francisco Moniche
pmoniche@gmail.com

Olivier Baud
olivier.baud@rdb.aphp.fr



State University of Campinas (UNICAMP)
Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB)
INTERNATIONAL COUNCIL FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE
ICLAS MONITORING / REFERENCE CENTER



December 12, 2013.

Re; Manuscript Submission.

Dear Editor,

The manuscript we are sending to Neuroscience Letters is a research article titled: **“Cell Therapy on Sciatic Nerve Crush Injury: Insights on Simplification”**. In this article we proposed an alternative view on the use of cell therapy with heterogeneous population of bone marrow cells (BMC) for the regeneration of the crushed sciatic nerve and observing how effective low-specificity cell therapy may be effective by using a simple and rapid way for treating acute nerve crush injury.

We will be able to supply any further information that is required.

Sincerely,

Marcus Alexandre Finzi Corat, PhD
Researcher of State University of Campinas- Brazil

Cell Therapy on Sciatic Nerve Injury: Insights on Simplification

Renato Luiz Cursino Nicolielo^a, Mirian Michelle Machado^a, Monique Bueno Bonavita^a, Renata Graciele Zanon^b, Gustavo Ferreira Simões^c, Adriana da Silva Santos Duarte^d, Fabiano Ferreira^e, Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira^c, Marcus Alexandre Finzi Corat^a.

- a. Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.
- b. Department of Human Anatomy, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.
- c. Department of Anatomy, Cell Biology, Physiology and Biophysics, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.
- d. Blood Center, College of Medical Science, State University of Campinas (UNICAMP) Campinas, SP, Brazil.
- e. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Corresponding Author

Marcus Alexandre Finzi Corat

E-mail: marcus@cemib.unicamp.br

Address: Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB), University of Campinas (UNICAMP)- Rua 5 de junho, 230- Cidade Universitária- Barão Geraldo - 13083-877- Campinas- SP- Brazil

Phone:+55-19-35217564

Abbreviations:

Bone marrow-derived cell – BMC
Green Fluorescent Protein – GFP
Mononuclear cells – MNC
Mesenchymal cells – MSC
Granulocyte colony-stimulating factor - G-CSF
Fluorescence-activated cell sorting - FACS

Introduction

Traumatic injury of peripheral nerves at all ages [1] have been studied, in an attempt to understand the process of post-repair injury. This results in a significant reduction of time for recovery in debilitating neuropathic pain [2]. Despite advances in surgical techniques, functional results have been disappointing, in that they depend on the time interval between the injury and treatment. Due to advancement of scientific knowledge, cell therapy has become better at improving nerve regeneration, and increasing the success of nerve repair [3].

The use of pluripotent cells taken from adult tissue does not involve the same ethical and religious matters as seen with the use of embryonic stem cells, especially those taken from bone marrow. The ease of obtaining and purifying them opens up new horizons in cell therapy, making it possible to use autologous treatment, which would also decrease the possibility of immune rejection responses [4].

A population of cells obtained from a bone marrow puncture; mononuclear cells (MNC) is consisting mostly of precursor cells of some cell groups. Along with hematopoietic stem cells (HSC) at different degrees of differentiation; this gives rise to blood cells, and endothelial progenitor cells (EPC), involved with the process of angiogenesis and endothelial protection. In very small amounts, mesenchymal stem cells (MSC) is the best pluripotent cell among them [5]. MNC have demonstrated an increase in the rate of regeneration of neuronal cells, leading to clinical improvement of nerve and spinal cord injury [6].

The MSC has been used in cell therapy, being a group of multipotent cells that can be isolated from many tissues in the body by specialized purification. The MSC has gained popularity due to their ability to self-renew and differentiate into many different cell types [7]. They have also been reported to transdifferentiate into ectodermal [8] and endodermal cells [9]. Moreover, MSC has been applied clinically in patients with very encouraging results [10,11]. The therapeutic potential of them is strong, primarily for its power of differentiation. However, use in therapy is expensive due to a reduced number of them in tissue. Purification and production depends of long-term culture for obtaining enough cells to be used in treatment. For autologous therapies, dependent on rapid treatment in the acute phase of the lesion, it is practically impossible to use MSC, requiring alternative protocols that are quicker, cheaper, and yet still efficient.

