

**Luciana Politti Cartarozzi**

**"UTILIZAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA COMBINADO COM CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS NO REPARO DE NERVOS PERIFÉRICOS ATRAVÉS DA  
TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO"**

***"USE OF FIBRIN SEALANT COMBINED WITH MENSENCHYMAL STEM CELLS IN  
THE REPAIR OF PERIPHERAL NERVES THROUGH TUBULIZATION TECHNIQUE"***

**Campinas, 2013**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**Luciana Politti Cartarozzi**

**"UTILIZAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA COMBINADO COM CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS NO REPARO DE NERVOS PERIFÉRICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA  
DE TUBULIZAÇÃO"**

***"USE OF FIBRIN SEALANT COMBINED WITH MESENCHYMAL STEM CELLS IN  
THE REPAIR OF PERIPHERAL NERVES THROUGH TUBULIZATION TECHNIQUE"***

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
LUCIANA POLITTI CARTAROZZI  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia  
da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra  
em Biologia Celular e Estrutural, na área de  
Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Campinas, 2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C241u Cartarozzi, Luciana Politti, 1987-  
Utilização do selante de fibrina combinado com células tronco mesenquimais no reparo de nervos periféricos através da técnica de tubulização / Luciana Politti Cartarozzi. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Regeneração nervosa. 2. Selante de fibrina. 3. Células mesenquimais estromais. I. Oliveira, Alexandre Leite Rodrigues de, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Use of fibrin sealant combined with mesenchymal stem cells in the repair of peripheral nerves through tubulization technique

**Palavras-chave em inglês:**

Nerve regeneration

Fibrin sealant

Mesenchymal stromal cells

**Área de concentração:** Anatomia

**Titulação:** Mestra em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira [Orientador]

Ana Maria Blanco Martinez

Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

**Data de defesa:** 12-08-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 12 de agosto de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira (Orientador)

  
Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez

  
Assinatura

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Helder Jose Ceragioli

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Cecilia Amélia de Carvalho Zavaglia

  
Assinatura



***"Se as coisas são impossíveis... ora!***

***Não é motivo para não querê-las!***

***Que tristes os caminhos se não fora***

***A mágica presença das estrelas!"***

(Mário Quintana)



## ***Abstract***

Peripheral nerve regeneration is a complex process that is dependent on the rearrangement and activation of Schwann Cells (SC). Such stimulation of SCs may be achieved by the use of exogenous stem cells. In order to better understand the importance of mesenchymal stem cell (MSC) grafting in the peripheral regeneration process we have used the model of sciatic nerve tubulization. Tubular prostheses were prepared from polycaprolactone (PCL) membranes and filled with fibrin sealant (FS), which was used as a substrate for the MSC. The technique of tubulization was applied in adult Lewis female rats that were divided into four groups (n = 5 per group): normal, PCL (empty tube), FS (tube filled with fibrin sealant) and FS + MSC (tube filled with fibrin sealant and grafted with MSC). Sixty days after injury, the regenerated nerves were processed for immunohistochemistry and observed under fluorescence microscopy. The presence of GFP positive stem cells was detected in the nerves of the animals that received MSC grafts, indicating the long term survival of such cells. The axonal regeneration process was studied by immunohistochemistry and revealed the presence of the basic elements of the peripheral nerve, namely axons and basal lamina components that were equivalent in all experimental groups. The axonal organization was observed with anti-neurofilament immunostaining. The presence of SCs was analyzed with anti-S100 immunostaining and anti-type IV collagen was used to detect the basal lamina. Anti-p75<sup>NTR</sup>, the low affinity receptor for neurotrophins, was used to investigate the reactivity of the SCs. A basal positive labeling in uninjured nerves was detected, which was upregulated by the regenerative process, being statistically higher in FS + MSC group (77% relative to uninjured nerve; p<0.001). Moreover there was colocalization between GFP-positive MSC and anti-BDNF immunolabeling, showing a possible pathway that these cells induce the

reactivity of SCs. From sciatic nerve semi-thin sections we were able to evaluate that the areas of regenerated nerves were statistically the same in the different experimental groups. When we quantified the number of myelinated axons in  $50.000\mu\text{m}^2$ , the FG+MSC group showed higher density of axons when compared with PCL group (25%,  $p<0,05$ ). In the same way, the analysis of morphometric parameters showed that the FG+MSC group have a tendency to present higher caliber axons and thicker myelin sheath when compared with other groups, being that the myelin sheath thickness, in the interval between  $1,46$  to  $2,25\mu\text{m}$ , was significantly higher in FG+MSC group when compared to PCL and FG ( $p<0,05$ ). As the functional result of the findings above, the FG+MSC animals showed higher motor function recovery, analyzed by FFI, at seventh and eighth weeks after lesion. The findings herein show that MSC associated with the FS scaffold improve the regeneration process by positively modulating the reactivity of SCs.

## Resumo

A regeneração nervosa periférica é um processo complexo dependente do rearranjo e ativação das células de Schwann. O estímulo das células de Schwann pode ser alcançado através do enxerto de células tronco exógenas. Com o intuito de entender a importância do enxerto de células tronco mesenquimais (MSC) no processo regenerativo periférico, utilizamos o modelo de tubulização do nervo isquiático. As próteses tubulares foram preparadas a partir de membranas de poli-caprolactona (PCL) e preenchidas com selante de fibrina (FG), utilizado, neste caso, como substrato para as MSC. A técnica de tubulização foi feita em ratas fêmeas Lewis adultas, divididas em 4 grupos (n = 5 por grupo): normal, PCL (tubo vazio); FG (tubo preenchido com selante de fibrina) e FG+MSC (tubo preenchido com selante de fibrina e enxertado com MSC). Sessenta dias após lesão, os nervos regenerados foram processados para imunistoquímica e microscopia de luz. A presença de MSC GFP-positivas foi detectada nos nervos dos animais que receberam enxerto de MSC, indicando que a sobrevivência, a longo prazo, das células tronco no tecido. A regeneração axonal, analisada por imunistoquímica, revelou expressão de elementos básicos do nervo periférico, ou seja, componentes dos axônios e da lâmina basal tiveram a expressão equivalente em todos os grupos experimentais. A organização axonal foi observada através da marcação anti-neurofilamento. A presença das células de Schwann foi analisada através da marcação anti-S100 e o anticorpo anti-colágeno IV foi utilizado para detecção da lâmina basal. A imunomarcação anti-p75<sup>NTR</sup>, o receptor de baixa afinidade para neurotrofinas, foi utilizada para investigar a reatividade das células de Schwann. A marcação basal deste, em nervos não lesionados, foi aumentada pelo processo regenerativo, sendo estatisticamente maior no grupo FG+MSC (77% em relação ao nervo contralateral; p<0.001). Além disso, houve colocalização de MSC

GFP-positivas e imunomarcação anti-BDNF, evidenciando uma possível via de atuação das células sobre o comportamento das células de Schwann. A partir da análise das secções semi-finas dos nervos pudemos avaliar que a área dos nervos regenerados no interior das próteses tubulares foi estatisticamente igual nos diferentes grupos experimentais. Quando quantificamos o número de axônios mielinizados por uma área fixa, o grupo FG+MSC apresentou maior densidade de axônios em relação ao grupo controle (25%,  $p < 0,05$ ). Da mesma maneira, quando analisamos os parâmetros morfométricos nos diferentes grupos experimentais, o grupo FG+MSC apresentou uma tendência a apresentar axônios de maior calibre e bainha de mielina mais espessa, em relação aos demais grupos, sendo que, a EBM, no intervalo de 1,46 a 2,25 $\mu$ m, foi significativamente maior em relação aos grupos PCL e FG ( $p < 0,05$ ). Como consequência, os animais do grupo FG+MSC mostraram recuperação motora significativamente maior na sétima e oitava semana de análise do índice funcional do nervo fibular. Os achados deste estudo mostram que as MSC enxertadas conjuntamente com selante de fibrina influenciam positivamente o processo regenerativo, modulando a reatividade das células de Schwann.

# Sumário

Dedicatória .....	xvii
Agradecimentos .....	xix
<i>Acknowledgements</i> .....	xxi
LISTA DE FIGURAS .....	xxiii
LISTA DE TABELAS .....	xxix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxxí
Organização Geral da Dissertação .....	xxxiii
1. Introdução Geral .....	1
1.1 O Sistema Nervoso .....	1
1.2 Estrutura dos Nervos Espinais .....	3
1.3 Lesão Nervosa Periférica .....	6
1.4 Capacidade Regenerativa do SNP .....	7
1.5 Biomateriais .....	10
1.6 Células Tronco Mesenquimais .....	37
1.7 Novos Métodos para Análise da Progressão da Regeneração Nervosa.....	14
2. Justificativa.....	17
<b>CAPÍTULO I</b> .....	19
3. OBJETIVOS .....	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos .....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
4.1 <i>In vitro</i> .....	23

4.1.1 Extração e cultura de células tronco mesenquimais .....	23
4.1.2 Análise fenotípica das células tronco mesenquimais por citometria de fluxo.....	24
4.2 <i>In vivo</i> .....	26
4.2.1 Animais e grupos experimentais .....	26
4.2.2 Construção das próteses para tubulização .....	27
4.2.3 Obtenção da cola de fibrina .....	28
4.2.4 Procedimento cirúrgico: tubulização .....	29
4.2.5 Sacrifício dos animais e processamento para microscopia - morfometria e contagem das fibras regeneradas .....	30
4.2.6 Sacrifício dos animais e processamento para imunoistoquímica .....	32
4.2.7 Avaliação funcional .....	33
4.2.8 Análise Estatística .....	34
5. RESULTADOS .....	35
5.1 Análise morfológica das células tronco mesenquimais .....	35
5.2 Análise fenotípica das células tronco mesenquimais .....	36
5.3 Sobrevivência das MSC no tecido .....	39
5.4 Imunoistoquímica .....	40
5.5 Análise morfológica dos nervos regenerados .....	49
5.6 Quantificação dos axônios mielínicos .....	51
5.7 Parâmetros Morfométricos .....	53
5.7.1 DFM .....	53
5.7.2 DAM .....	56
5.7.3 EBM .....	59

5.7.4 RZ"g" .....	63
5.8 Avaliação Funcional .....	65
6. DISCUSSÃO .....	67
7. CONCLUSÕES .....	73
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>75</b>
<i>Abstract</i> .....	77
Resumo.....	79
3. OBJETIVOS .....	81
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	83
4.1 Animais transgênicos .....	83
4.2 Procedimento cirúrgico: esmagamento do nervo isquiático .....	84
4.3 Clareamento Tecidual .....	84
4.4 2P-LSM .....	84
4.4.1 Processamento das Imagens .....	85
4.5 Preparação do tecido para microscopia de fluorescência.....	85
5. RESULTADOS .....	87
5.1 Clareamento tecidual à base de THF nos nervos isquiáticos .....	87
5.2 Imageamento em profundidade dos nervos isquiáticos antes e após o clareamento tecidual.....	89
5.3 Alterações morfológicas no nervo isquiático após lesão .....	90
5.4 Reação microglial após esmagamento do nervo isquiático .....	94
5.5 Alterações morfológicas em motoneurônios após injúria .....	95
6. DISCUSSÃO .....	97
7. CONCLUSÕES .....	101
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102

Anexos ..... 112

***Ao meu avô Roberto.***

***Aos meus pais, Humberto e Rosangela e a minha irmã, Roberta.***



# Agradecimentos

A Deus, pelo sol que brilha a cada dia, incansavelmente;

Ao Professor Alexandre, pela confiança durante todos estes anos. Por todas as oportunidades, obrigada!

Às professoras Ana Maria Martinez e Cecília Zavaglia por terem participado da banca;

Aos colegas do Departamento de Anatomia;

Aos meus amigos do Laboratório de Regeneração Nervosa: Aline, André, Bárbara, Sheila, Roberta, Camila, Gustavo, Rodrigo, Natália, Gabriela, Giuliano, Suzana, Matheus, Gleidy, Kyl, Mateusinho, Sérgio tanto pelos momentos de descontração quanto de discussão científica;

Especialmente ao André Bombeiro, pela ajuda cordial sempre;

Especialmente aos meus queridos amigos Aline Macedo, Gabi, Giuliano, Matheus, Rodrigo e Túlio.

Obrigada pelo apoio e pelas risadas. Ao vivo ou via *Skype*;

À Nátali Isabela, minha amiga de infância, por tudo que sonhamos juntas ou cada uma por si!

À Renata Graciele Zanon, por todo ensinamento e colaboração;

Ao Luis Gabriel Maturana, pelo auxílio quando comecei a trabalhar com tubulização e pela amizade;

À Rafaela Hell, por compartilhar seus conhecimentos em Biologia Molecular e pela amizade;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, sua coordenação, professores e à secretária Liliam;

Ao CEMIB, por conceder os animais;

Aos técnicos do departamento Nori e Marquinho por todo o auxílio;

Aos técnicos de Anatomia Paulo, Tony e Walter, pelo auxílio;

Ao professor Alfredo Miranda de Goes, Juliana Lott Carvalho e UFMG, pela concessão dos animais GFP e auxílio para execução da citometria de fluxo;

Aos professores Rui Seabra Ferreira Junior e Benedito Berraviera, por disponibilizarem a cola de fibrina utilizada neste trabalho;

À professora Eliana Duek por ceder as membranas de poli-caprolactona;

À Professora Elaine Del Bel por nos colocar em contato com o Professor Frank e seu grupo de pesquisa alemão;

Aos meus pais, por estarem ao meu lado mesmo quando havia um oceano entre nós. Amo vocês, obrigada por acreditarem em mim e construírem junto comigo meu sonho;

Chico e Zuca, pela companhia, momentos de diversão e carinho verdadeiro;

A minha irmã, Roberta, minha grande companheirinha! Será uma engenheira com concentração em neurobiologia de tanto me ajudar durante as disciplinas, relatórios e confecção da tese. Amo você! :v

À CAPES, pelo apoio financeiro no início do mestrado;

À FAEPEX, pela ajuda financeira para participação do XI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Berlin, 2013);

À FAPESP, pelo apoio financeiro durante o mestrado e também durante o estágio no exterior (bolsa BEPE).

# Acknowledgements

Prof. Dr. Frank Kirchhoff for welcome me in his lab with all cordiality. Thank you for sharing the transgenic mice, 2P-LSM setup and a little piece of your scientific experience and make possible such a grateful experience;

All the students and technicians from Molecular Physiology Lab of Saarland University in Homburg;

Specially Anja Scheller, Alexander Cupido and Frank Rhode for the scientific support and patience;

Ute, Bobby and Lilly for the great moments and walks. You really made my stay in Germany better;

To FAPESP, for the financial support.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Esquema ilustrativo da estrutura do nervo espinal

**Figura 2:** Imagens do procedimento para obtenção do tubo de policaprolactona. Em **A**, o aspecto da membrana de PCL que é moldada no suporte em **B (C)**. Em **D**, aspecto do tubo de PCL após fixação das extremidades, retirada do excesso de material e corte no tamanho desejado.

**Figura 3:** Procedimento cirúrgico para tubulização do nervos isquiático. Em **A**, incisão da pele da região pósteromedial da coxa esquerda, e o afastamento da musculatura e exposição do nervo isquiático. **B**, fixação do coto proximal com um ponto cirúrgico na prótese tubular. **C**, fixação de ambos cotos nervosos na prótese tubular. Escala = 2mm.

**Figura 4:** Aspecto da cultura de células-tronco mesenquimais 48h após a extração (**A**), 4 dias após extração (**B**) e 11 dias após extração (**C**). Já em **D**, o aspecto da cultura de células tronco mesenquimais na primeira passagem, mostrando a homogeneidade da cultura e a morfologia fusiforme característica dessas células. Em **E**, micrografia de fluorescência da cultura de células tronco mesenquimais GFP positivas. Barra de escala = 50µm.

**Figura 5:** Análise fenotípica das MSC por citometria de fluxo. **A)** Gráfico de distribuição pontual FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade) utilizado para a seleção da população analisada R1. **B-I)** Histogramas de intensidade média de fluorescência (GRN-HLog: green fluorescence) versus número de eventos (counts). **B)** CD45. **C)** CD34. **D)** MHC II. **E)** CD11b/c. **F)** CD90. **G)** MHCI (RT1A). **H)** CD54. **I)** CD 73.

**Figura 6:** Representação gráfica do percentual de células fluorescentes para cada anticorpo analisado dentro da população R1.