On the other hand, Cheng and collaborators [12] demonstrated that bone marrow cells mediated by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilized to a mean site of injury in rat sciatic nerve, and participated in its regeneration. Another experiment with G-CSF has demonstrated potential for angiogenesis and regeneration after sciatic nerve injury [13]. Despite some evidences of your efficacy, those polymorphonuclear cells (PMN) are usually depleted of cell therapy [14].

Many protocols are found at literature encouraging for increasingly the purification or specificity of cells types used on cell therapy, showing efficacy of treatment. However, which fraction of cells type is the best for therapy is still undetermined. All of these processes of purification drive through getting specific cell sample for therapy, but most of times, it keeps the process away of the practicality and concerns about safety.

In this work we analyzed how effective was the treatment of acute injury of the sciatic nerve by cell therapy when used low-specificity cells fraction from bone marrow.

Materials and Methods

Animals.

All animals in this study were provided by CEMIB / UNICAMP with SPF status. The animals used were treated in accordance with Ethical Principles for Animal Research, established by the Brazilian College for Animal Experimentation (CONCEA), according to Brazilian legislation n°11794.

We used transgenic mice, C57BL/6-HETGFP/J/Unib males at six to eight weeks, with their cells naturally marked with the Green Fluorescent Protein (GFP) as donors of BMC (n=10), and other strain with the same age and genetic background without GFP, C57BL/6/j/Unib for nerve injury. These mice had crushed sciatic nerve, and were divided into two groups: treated with BMC and no-treated, which were used for fluorescence images (n=5), and walking track analysis (n=10/each group).

Experimental Design

We crushed the left sciatic nerve of animals to cause a motor lesion, and then, monitor their recovery process under cell therapy. We used cells from heterogeneous populations of bone

marrow (BMC) labeled with GFP; to enable traceability in the tissue. Then, by walking track test we measured motor recovery by animals' sciatic functional index (SFI) and we made a comparative analysis between the treated and untreated groups.

Sciatic Nerve Crush.

C57BL/6 were anesthetized via the intraperitoneal with a xylazine solution (Xylasin, Köning, 10 mg/kg) and ketamine (Cetamin, Fort Dodge, 50mg/kg) in distilled water (1:1:3). After anesthesia, the trichotomy in the left thigh was made, and the surgical incision approximately 1.5 cm long was performed parallel to the femur of the animal. Fascia and muscle were retracted for nerve exposure. First, the crushing was performed for 10'' at the piriformis muscle level, using jeweller's forceps in a standard manner for all animals. Sequentially, to enlarge the area of injury, hemostat forceps were twice used in the same location for 10'' of compression. The muscle and subcutaneous tissue were returned, and then the skin was properly sutured. After this procedure, fractions of GFP BMC were intravenously injected in retro-orbital plexus in the treated group at a concentration of 3×10^6 cells per animal and only DMEM for control.

BMC Extraction.

The animals were sacrificed by cervical dislocation, the femur and tibia extracted, and bone marrow was extracted with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cultilab)).

This cell solution was carefully purified through Histopaque gradient solution with a density of 1.098 g/mL, obtained by mixing HISTOPAQUE® -1119 (Sigma) and HISTOPAQUE® -1077 (Sigma) (1:1) by centrifugation to 15 min (2100 x g and 4°C). The cells was collected and rinsed twice in DMEM medium with centrifugation to 10 min (1250 x g and 4°C). The cells were resuspended in 1 mL DMEM, quantified, and checked for cell viability with trypan blue 0.1% (w/v) (Life Technologies).