**Figura 7:** Micrografia de fluorescência evidenciando a detecção de células tronco mesenquimais no nervo tubulizado 60 dias após o enxerto **(A)**, marcação com DAPI **(B)**, para observação da localização das células no nervo e as imagens combinadas **(C)**. Barra de escala = 25µm.

**Figura 8:** Imunomarcção anti-neurofilamento dos nervos contralateral **(A)**, PCL **(B)**, FG **(C)** e FG+MSC **(D)**, 60 dias após tubulização. Em **E**, gráfico indicando a quantificação da densidade integrada de pixels nos grupos experimentais. Barra de escala = 100µm.

**Figura 9:** Imunomarcção anti-S100 dos nervos contralateral, PCL, FG e FG+MSC, 60 dias após tubulização. Em **E**, gráfico indicando a quantificação da densidade integrada de pixels nos grupos experimentais. Barra de escala = 100µm.

**Figura 10:** Imunomarcção anti-Colágeno IV dos nervos contralateral **(A)**, PCL **(B)**, FG **(C)** e FG+MSC **(D)**, 60 dias após tubulização. Em **E**, gráfico indicando a quantificação da densidade integrada de pixels nos grupos experimentais. Barra de escala = 100µm.

**Figura 11 :** Imunomarcção anti-p75<sup>NTR</sup> dos nervos contralateral **(A)**, PCL **(B)**, FG **(C)** e FG+MSC **(D)**, 60 dias após tubulização. Em **E**, gráfico indicando a quantificação da densidade integrada de pixels nos grupos experimentais. Barra de escala = 100µm.

**Figura 12:** Em **A** , imagem representativa mostrando células GFP positivas observadas nos nervos regenerados, 60 dias após tubulização. **B**, imunomarcção anti-BDNF na mesma região e **C**, presença da imunorreatividade anti-BDNF colocalizada com as MSC-GFP positivas. Barra de escala = 100µm.

**Figura 13:** Vista panorâmica nos nervos regenerados observados sob microscopia de luz, 60 dias após tubulização. Em **A**, implante do tubo de policaprolactona vazio, PCL, em **B**, implante do tubo de policaprolactona preenchido com cola de fibrina, FG, em **C**, implante do tubo de policaprolactona

preenchido com cola de fibrina e enxerto de células tronco mesenquimais, FG+MSC e em **D**, nervo contralateral. Em **E**, gráfico mostrando a quantificação das áreas. Escala = 100 $\mu$ m.

**Figura 14:** Gráfico contendo o número médio da estimativa total de fibras regeneradas  $\pm$  erro padrão, nos nervos contralaterais e nos grupos PCL, FG e FG+MSC.

**Figura 15:** Micrografias de luz dos nervos regenerados 60 dias após tubulização. Implante do tubo de policaprolactona vazio, PCL (**A**), implante do tubo de policaprolactona preenchido com cola de fibrina, FG (**B**), implante do tubo de policaprolactona preenchido com cola de fibrina e enxerto de células tronco mesenquimais, FG + MSC (**C**) e nervo contralateral (**D**). Escala = 10 $\mu$ m.

**Figura 16:** Gráfico contendo o número estimado de fibras regeneradas em 50.000 $\mu$ m<sup>2</sup>  $\pm$  erro padrão nos grupos PCL, FG e FG+MSC.

**Figura 17:** Distribuição de frequência do diâmetro das fibras mielínicas (DFM) regeneradas nos diferentes grupos experimentais, 60 dias após tubulização.

**Figura 18:** Análise estatística comparativa dos grupos experimentais nos respectivos intervalos da DFM.

**Figura 19:** Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) regeneradas nos diferentes grupos experimentais, 60 dias após tubulização.

**Figura 20:** Análise estatística comparativa dos grupos experimentais nos respectivos intervalos da DAM.

**Figura 21:** Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina (EBM) dos axônios regenerados nos diferentes grupos experimentais, 60 dias após tubulização.

**Figura 22:** Análise estatística comparativa dos grupos experimentais nos respectivos intervalos da EBM.

**Figura 23:** Distribuição de frequência da Razão "g" (RZG) dos diferentes grupos experimentais, 60 dias após tubulização.

**Figura 24:** Análise estatística comparativa dos grupos experimentais nos respectivos intervalos da Razão "g".

**Figura 25:** Análise da função motora dos animais 8 semanas após a lesão. Gráfico construído com valores do índice funcional do nervo fibular.

**Figura 26:** Micrografias geradas a partir do imageamento ao 2P-LSM, mostrando a expressão de proteínas fluorescentes no nervo normal de um animal da linhagem TFGD: Thy1-eYFP em vermelho, GFAP-eCFP em verde e a sobreposição de ambos. Barra de escala = 10µm.

**Figura 27:** Projeções 3D nos nervos clareados e não clareados do camundongo da linhagem TFGD: mostrando em vermelho Thy1-EYFP e em verde GFAP-ECFP.

**Figura 28:** Imagens dos nervos de animais CXCR mostrando o nervo não lesionado e nervos 3, 7 e 14 dias após esmagamento. Note que não há quase nenhuma detecção fluorescente nos nervos não lesionados, enquanto nos nervos esmagados há detecção de células CX3CR1-GFP positivas. Barra de escala = 10µm.

**Figura 29:** Imagens de nervos de animais da linhagem TFGD sem lesão, 3, 7 e 14 dias após esmagamento do nervo isquiático. Barra de escala = 10µm.

**Figura 30:** Imagens adquiridas de nervos de animais da linhagem NGYT, tanto sem lesão quanto 3 dias após esmagamento do nervo isquiático. Observe os remanescentes de GFP, resultantes da degeneração Walleriana no nervo lesado Barra de escala = 10µm.

**Figura 31:** Secções da medula espinal lombar de animais CXCR 14 dias após esmagamento do nervo isquiático. Em **A**, representação esquemática do *pool* do nervo isquiático (delimitado pelo círculo) no corno anterior da medula espinal. **B** e **C** mostram a detecção de células CX3CR1-GFP positivas nos lados contra e ipsilateral à lesão, respectivamente. Barra de escala = 50µm.

**Figura 32:** Secções da medula espinal lombar de camundongos TFGD, 7 e 14 dias após o esmagamento do nervo isquiático. **A** e **B** são os lados contra e ipsilateral à lesão, respectivamente, 7 dias após lesão. **C** e **D** mostram os lados contra e ipsilateral, 14 dias após o esmagamento, respectivamente. Barra de escala = 50µm.



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Anticorpos primários usados no ensaio de citometria de fluxo para caracterização das MSC. Cada anticorpo é seguido pelo fornecedor, animal hospedeiro, código do produto e concentração utilizada.

**Tabela 2:** Número de animais e grupos propostos no projeto.

**Tabela 3:** Anticorpos primários usados no ensaio de imunoistoquímica. Cada anticorpo é seguido pelo fornecedor, animal hospedeiro, código do produto e concentração utilizada.

**Tabela 4:** Reagentes e respectivos tempos de incubação para procedimento de clareamento tecidual.



## LISTA DE ABREVIATURAS

2P-LSM - 2 photon laser scanning microscope

BABB - Benzil álcool - benzil benzoato

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA - Albumina de soro bovino

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CFP - Proteína fluorescente azul

DAM - Diâmetro do axônio mielínico

DBE - Dibenzil éter

DCM - Diclorometano

DFM - Diâmetro da fibra mielínica

DMEM - Meio *Eagle* modificado pela Dubelco

EBM - Espessura da bainha de mielina

FFI - Índice Funcional do Nervo Fibular

FG - Selante de fibrina

GFAP - Proteína fibrilar ácida glial

GFP - Proteína fluorescente verde

GPI - Glicofosfatidilinositol

MHC I - Complexo de histocompatibilidade principal de classe I

MHC II - Complexo de histocompatibilidade principal de classe II

mRNA - RNA mensageiro

MSC - Células tronco mesenquimais

NGF - Fator de crescimento do nervo

NT3 - Neurotrofina 3

NT4/5 - Neurotrofina 4/5

PB - Tampão fosfato

PBS - Tampão fosfato salino

PCL - poli-caprolactona

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PGA - Poli Ácido Glicólico

PLA - Poli Ácido Lático

PLGA - Poli Ácido co-Glicólico

RNA - ácido ribonucleico

RZ"g" - Razão 'g'

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

THF - Tetraidrofuran

TrK - receptor tirosina quinase

YFP - Proteína fluorescente amarela

# Organização geral da dissertação

A presente dissertação está dividida em dois capítulos. O Capítulo I intitulado "*Uso do selante de fibrina combinado com células tronco mesenquimais no reparo de nervos periféricos através da técnica de tubulização*" foi desenvolvido no Laboratório de Regeneração Nervosa, Instituto de Biologia - UNICAMP, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira. O Capítulo II intitulado "*Análise dos mecanismos celulares da injúria axonal no sistema nervoso periférico utilizando novas técnicas de imageamento*", foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Molecular, Instituto de Fisiologia da Universidade de Saarland em Homburg, na Alemanha, sob supervisão do Prof. Dr. Frank Kirchhoff, sendo resultado do auxílio concedido pela Fapesp, na modalidade Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE).