In specific migration analysis we separated two fractions of BMC: granulocytes and MNC. It was done according to the manufacturer's suggested protocol for getting both fractions separately.

BMC Phenotype.

An aliquot of the solution of BMC from extraction on density 1.098g/mL was assessed with scattered light in flow cytometer (FACSCalibur-Becton-Dickinson), measuring their granularity.

Another aliquot was assessed with fluorescence-activated cell sorting (FACS) in flow cytometer by labeling specific antibodies to the following markers: CD14, CD44, CD45, CD71, and Sca-1. Adequate cell gates were isolated and the content quantified.

Walking Track Test.

Performance tests were conducted with three repetitions in all animals from both groups (n = 10/each); this was done at the beginning about 10 days in the preoperative period. After surgery, performance tests were done for 28 days (3 times/week). Functional evaluations were performed using the walking track test. The back paws were identified with non-toxic ink (Nankin) and the animal on this platform recorded their footprints. These were digitized, and their dimensions were measured as proposed by De Medinaceli et al. (1982) [15]. The rate of recovery for sciatic nerve was analyzed by the sciatic functional index (SFI): $SFI = 118.9 ((ITS-NTS)/NTS) - 51.2 ((IPL-NPL)/NPL) - 7.5$. (I = injured side; N = normal side; TS= toe spread; PL= print length).

Fluorescence Images.

The samples were cut on cryostat at 7 μ m of thickness, and then, on the slides, covered with a solution of 300 nM 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate (DAPI) for nuclear staining along with a coverslip. After 5 min, they were observed with a fluorescence microscope model, DM-5000B LEICA CPU: CPR5000 used an excitation filter model BP490/20 at a wavelength of 490 nm (green), BP405/10 in lengths of 405 nm (blue), and visible light for a morphology check of the tissue.

Statistical Tests.

Statistical analyses were performed with the Graphpad Prism 5 Program, where samples were examined by statistical tests, using a nonlinear regression curve fit for comparison function; this showed the functional recovery of treated and untreated mice and with the 2way ANOVA we used to compared all measured time points. Significant results was considered $p < 0.05$.

Results

Cells Phenotype.

In order to determine the phenotype of cells used for treatment, we performed a separate quantitate assessment on the fraction of cells, depending on its granularity (Fig. 1A). It was 45.60% for MNC and 54.40% for granulocytes (Fig. 1B). Moreover, the cell fraction was relatively quantified to check cell's specific markers (Fig. 1C). In general they indicated the prevalence of hematopoietic cells corresponding mainly to progenitor cells from bone marrow. Most of them were found in intermediated levels of differentiation, showing few cells with lower or higher degree of differentiation (Fig. 1D).

FIGURE 1

GFP Cells Migration.

We checked the presence or absence of GFP cells (green) along regeneration process of the nerve, as well as the organization of the nerve tissue (Fig. 2).

We observed GFP cells along the left injured sciatic nerve (Fig. 2A-D), but this was not observed in the corresponding right uninjured nerve (not shown data). This showed the specificity of cell migration to injured tissue. In more detail, the presence of lamellipodia at the cells was shown, demonstrating the migratory character of these cells (red head arrow in Figure 2A - detail). The amount of GFP cells were clearly decreasing along of nerve recovery until 30 days when we did not see them anymore (Fig. 2E and F). Besides, we confirmed the migrated cells should belong to both fraction (MNC and granulocytes) (Fig. G –J). In the overlapping, we followed progressive nuclear and morphologic tissue re-orientation along to recovery, toward organized tissue presented at 30 days.

FIGURE 2

Functional Paw Recovery.

Functional analyses were performed with the walking track test to verify motor recovery of animals (Fig.3A). Then, we observed functionality of the injured paws thus indirectly observed regeneration and activity recovery of the sciatic nerve. This analysis showed significant improvement of treated group that was more accentuated in the first few days from the beginning up to day 18th, when they were equalized (Fig.3B). At the first 4 days, their significance reached 224,9% higher than untreated group. This difference was decreased along of nerve recovery until day 14th (Fig. 3C), showing the importance of cell therapy in the early days of injury.