Ao todo, este trabalho compreende 20 itens. Os 5 primeiros são introdutórios ao texto de ambos os capítulos, compreendendo a Lista de Abreviaturas, Lista de Figuras, Lista de Tabelas, Introdução Geral e Justificativa.

Os itens seguintes se referem ao conteúdo da tese propriamente dita, estando estruturados em Resumo, *Abstract*, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões, em ambos os Capítulos componentes da tese.

O último item, Referências Bibliográficas, é referente tanto ao Capítulo I quanto ao Capítulo II.



# 1. Introdução geral

## 1.1 O Sistema Nervoso

O sistema nervoso consiste de uma porção central (Sistema Nervoso Central - SNC) e uma porção periférica (Sistema Nervoso Periférico - SNP). As funções exercidas pelo sistema nervoso envolvem o processamento das informações sensoriais, controle motor, mediação de respostas autonômicas, elaboração de respostas emocionais, aprendizagem e memória (Kandel, *et al.* 2000).

Os neurônios são células especializadas na condução do impulso nervoso e constituem a unidade fundamental do sistema nervoso. Um neurônio típico é constituído de um corpo (soma), dendritos e um axônio (Machado, 2006).

O corpo celular do neurônio é considerado o centro metabólico, sendo responsável pela síntese da maioria das proteínas neuronais, bem como pela degradação e renovação dos constituintes celulares. Os dendritos, por sua vez, são responsáveis por receber e gerar estímulos. O axônio se origina no corpo do neurônio em uma região chamada cone de implantação (Kandel, *et al.* 2000). Possui comprimento variável, podendo ter, no humano, de alguns milímetros a mais de um metro, como é o caso dos axônios dos neurônios que formam o nervo isquiático. O axônio é especializado na condução do impulso elétrico, sendo também responsável pelo transporte de substâncias, como neurotrofinas e fatores de crescimento. Esse transporte se faz do corpo celular para os terminais axonais e também dos terminais para o corpo celular, sendo denominado fluxo axoplasmático anterógrado e retrógrado, respectivamente (Machado, 2006). A célula, como um todo, recebe terminais ou botões sinápticos de outros neurônios, formando sinapses.

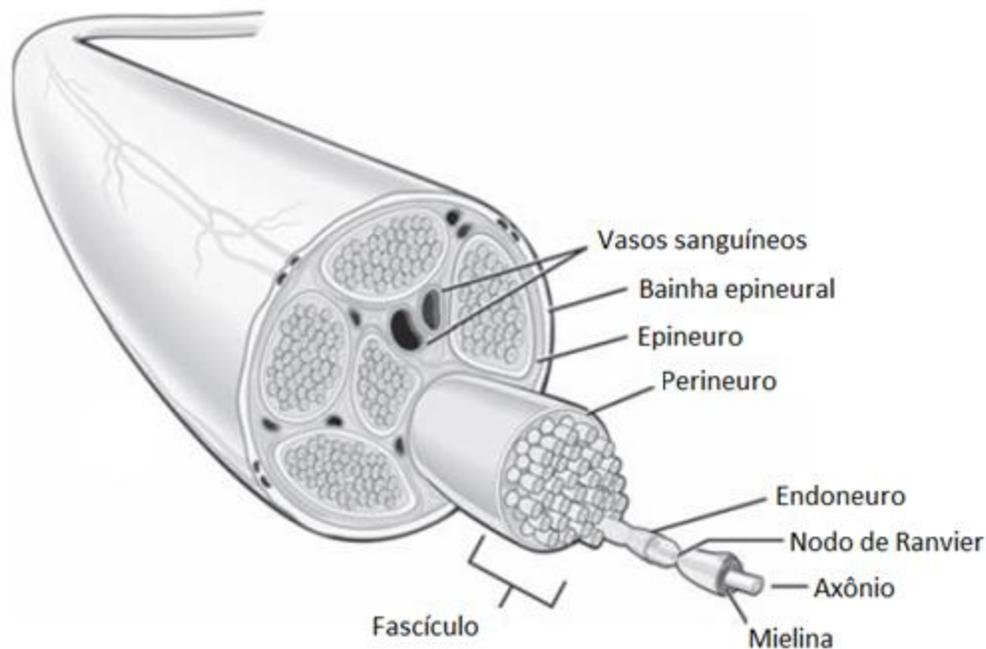
O SNC é constituído pelas estruturas do sistema nervoso que estão protegidas por compartimentos ósseos, compreendendo o cérebro, cerebelo, tronco encefálico e medula espinal. A medula espinal está localizada no interior do canal vertebral e é tida como o maior condutor de informações que partem da pele, articulações e músculos do corpo para o encéfalo, e vice versa. Esta comunicação da medula espinal com o corpo é feita através dos nervos espinais, que, juntamente com os gânglios, formam o SNP (Kandel, *et al*, 2000; Bear, *et al.*, 2008). O SNP possui duas partes: somática e visceral. O SNP visceral, também chamado de sistema nervoso autônomo, involuntário, constituído por neurônios que inervam os órgãos internos, vasos sanguíneos e glândulas. Fibras nervosas viscerais sensitivas levam informação sobre a função visceral para o SNC, enquanto que os axônios viscerais motores comandam a contração e relaxamento dos músculos lisos (e musculatura cardíaca) constituintes dos órgãos (Bear, *et al.*, 2008). O SNP somático, por sua vez, é formado por axônios que inervam a pele, articulações e músculos estriados esqueléticos, atuando sobre controle voluntário. Os axônios somáticos motores comandam a contração muscular, sob comando dos neurônios motores, cujos corpos celulares estão localizados em núcleos na porção ventral da medula espinal (Bear, *et al.*, 2008). As fibras sensitivas somáticas, por sua vez, inervam e coletam informações da pele, músculos e articulações, e penetram na medula espinal via raízes dorsais. Os corpos celulares destes neurônios estão localizados fora do SNC, nos gânglios da raiz dorsal (Bear, *et al.*, 2008).

Logo após deixarem o a medula espinal ou os gânglios sensitivos, as fibras nervosas se unem para formar os nervos periféricos espinais, como o nervo isquiático. Da união da raiz dorsal, sensitiva, com a raiz ventral, motora, forma-se o tronco do nervo espinal, que funcionalmente é misto (Machado, 2006).

O nervo isquiático é o maior nervo do corpo humano e faz parte do plexo lombossacral. Este, por sua vez, é formado pelas raízes ventrais dos nervos espinais (L4, L5, S1, S2, S3 e S4). O nervo isquiático é formado por três ramos: nervo tibial, nervo fibular comum e nervo sural (Machado, 2006). O nervo tibial, que é responsável por inervar todos os músculos da face posterior da coxa e perna. Nesta última, controla os movimentos de flexão plantar e inversão; e o nervo fibular comum é responsável pela inervação dos músculos da região anterior da perna, responsáveis pelos movimentos de dorsiflexão e eversão (Dangelo e Fattini, 2011).

## **1.2 Estrutura dos nervos espinais**

O nervo periférico, esquematizado na **Fig. 1**, apresenta um envoltório de tecido conjuntivo rico em vasos, denominado epineuro. No interior, dispõem-se fibras nervosas organizadas em fascículos. O epineuro com seus vasos penetra entre os fascículos. Dessa maneira, cada fascículo é delimitado pelo perineuro, que compreende o tecido conjuntivo denso ordenado e células epiteliais lamelares ou achatadas, que formam várias camadas entre o tecido conjuntivo e as fibras nervosas. Entre as camadas de células epiteliais perineurais também há fibras colágenas. Geralmente, à microscopia óptica, identifica-se apenas o componente conjuntivo do perineuro. As células perineurais são, contudo, facilmente identificadas à microscopia eletrônica. Unem-se uma a uma por junções de oclusão e assim isolam as fibras nervosas do contato com o microambiente do epineuro e adjacências. Dentro de cada fascículo, delicadas fibrilas colágenas (colágeno tipo III), também denominadas fibras reticulares, formam o endoneuro, que envolve cada fibra nervosa. O endoneuro limita-se internamente pela membrana basal da célula de Schwann (Machado, 2006).



**Figura 1:** Esquema ilustrativo da estrutura do nervo espinal (Modificado de Siemionow e Brzezicki, 2009).

As células de Schwann formam a maioria das células gliais periféricas. São derivadas embriologicamente da crista neural e formam duas populações principais durante a ontogenia, dependendo de sinais emitidos pelos axônios, as células de Schwann mielinizantes e as não-mielinizantes. Estas, usualmente recobrem coletivamente grupos de axônios de pequeno calibre, separando axônios individuais apenas por delgados prolongamentos. As células de Schwann mielinizantes são associadas a um axônio, geralmente de calibre maior (Kettenmann e Ransom, 2005)

Os axônios de neurônios motores e parte daqueles dos neurônios sensitivos são envoltos por mielina, ao longo do seu comprimento. A bainha de mielina é um componente especializado do sistema nervoso que maximiza a eficiência da condução e velocidade dos potenciais de ação. Está arranjada em camadas lipídicas bimoleculares concêntricas intercaladas com camadas proteicas.

Análises moleculares mostram que a mielina possui composição similar à da membrana plasmática, tendo constituição 70% lipídica e 30% proteica, com maior concentração de colesterol (Kettenmann e Ransom, 2005).

Tanto a estrutura lamelar regular quanto a composição bioquímica da mielina são consequências de como ela é formada a partir da membrana plasmática. Durante o desenvolvimento do SNP, antes da mielinização acontecer, os axônios no nervo periférico se localizam paralelamente às Células de Schwann. As células de Schwann se alinham ao axônio em intervalos que formarão os Nodos de Ranvier. A membrana citoplasmática externa da células de Schwann envolve um único axônio e forma uma estrutura de dupla membrana chamada mesaxônio, a qual alonga e se espirala ao redor do axônio, formando as camadas concêntricas (Kandel *et al.*, 2000).

No nervo imaturo, em desenvolvimento, um grande conjunto de axônios torna-se envolto por uma única célula de Schwann. O estabelecimento do contato com o axônio desencadeia a proliferação das células de Schwann. Os axônios são gradualmente segregados, enquanto as células de Schwann proliferam e enviam seus prolongamentos mais profundamente no feixe de axônios. Uma relação 1:1 é estabelecida entre cada Célula de Schwann e um segmento isolado de um axônio que será mielinizado. Durante este período, a célula de Schwann sofre um alongamento lateral substancial ao longo do axônio e secreta uma lâmina basal na superfície abaxonal da unidade célula de Schwann/axônio. A deposição da lâmina basal é um dos eventos que dirige a diferenciação das célula de Schwann em direção à mielinização (Garbay *et al.*, 2000).

O programa para mielinização envolve numerosos sinais transmitidos entre os axônios e as células de Schwann que incluem, no SNP, neurotrofinas, como BDNF e NT3. A remoção de BDNF inibe a mielinização enquanto a remoção de NT3 aumenta a mielinização (Chan *et al.*, 2001).

### 1.3 Lesão Nervosa Periférica

Pelo fato de os neurônios possuírem longos axônios e pequenos corpos celulares, a maioria das injúrias, tanto no SNC quanto no SNP envolvem danos axonais. A transecção axonal é chamada axotomia e suas consequências são numerosas. Primeiramente, a axotomia divide o axônio em um segmento proximal, que permanece unido ao corpo celular, e um segmento distal que, devido à lesão, perde a conexão com o soma. Pelo fato da capacidade de síntese de proteínas ser restrita ao corpo celular, a axotomia resulta em degeneração do segmento distal.

Seddon (1943) classificou as injúrias nervosas em três grupos principais: neuropraxia, axotomia e neurotomia. A neuropraxia é caracterizada pelo dano local da bainha de mielina, usualmente secundário à compressão. A continuidade do axônio é preservada e o segmento distal não sofre degeneração. A axotomia é definida como uma perda da continuidade axonal, com variável preservação do tecido conectivo do nervo. A neurotomia, por sua vez, é o tipo de injúria mais severa, equivalente ao rompimento fisiológico do nervo todo (Lee e Wolfe, 2000).

Após lesão nervosa periférica, distalmente ao sítio da lesão, inicia-se um processo denominado degeneração Walleriana, que tem como evento chave a degeneração dos fragmentos distais dos axônios lesados. Após axotomia, bainha de mielina, que requer contato com o axônio para manutenção se fragmenta. As células de Schwann mielinizantes liberam a mielina, proliferam, produzem citocinas e fatores tróficos e participam da fagocitose dos restos de mielina e de axônios degenerados. Os fatores solúveis produzidos pelas células de Schwann e pelos axônios lesionados ativam macrófagos residentes e atraem macrófagos provenientes da circulação sanguínea (Sunderland, 1990; Ide, 1996; Bruck, 1997, Gaudet *et al.* 2011). Uma vez presentes no microambiente da lesão, os macrófagos fagocitam

eficientemente os restos de mielina e, ainda, produzem fatores que facilitam a migração das células de Schwann.

Já na porção proximal à lesão, o corpo celular apresenta uma série de alterações, em conjunto, denominadas reação do corpo celular à injúria: o corpo celular torna-se inchado, o núcleo se move para a periferia e o aglomerado de retículo endoplasmático rugoso (também conhecido como Corpúsculo de Nissl, em neurônios) se torna fragmentado. Alterações metabólicas acompanham a esta reação, incluindo um aumento geral na síntese de proteínas e de RNA bem como alterações no padrão gênico expresso pelos neurônios (Kandel, 2000). Os neurônios lesados priorizam a síntese de proteínas relacionadas ao reparo dos axônios. Essas alterações são reversíveis, caso a regeneração for bem sucedida (Zochodne, 2000).

#### **1.4 Capacidade Regenerativa do SNP**

A regeneração do Sistema Nervoso Periférico é considerada um fenômeno altamente complexo, o qual resulta em uma sucessão de eventos expressa de forma cronológica e sincronizada, visando o reajuste do microambiente do nervo lesionado (Ide, 1996). Após a lesão, as células de Schwann ganham motilidade e proliferam. Formam as Bandas de Büngner, promovendo um ambiente permissivo para o crescimento guiado dos axônios em regeneração e subsequente remielinização (Chen *et al.*, 2007; Gaudet *et al.*, 2011).

Associados ao processo regenerativo, os fatores neurotróficos detêm funções importantes na sobrevivência neuronal e no crescimento axonal após injúria do nervo periférico, além de também serem importantes na regulação da atividade das células de Schwann e na mielinização dos axônios em regeneração (Chen *et al.* 2007). Dentre os polipeptídeos caracterizados como fatores neurotróficos, os

mais classicamente conhecidos pertencem à família das neurotrofinas, incluindo NGF, NT3, NT4/5 e BDNF. Estes induzem o crescimento axonal através da conservação da via de sinalização de polaridade celular (Yoshimura *et al.*, 2005). As neurotrofinas exercem suas funções através da sinalização mediada por dois tipos de receptores: os receptores de alta afinidade TrK (receptores tirosina quinase) e o receptor de baixa afinidade para neurotrofinas, p75<sup>NTR</sup> (Chao, 2003; Chen *et al.*, 2007).