FIGURE 3

Discussion

Nerve regeneration can often fail, in cases with proximal nerve injury, axonal loss, or chronic insults; the recovery should progress quickly while avoiding irreversible neuronal loss [16]. Immature cell transplantation for treatment of neuronal injury is a growing field in regenerative medicine, with great focus in the scientific community. Much of the processes to get these cells keep the treatment away of the practicality, and a lot of times concerns about safety. Then, simple and safe processes to achieve cell therapy successfully are relevant.

In this work, we showed the effectiveness of the treatment of injuries of sciatic nerve with a fraction of BMC with a wide variety of progenitor cells. There are a lot of issues concerning cell therapy and cell types for regenerative medicine. Here, we did not concern how regenerative process on sciatic nerve happened, but an alternative way for treatment of peripheral nerve injury.

We used a fraction of 3×10^6 of BMC in treatment contained only 2.3% of primary progenitor cell and approximately 75% of undifferentiated cells at varying levels of differentiation and granularity. It presented of large numbers of hematopoietic cells with a small number in advanced levels of differentiation (Fig.1). Our aliquot contained mixed cells population that has been used for cell therapy so far, but in lesser amount of each.

Nowadays it emphasizes the therapeutic use of MSC, along with its potential for differentiation and its ability to moderate inflammatory processes in the body [17]. However, due to the small number of MSC found in body tissues, it involves finance, labor, and time to obtain

viability of these cells for fast treatment. Although feasible, most of the time it involves culturing for several weeks before transplantation, thereby increasing the risk of contamination and delays at the start of treatment beyond the acute phase: at this point, it may be more successful in was demonstrated here. Moreover, the cultivation of these cells in vitro, outside their natural environment, can result in cytogenetic changes in reliability and integrity. Because of this, several samples of human blood are under investigation, including plasma, serum, umbilical cord serum, and platelets lysed for development of safer protocols [18].

On the other hand, the MNC fraction from bone marrow has become safe source for this type of treatment. They are hematopoietic progenitor cells with varying levels of differentiation, including MSC in small quantities [19]. Recent experiments with bone marrow MNC in mice models of sciatic nerve transection (axotomy) suggest its beneficial role in nerve regeneration [6].

Beyond MNC, here we did not deplete granulocytes, we kept them of great amount (54,4%). Despite that granulocytes can stimulate the inflammatory process through the release of histamines and leukotrienes, studies with granulocyte precursors and G-CSF demonstrated that these cells have an important role in the central nervous system and numerous neurological processes [20]. At the beginning, the granulocytes by G-CSF stimulation indicated a direct (potential) protective effect on brain cells [21]. These mechanisms have possible beneficial effects, including a combination of anti-apoptotic activity in neurons [22], stimulating neurogenesis [22], systemic anti-inflammatory effects [22], and vessel formation [23].

The literature shows that the cells involved in tissue repair process have the ability to find the damage and assist in the healing process. The Figure 2 showed GFP cell migration to the injured sciatic nerves, revealing a specific migration of these cells to the lesion region, once the GFP cells were absent in opposite nerve that was not injured. This suggests an activating of chemotaxis response, since cells for treatment were injected by systemic way. This chemotaxis response is known characteristic of the stem cells [24]. The chemokines SDF1 (CXCL12) and CXCR4 are known signaling molecules to be involved in this process [25]. These might explain the cell migration observed in this study; however, more specific tests are needed to confirm this hypothesis.

Along with the healing process, in the early days after sciatic nerve crush (4 days), there was considerable presence of GFP cells in the lesion. The GFP cells decreased in the number at the site of injury along the recovery until they were completely absent at the end of 30 days,

indicating not involvement in structural formation of the nerve tissue (Fig. 2). The GFP transgene within these cells was expressed by ubiquitous actin promoter [26], which would be active in different cell types found in the nervous tissue; in this manner, it was expected that GFP fluorescent protein was expressed even in differentiated nerve system cells. No differentiated GFP cells have been found in regenerated fields, which suggested a paracrine action of BMC cells in tissue regeneration at initial time of recovery. They were likely stimulating the tissue's intrinsic cells, which would demonstrate them in structural cell tissue for building new tissue [24]. There is reported mechanisms such as scavenging free radicals, the modulation of inflammatory activity, anti-apoptotic activity, promoting neural functional preservation pathways that could explain it [15, 27].

We showed that the primary participation of these BMC fractions in recovery of the injured nerve was crucial for functional improvement on the regeneration process. Both the results of histologic analysis as well as the results of functional analysis clearly showed participation of the injected cells, mainly in the acute phase of inflammation: this also indicated a temporal factor for the successful cell treatment therapy for this type of injury.

A significant improvement of 224,9% was seen in the treated group compared to the control group after 4 days; this difference was still 50% on day 10, which decreased to day 14, when the difference in improvement was no more statistically significant (Figure 3C). This result coincides with the presence of a large number of GFP cells, which in the initial days migrated to the injured area, when there was significant functional improvement of the mice. As time passed, the presence of GFP cells also decreased, coinciding with a minimal improvement in a functional analysis of the same. This may reinforce the relation between the action of these cells and functional improvement of treated animals.

Conclusion

Much has been studied about the optimal cell population for use in cell therapy. This includes how much is best for injection, as well as the way of injection, whether local or systemic. In this study, we have shown BMC fraction with low specificity may improve the functionality of the injured sciatic nerve, especially when treatment is done quickly. It may address some questions for the design of cell therapy in clinical trials, which already have showed concern [15].

It becomes an additional alternative for the treatment of peripheral nerve injury. Given its simplicity, we hypothesize it might be included in "first aid" procedures for any polytraumatized accident patients or even in other damaging processes, which could occur in scheduled invasive surgeries, once the BMC have been early identified specifically on the injury and assisted the healing process.

Acknowledgements

We would thanks to foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP) and Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB/UNICAMP) for financial support.

References

- [1] J.W. Fawcett, R.J. Keynes, Peripheral nerve regeneration, *Annu Rev Neurosci* 13 (1990) 43–46.
- [2] A. Samii, G.A. Carvalho, M. Samii, Brachial plexus injury: factors affecting functional outcome in spinal accessory nerve transfer for the restoration of elbow flexion, *J Neurosurg* 98 (2003) 307–312.
- [3] J.D. Lopes-Filho, H.C. Caldas, F.C. Santos, N. Mazzer, G.F. Simões, R.S. Kawasaki-Oyama, M. Abbud-Filho, A.R. Oliveira, S.R. Toboga, A.G. Chueire, Microscopic evidences that bone marrow mononuclear cell treatment improves sciatic nerve regeneration after neurorrhaphy, *Microsc Res Tech* 74 (2011) 355–363.
- [4] A.C.A. Mota, M.B.P. Soares, R.R. Santos, [Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares – perspectiva do hematologista], *Rev Bras Hematol Hemoter* 27 (2005) 126-132. [Article in Portuguese].
- [5] A.J. Friedenstein, K.V. Petrakova, A.L. Kurolesova, G.P. Frolova, Heterotopic of bone marrow: analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues, *Transplantation* 6 (1968) 230-247.
- [6] A. Raheja , V. Suri , A. Suri , C. Sarkar , A. Srivastava , S. Mohanty , K.G. Jain , M.C. Sharma, H.N. Mallick , P.K. Yadav , M. Kalaivani , R.M. Pandey, Dose-dependent facilitation of peripheral nerve regeneration by bone marrow–derived mononuclear cells: a randomized controlled study, *J Neurosurg* 117 (2012) 1170–1181.