O papel das neurotrofinas na regeneração nervosa periférica foi deduzido a partir do padrão diferencial de expressão após injúria, quando os níveis de mRNA de p75<sup>NTR</sup> aumentam nas células de Schwann, no coto distal à lesão. Este aumento pode perdurar por até três meses e, neste período, a responsividade do tecido às neurotrofinas é maior (Frostick *et al.* 1998; Chen *et al.*, 2007). Da mesma maneira, os níveis de mRNA para BDNF encontram-se aumentados no segmento distal à lesão a partir do terceiro dia após lesão, o que permanece por diversas semanas (Chen *et al.*, 2007). Estudos de Cosgaya e colaboradores (2002) revelaram que as neurotrofinas, em especial o BDNF, possuem função na regulação da mielinização pelas células de Schwann, sendo que esta via de sinalização para mielinização ocorre através p75<sup>NTR</sup> (Cosgaya *et al.*, 2002; Tolwani *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007)

Apesar da capacidade regenerativa do sistema nervoso periférico, unida às atuais técnicas de diagnóstico e cirurgia, o prognóstico pós-lesão não é de plena recuperação funcional, permanecendo sequelas motoras e sensoriais (Frostick *et al.*, 1998). Por esse motivo, diversas abordagens experimentais têm sido investigadas com o intuito de potencializar o processo de regeneração nervosa periférica. Há casos nos quais a extensão da lesão periférica impossibilita a reconexão entre os cotos sendo que vários tecidos como os ossos, fâscias, tendões, músculos estriados esqueléticos e vasos sanguíneos, tanto autólogos quanto não-autólogos, foram testados experimentalmente no reparo do nervo periférico (Barker & Widner, 2004; Wennersten *et al.*, 2006). Comprovadamente, o autoenxerto

(enxerto autógeno) de nervos cutâneos (e.g. nervo cutâneo sural ou safeno) resulta em uma melhor recuperação motora e sensitiva. O autoenxerto apresenta características claras de biocompatibilidade, além de promover a adesão e migração celular. Entretanto, há a necessidade de remoção de tecido nervoso do paciente para o implante, havendo perda de sensibilidade da área do nervo retirado para o transplante (Fields *et al.*, 1989; Yannas & Hill, 2004).

Outras técnicas são utilizadas no reparo de lesões nervosas periféricas, dentre elas: a sutura das bainhas conjuntivas (neurorrafia), a adesão dos cotos por cola cirúrgica (cola de fibrina) e a tubulização (Cruz *et al.*, 1986; Fields *et al.*, 1989; Lundborg *et al.*, 1994; Lundborg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004).

A tubulização é uma técnica de reparo realizada quando a distância que separa os dois cotos não excede alguns milímetros. O processo da tubulização consta de uma prótese tubular (e.g. silicone ou polietileno) onde os cotos distal e proximal são introduzidos e fixados através de pontos cirúrgicos em suas extremidades, permitindo o realinhamento dos cotos (Fields *et al.*, 1989, Lundborg *et al.*, 1994; Labrador *et al.*, 1995; Lundborg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.*, 2004).

Os objetivos desta técnica são criar um ambiente favorável à regeneração, orientar o crescimento das fibras em direção ao coto distal, proteger as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitar a formação de neuromas. Além disso, possibilita o emprego de moléculas da matriz extracelular (e.g. colágeno, fibronectina, laminina), células fundamentais para o processo regenerativo (e.g. células de Schwann), e fatores neurotróficos para o preenchimento do tubo a fim de se aumentar a eficiência do processo regenerativo (Fields *et al.*, 1989; Tong *et al.*, 1994; Labrador *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2001; Schimdt & Leach, 2003; da Silva *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.*, 2004).

## 1.5 Biomateriais

A técnica da tubulização pode apresentar algumas desvantagens. Uma delas é a elevação gradativa da pressão no interior da prótese, à medida que o nervo regenerado aumenta em espessura. Como resultado, dificulta-se a vascularização, o que resulta em degeneração axonal secundária (Fields *et al.*, 1989). Dessa forma, em muitos casos, torna-se obrigatória a realização de uma nova intervenção cirúrgica para a retirada do tubo.

A busca por materiais biocompatíveis e reabsorvíveis para reparo do nervo periférico e o emprego de estratégias capazes de minimizar os pontos negativos da tubulização e do autoenxerto vem se tornando um campo de estudo amplo nesses últimos anos (Widmer *et al.*, 1998; Sundback *et al.*, 2003).

Vários materiais sintéticos biodegradáveis têm sido pesquisados através do modelo da tubulização. Dentre esse grupo podemos destacar o poli ácido glicólico (PGA), poli ácido láctico (PLLA), poli ácido láctico co-glicólico (PLGA) e poli-caprolactona (PCL), os quais demonstraram efeitos positivos em vários ensaios (Evans *et al.*, 2002, Schimdt & Leach, 2003; Schlosshauer *et al.*, 2003; Yannas & Hill, 2004; Ribeiro-Resende *et al.*, 2009). Os biomateriais são definidos como materiais que interagem com sistemas biológicos permitindo avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Williams, 1999). Alguns biopolímeros apresentam propriedades físicas e químicas de grande interesse no campo da reconstituição nervosa periférica, tais como o tempo de degradação, porosidade, biocompatibilidade, resistência. Além disso, podem ser confeccionados com as mais variadas formas e dimensões (Widmer *et al.*, 1998; Evans, *et al.*, 2002; Schimdt & Leach, 2003).

O selante de fibrina é outro biomaterial principalmente usado para obter adesão em ferimentos, mas outras aplicações tem sido reportadas, entre elas a reparação nervosa. O selante de

fibrina é um material biológico formado por dois componentes principais: fibrinogênio e trombina, que quando combinados formam uma matriz de fibrina bioativa com propriedades hemostáticas e de adesão e tem sido utilizada em várias indicações neurocirúrgicas na Europa e Japão há mais de vinte anos (Vries *et al.*, 2002).

A ação do selante de fibrina consiste em mimetizar o efeito final dos passos da cascata de coagulação sanguínea, que resulta na formação de coágulos. Os monômeros de fibrina se polimerizam espontaneamente dentro de segundos em polímeros de fibrina solúveis, que geram um coágulo instável (fraco). A trombina também converte o fator XIII (fator de estabilização da fibrina) em fator ativo XIII (fator XIIIa) que, na presença de cálcio, catalisa a formação de pontes covalentes entre dois polímeros de fibrina adjacentes, criando assim polímeros insolúveis de fibrina (Barros *et al.*, 2009)

O selante comercializado é produzido a partir de trombina bovina e do fibrinogênio humano, podendo transmitir, assim, doenças infecciosas (Barros *et al.*, 2009). Desta maneira, um novo selante de fibrina foi desenvolvido, sendo este não produzido a partir de sangue humano. Para a fabricação do selante, o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, que possui uma fração trombina-like ou trombina-símile (do complexo giroxina) com habilidade de transformar o fibrinogênio diretamente em fibrina. Esta fração do complexo giroxina foi extraída e usada no lugar de trombina bovina. Gyroxina é um componente neurotóxico e pertence ao grupo das enzimas que se assemelham a trombina, e é uma importante proteinase de serina. Estas enzimas isoladas não têm efeitos letais, mas combinadas com outras substâncias do veneno contribuem para o efeito tóxico (Barros *et al.*, 2009). O complexo giroxina age sobre fibrinogênio animal e humano quebrando-o em peptídeos de fibrina. Os monômeros de fibrina se polimerizam em coágulos que são diferentes daqueles gerados pela

trombina, pois eles são facilmente dissolvidos pois são mais suscetíveis à ação de agentes fibrinolíticos. Portanto, o novo selante substitui o uso de fibrinogênio humano (Barros *et al.*, 2009).

Segundo Gille *et al.* (2005), a cola de fibrina é considerada um veículo biológico adequado para células, pois não apresenta efeitos adversos sobre ensaios *in vitro* com cultura de células. Estes pesquisadores utilizaram a cola de fibrina com o intuito de liberar e estabilizar as células na interface de uma lesão. Esta demonstrou ser um suporte reabsorvível capaz de ser usado em matriz associada ao transplante de condrócitos autólogos para permitir a multiplicação celular, estimular a formação de matriz e para conectar novas células e matriz ao tecido recém formado.

Quando a cola de fibrina foi usada para reparação de nervo periférico, os resultados indicaram que não houve prejuízo no crescimento axonal e há economia de duas a três vezes do tempo necessário comparado à sutura. Avaliações funcionais de resultados histológicos comparando a quantidade de fibrose anastomótica, regeneração axonal e alinhamento dos fascículos demonstram que a cola de fibrina é tão boa, senão superior à neurografia (Silver *et al.*, 1995).