- [7] S.P. Bruder, N. Jaiswal, S.E. Haynesworth, Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J Cell Biochem* 64 (1997) 278–294.
- [8] G.C. Kopen, Prockop, D.G. Phinney, Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains, *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 10711–10716.
- [9] S. Ju, G.J. Teng, H. Lu, J. Jin, Y. Zhang, A. Zhang, Y. Ni, In vivo Differentiation of magnetically labeled mesenchymal stem cells into hepatocytes for cell therapy to repair damaged liver. *Investigative Radiology* 45 (2010) 625–633.
- [10] O.Y. Bang, S.J. Lee, P.H. Lee, G. Lee, Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients, *Ann Neurol* 58 (2005) 653–654.
- [11] S.P. Chin, A.C. Poey, C.Y. Wong, S.K. Chang, W. Teh, T.J. Mohr, S.K. Cheong, Cryopreserved mesenchymal stromal cell treatment is safe and feasible for severe dilated ischemic cardiomyopathy, *Cytotherapy* 129 (2012) 31–37.
- [12] Z. Cheng, X. Liu, L. Ou, X. Zhou, Y. Liu, X. Jia, J. Zhang, Y. Li, D. Kong, Mobilization of mesenchymal stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in rats with acute myocardial infarction, *Cardiovasc Drugs Ther* 22 (2008) 363–371.
- [13] H.C. Pan, H.T. Wu, F.C. Cheng, C.H. Chen, M.L. Sheu, C.J. Chen, Potentiation of angiogenesis and regeneration by G-CSF after sciatic nerve crush injury, *Biochem Biophys Res Commun* 382 (2009) 177–182.
- [14] C. Pösel, K. Möller, W. Fröhlich, I. Schulz, J. Boltze, D.C. Wagner, Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield, *PloS ONE* 7 (2012) e50293. doi:10.1371/journal.pone.0050293
- [15] L. De Medinaceli, W.J. Freed, R.J. Wyatt, An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks, *Exp Neurol*, 77 (1982) 634–643.
- [16] J.W. Griffin, B. Pan, M.A. Polley, P.N. Hoffman, M.H. Farah, Measuring nerve regeneration in the mouse, *Exp Neurol* 223 (2010) 60-71.
- [17] S.M. Devine, R. Hoffman, Role of mesenchymal stem cell in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 7 (2000) 358-363.

- [18] S. Kinzebach, K. Bieback, Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Xenogenic-Free Culture Conditions, *Adv Biochen Eng Biotechnol* 129 (2013) 33-57.
- [19] I.L. Weissman, D.J. Anderson, F.H. Gage, Stem end progenitor cells: origins, phenotype, lineage commitments, and transdifferentiations, *Annu Rev Cell Dev Biol* 17 (2001) 387-403.
- [20] J.G. Shake, P.J. Gruber, W.A. Baumgartner, G. Senechal, J. Meyers, J.M. Redmond, M.F. Pittenger, B.J. Martin, Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects, *Ann Thorac Surg* 73 (2002) 1919-1956.
- [21] M. Komine-Kobayashi, N. Zhang, M. Liu, R. Tanaka, H. Hara, A. Osaka, H. Mochizuki, Y. Mizuno, T. Urabe, Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice, *J Cereb Blood Flow Metab* 6 (2006) 402-413.
- [22] T. Hartung, Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor, *Curr Opin Hematol* 5 (1995) 221-225.
- [23] S.T. Lee, K. Chu, K.H. Jung, S.Y. Ko, E.H. Kim, D.I. Sinn, Y.S. Lee, E.H. Lo, M. Kim, J.K. Roh, Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia, *Brain Res* 1058 (2005) 120-128.
- [24] J.L. Rutkowisk, G.F. Tuite, P.M. Lincon, P.J. Boyer, G.I. Tennekoon, S.L. Kunkel, Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells, *J Neuroimmunol* 101 (1999) 47-60.
- [25] S. Bhakta, P. Hong, O. Koc, The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation, *Cardiovasc Revasc Med* 7 (2006) 19-24.
- [26] M. Okabe, M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi, Y. Nishimune, Green mice as a source of ubiquitous green cells, *FEBS Letters* 407 (1997) 313-319.
- [27] M. Hirouchi, Y. Ukai, Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia, *Nippon Yakurigaku Zasshi* 120 (2002) 107-113.