## **1.6 Células Tronco Mesenquimais**

A medula óssea contém, além de células tronco hematopoiéticas e células tronco endoteliais, uma pequena população de células tronco, denominadas mesenquimais (MSC). Esta população de células tronco mesenquimais não-hematopoiéticas é definida pela sua habilidade de aderir a superfícies plásticas (Ladak *et al.*, 2011). Além disso, essas células possuem duas importantes características: podem se diferenciar em diversas linhagens de células mesodérmicas, tais como: condrócitos, osteócitos e adipócitos e secretam grande espectro de macromoléculas bioativas que são

imunomodulatórias e atuam para estruturar o microambiente regenerativo em áreas de injúria (Caplan, 2007).

Células tronco mesenquimais indiferenciadas demonstraram influenciar positivamente o crescimento de neuritos em neurônios sensitivos, *in vitro*, indicando que estas células apresentam ação neurotrófica quando em estado indiferenciado (Ladak *et al.*, 2011).

No modelo de esclerose múltipla, encefalomielite autoimune experimental (EAE), a injeção sistêmica de MSC no início da doença diminui a infiltração de células T, células B e macrófagos no SNC. Neste modelo, ainda, as MSC não só migraram para os órgãos linfóides, como também para o SNC, onde elas demonstraram um efeito protetor sobre os axônios *in situ* (Gerdoni *et al.*, 2007; Uccelli *et al.*, 2008). Vale ressaltar que o efeito não está relacionado com a transdiferenciação das MSC em fenótipos neurais, mas sim à secreção de moléculas com funções anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e tróficas (Uccelli *et al.*, 2008). Esse efeito protetor das células é suportado por estudos em outros modelos de doenças, sejam elas neurológicas ou não. No acidente vascular encefálico em ratos, por exemplo, as MSC agem liberando fatores tróficos e induzindo a neurogênese (Li *et al.*, 2002). A terapia celular com MSC, em camundongos diabéticos, demonstrou agir induzindo os progenitores locais de células  $\beta$  e inibindo as células T -  $\beta$  específicas (Urbán *et al.*, 2008).

Estas propriedades, unidas à facilidade com que as células tronco mesenquimais podem ser obtidas a partir da medula óssea ou do tecido adiposo e expandidas *in vitro* (Morales, 2007), fazem com que elas sejam uma ferramenta promissora para o tratamento de um amplo espectro de doenças e lesões (Hell, 2008), além de ser viável associá-las às técnicas de tubulização em nervos periféricos.

## 1.7 Novos métodos para análise da progressão da regeneração nervosa

Atualmente, existem diversos métodos para avaliar o sucesso na regeneração após injúrias do sistema nervoso periférico. O método usando mais frequentemente é a contagem de axônios (Wood *et al.* 2011), que depende da secção histológica do tecido. Porém, em vários casos, este método leva a uma informação espacial incompleta e fica sujeita, portanto, a interpretações errôneas. Em particular, existem vários relatos sobre a eficiência das intervenções experimentais que produzem regeneração axonal após injúria (Stewart *et al.*, 2003). A maior razão para esta discrepância é que as secções teciduais fornecem uma imagem bidimensional dos axônios em regeneração, mostrando apenas fragmentos. Por isso, na maioria dos casos, torna-se incerto de onde o axônio em regeneração deriva e onde este termina (Ertürk *et al.*, 2012).

Um método potencial para superar este obstáculo é o clareamento óptico dos tecidos, através do uso de solventes orgânicos que fazem com que os tecidos tornem-se transparentes por combinar os índices de refração das diferentes camadas do tecido com o do solvente. No tecido clareado a luz não dispersa e penetra nas diferentes camadas do tecido (Ertürk *et al.*, 2012).

Para tanto, em geral, o primeiro passo do clareamento tecidual é a desidratação, devido ao baixo índice de refração da água quando comparado com as estruturas teciduais que contém proteínas e lipídios. Posteriormente, segue-se imersão do tecido em um agente de clareamento óptico como benzil álcool - benzil benzoato (BABB) (Keller *et al.* 2012) ou dibenzil éter (DBE) (Ertürk *et al.*, 2011). Estes agentes possuem o mesmo índice de refração que o tecido impregnado, de forma que o tecido, portanto, se torna transparente. Quando observados sob o microscópio, a luz não dispersa possibilitando o imageamento do mesmo em maiores profundidades (Ertürk *et al.*, 2011).

Nesse sentido, foi desenvolvida uma técnica de clareamento tecidual baseada na desidratação do tecido com tetraidrofurano (THF). Através da aplicação desta técnica encéfalos, medulas espinais, troncos encefálicos, glândulas mamárias, baço de roedores foram clareados (Ertürk *et al*, 2012). De acordo com este protocolo, o tecido é desidratado com THF, o que fornece manutenção da intensidade da fluorescência e *background* reduzido e impregnado opticamente com DBE, que também fornece manutenção da intensidade da fluorescência (Becker *et al.*, 2012). Utilizando este método, Ertürk e colaboradores (2011) determinaram as trajetórias de axônios sensoriais em regeneração na medula espinal.



## 2. Justificativa

Atualmente, as lesões nervosas periféricas amplas são corrigidas cirurgicamente com o autoenxerto de nervos cutâneos (nervo sural ou safeno). Em caso de lesão de nervos digitais, o emprego de próteses tubulares já é uma alternativa viável. Apesar da capacidade regenerativa do SNP, o reparo da lesão periférica, mesmo em situações ideais, não resulta em recuperação motora e sensitiva total, havendo portanto um déficit permanente que influencia na qualidade de vida do paciente. Com o advento da bioengenharia, surge uma nova gama de pesquisas com biomateriais, entre os quais podemos destacar o poli ácido lático (PLLA) e a poli-caprolactona (PCL). Estes se constituem numa alternativa para construção de próteses tubulares, visto que apresentam propriedades físicas e químicas de grande interesse no campo da regeneração nervosa periférica, tais como o tempo de bioabsorção, biocompatibilidade e bioatividade, além de poderem ser confeccionados com as dimensões desejadas.

Sabe-se que as células tronco mesenquimais, com sua capacidade de estimular localmente diferentes tipos celulares especializados, permite uma abordagem admissível para o tratamento de lesões nervosas periféricas, principalmente quando associadas a elementos como a cola de fibrina, que permite dar suporte às células no sítio da lesão enquanto ocorre a regeneração.

Em virtude da problemática referida acima, este trabalho tem por finalidade estudar o modelo da tubulização com aplicação do selante de fibrina e a adição de células tronco mesenquimais no interior da prótese de PCL confeccionada pelo método do solvente. Tal abordagem pode vir a auxiliar no reparo de nervos periféricos sem a necessidade de autoenxerto. Além disso, permitirá um melhor

entendimento da biologia da regeneração nervosa, bem como da interação de células tronco mesenquimais e do selante de fibrina com as células residentes do nervo após o reparo.

Complementarmente, o trabalho traz a possibilidade de um novo método de análise da progressão regenerativa no sistema nervoso periférico através do clareamento ótico dos nervos lesionados de animais transgênicos e observação sob 2P-LSM.

# CAPÍTULO I



# 3. Objetivos

## 3.1 - Objetivo Geral

Estudar a influência das células tronco mesenquimais, enxertadas com cola de fibrina no interior de tubos de PCL, sobre a regeneração nervosa periférica.

## 3.2 - Objetivos específicos

### 3.2.1 - *In vitro*

1) Estabelecer e caracterizar fenotipicamente as células tronco mesenquimais de animais transgênicos para a proteína GFP extraídas da medula óssea.

### 3.2.2 - *In vivo*

1) Quantificar e examinar morfometricamente os axônios mielinizados de nervos dos animais de diferentes grupos experimentais, após o período de 60 dias pós-operatórios, por meio da microscopia de luz.

2) Estudar a expressão, através da imunistoquímica, de neurofilamentos (NF-L - 70 kDa), S-100, colágeno tipo IV, p75<sup>NTR</sup> e BDNF nos nervos regenerados de animais dos diferentes grupos experimentais, após o período de 60 dias pós-operatórios.

3) Analisar a recuperação funcional dos animais dos grupos experimentais através do *Walking Track Test (CatWalk)*.