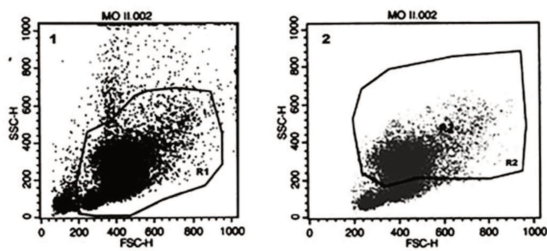
Figure Legends

Figure 1: BMC fraction phenotype. Relative quantification of granulocytes and MNC by determining the cell granularity through light scattering in flow cytometry (A1 and 2). The R2 area corresponded to the granulocyte fraction (gray) within the selected gate, and the remaining cells were MNCs (A2). Relative quantification of the BMC specifically marked (C and D).

Figure 2: Presence or absence of GFP cells in injured sciatic nerve after nerve crush surgery and cell treatment (A, C and E). Detail (A) showed the presence of lamellipodia, demonstrating the migratory character of these cells (red head arrow). Overlay images of sciatic nerve tissue showed the tissue organization and GFP cells into it (red arrows) (B, D and F). Presence of GFP cells from fractions of granulocytes (G) and MNC (I). Auto-fluorescence of the GFP cells (green) were observed at 490 nm, cell nuclei staining with DAPI (blue) were observed at 402 nm, and contrasts in visible light with no staining were observed on fluorescence microscopy. Scale bar = 50µm.

Figure 3: Functional Paw Recovery. A – Footprints before and after nerve lesion for the treated and untreated groups. B- demonstrated the functional improvement of the group treated with BMC (black line) compared with the untreated group (gray line). (mean $\pm$ SEM; * $p < 0.05$). C- demonstrated the motor improvement rate of the treated group higher than untreated group.

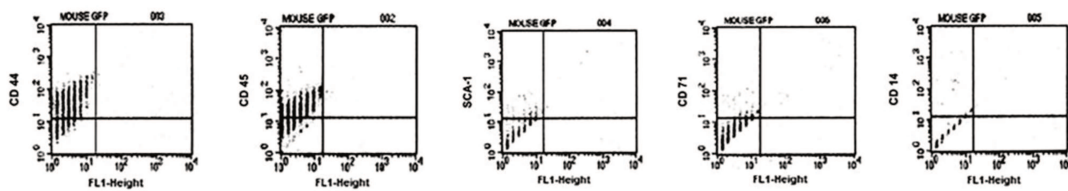
A Phenotyping of the Injected Cell's Fraction by Granularity



B Phenotyping of the Injected Cell's Fraction

Cell's Fraction (%)	MNCs	Granulocytes
Granularity	45.6%	54.4%

C Phenotyping of the Injected Cell's Fraction By Specific Markers



D Relative Quantification of BMC

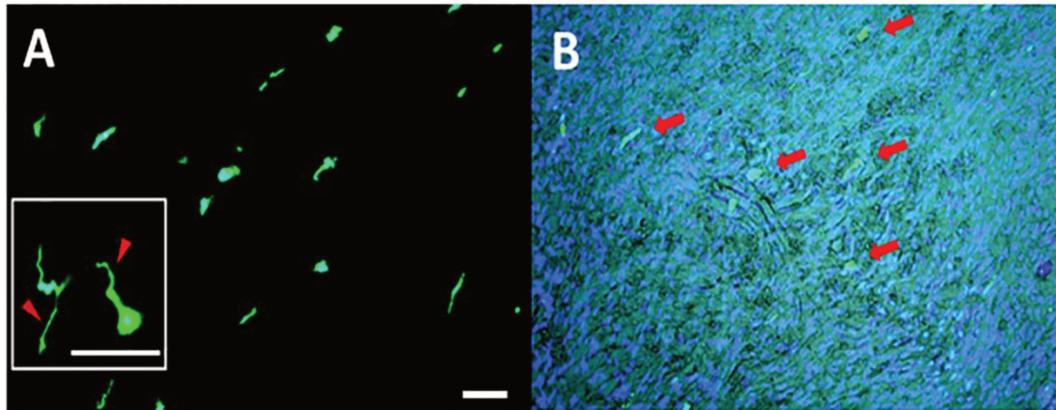
Specific Marker	CD 44	CD 45	SCA-1	CD 14	CD 71
BMC Cells (%)	74.95%	74.62%	2.29%	1.33%	3.39%

Bone marrow-derived cell (GFP)

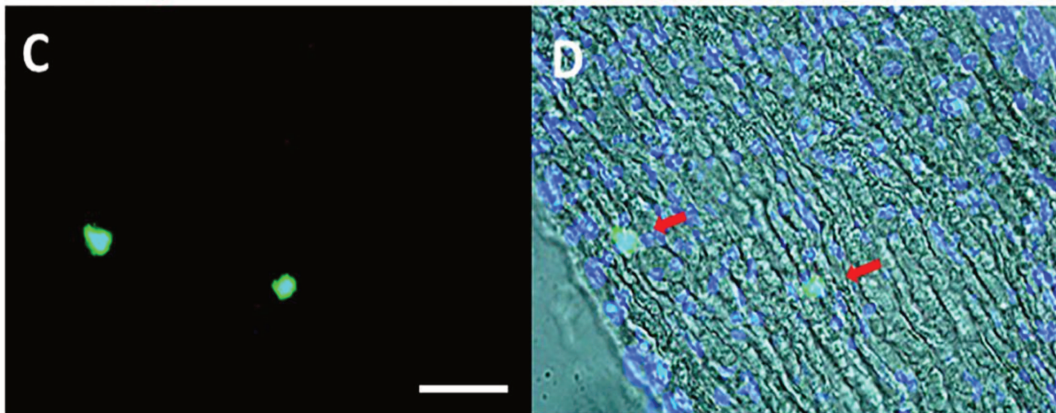
Auto-fluorescence of the GFP cells

Overlay images

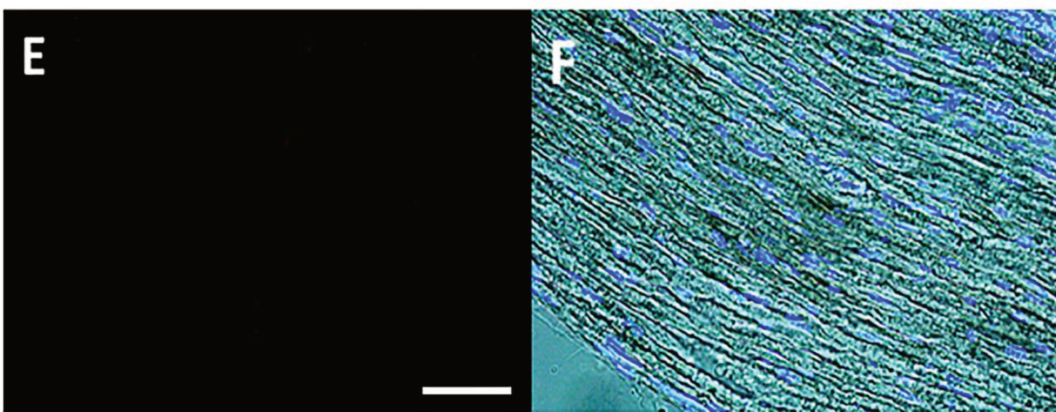
5 DAYS



15 DAYS



30 DAYS



Granulocytes (GFP)

MNC (GFP)

5 DAYS