# 4. Materiais e Métodos

## 4.1 - *In vitro*

### 4.1.1 - Extração e cultura de células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais obtidas a partir da medula óssea foram extraídas de ratos Lewis adultos. Os animais foram sacrificados com uma dose letal de quetamina/xilasina e tiveram suas tíbias e fêmures extraídos. Em meio estéril, as epífises dos ossos coletados foram cortadas expondo a medula óssea. Esta foi retirada através do influxo de meio DMEM previamente preparado, com o auxílio de uma seringa de 15mL. As células foram coletadas em tubo de 50mL (Falcon) e centrifugadas a 1400rpm, por 5 minutos, a 10°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo a fração celular foi suspenso em meio de cultura basal (Maniatopoulos *et al.*, 1988).

Para alguns experimentos foi necessária a utilização de células tronco mesenquimais derivadas de ratos Lewis transgênicos para proteína GFP com o intuito de comprovar a sobrevivência celular pós-implante. O procedimento para obtenção destas células é exatamente o mesmo que aquele para as células tronco mesenquimais do tipo selvagem.

O meio de cultura foi substituído a cada 2 dias. Para contagem do número de células adicionadas na placa de cultura foi utilizada a seguinte fórmula: número de quadrantes contados (câmara de Neubauer) X 10.000 (fator de correção) = número de células por mililitro (cel/ml).

#### 4.1.2 - Análise fenotípica das células tronco mesenquimais por citometria de fluxo

As MSC foram caracterizadas através da análise da presença das seguintes moléculas de superfície celular: CD90, CD54, CD73 e RT1A (MHC I). Essas proteínas são expressas por células tronco mesenquimais, sendo então utilizadas como “marcadores” positivos destas células (Dominici *et al.*, 2006; Delorme *et al.*, 2007).

Para verificar a existência de contaminações da cultura de células tronco mesenquimais por células tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença da molécula de superfície celular CD45, que é considerada “marcador” positivo destas células. Foram ainda usados como controles negativos os anticorpos anti-CD11b/c (marcador de monócitos e macrófagos), anti-CD34 (marcador de células tronco hematopoiéticas e células endoteliais) e anti-I-Ad/I-Ed (antígeno que corresponde ao MHC II, expresso em linfócitos e células apresentadoras de antígenos).

Para a citometria de fluxo, foram utilizadas MSC na quarta passagem. Após o tratamento com tripsina, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os anticorpos primários (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Anticorpos primários usados no ensaio de citometria de fluxo para caracterização das MSC. Cada anticorpo é seguido pelo fornecedor, animal hospedeiro, código do produto e concentração utilizada.

<b>Anticorpo</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Código</b>	<b>Concentração</b>
<b>CD 90</b>	BD Biosciences	camundongo	554892	1/250
<b>CD 54</b>	BD Biosciences	camundongo	554967	1/250
<b>CD 73</b>	BD Biosciences	camundongo	551123	1/250
<b>RT1A (MHCI)</b>	BD Biosciences	camundongo	554917	1/250
<b>CD 45</b>	BD Biosciences	camundongo	555480	1/250
<b>CD 11b/c</b>	BD Biosciences	camundongo	554859	1/250
<b>CD 34</b>	Santa Cruz	camundongo	SC7324	1/250
<b>I-Ad/I-Ed (MHC II)</b>	BD Biosciences	camundongo	558593	1/250

As células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes: A-11001), diluído 1 / 500, por 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS, fixadas em formaldeído 2% e analisadas no citômetro de fluxo (Guava® easyCyte™ 6-2L Flow Cytometer, Millipore, EUA). Como controle negativo de fluorescência, também foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulidade para estabelecer a população a ser analisada.

Os experimentos foram realizados em triplicata e um mínimo de 5.000 eventos foram adquiridos, utilizando o programa InCyte (Millipore, EUA). Os dados obtidos foram analisados no programa FlowJo 7.5.6. Primeiramente, a população de células a ser estudada foi delimitada através

das regiões definidas no gráfico de tamanho versus granulosidade gerado pela análise de células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação. Posteriormente, utilizamos um gráfico de histograma para delimitar a região do controle negativo de fluorescência, referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo marcado com Alexa. A partir da definição destes parâmetros, iniciamos a análise das células marcadas com os anticorpos primários e secundários.

## **4.2 - *In vivo***

### **4.2.1 - Animais e grupos experimentais**

Para o estudo *in vivo*, foram utilizados ratos da linhagem Lewis, fêmeas adultas, obtidas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Inicialmente, os animais foram separados em dois procedimentos metodológicos (microscopia e imunoistoquímica) para, na sequência, serem divididos em grupos controles e experimentais (**Tabela 2**). Os experimentos executados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (CEUA; nº 2076-1).

**Tabela 2:** Número de animais e grupos propostos no projeto.

Grupos	Técnica/ Número de animais		
	Microscopia	Imunoistoquímica	Catwalk
Nervo Contralateral	5	5	-
Tubo vazio (PCL)	5	5	5
Tubo + cola de fibrina (FG)	5	5	5
Tubo + cola de fibrina + células tronco (FG+MSC)	5	5	5

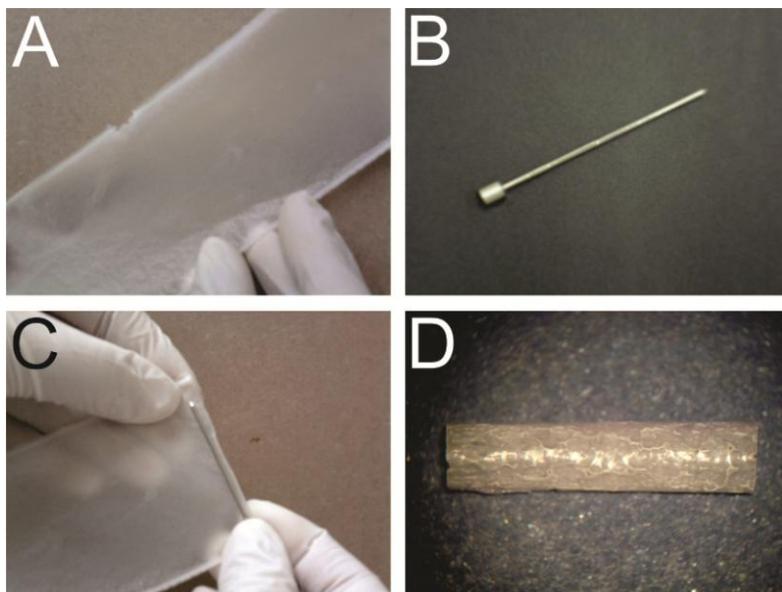
Os animais foram alojados em gaiolas plásticas, com livre acesso à ração e água *ad libitum*, com controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) e temperatura de 21°C. Os experimentos foram conduzidos seguindo as normas de ética na experimentação animal.

#### 4.2.2 - Construção das próteses para a tubulização (Fig. 2)

A confecção das membranas utilizadas para a confecção das próteses tubulares foi realizada na Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP pela técnica do solvente. Para isto, foi adicionado 1,65g de poli caprolactona (PCL) em 33ml de solvente (dicloroetano). A seguir, a solução foi deixada em temperatura ambiente por 12 horas para completa homogeneização. No dia seguinte, a solução foi colocada em uma placa contida no interior de uma cuba de vidro com o meio saturado de solvente.

Foram esperadas 12 horas para completa evaporação do material, e a membrana foi retirada da cuba, sendo esta colocada em uma câmara de vácuo por 5 minutos, de forma que eventuais resíduos do solvente não permanecessem nas membranas. A seguir, as membranas foram moldadas em

suportes com diâmetro de 1,6mm (Evans *et al.*, 1999), e as paredes aderidas com adesivo tissular (Histoacryl®, B Braun), sendo então cortadas com 10mm de comprimento (**Figura 2**).



**Figura 2:** Imagens do procedimento para obtenção do tubo de policaprolactona. Em **A**, o aspecto da membrana de PCL que é moldada no suporte em **B** (**C**). Em **D**, aspecto do tubo de PCL após fixação das extremidades, retirada do excesso de material e corte no tamanho desejado.

#### 4.2.3 - Obtenção da cola de fibrina

A cola de fibrina é preparada a partir do veneno puro, filtrado e liofilizado extraído de serpentes adultas da espécie *Crotalus durissus terrificus*, de ambos os sexos e combinado com o crioprecipitado de sangue extraído de búfalos adultos, fêmeas, mantidos na Fazenda Experimental Lageado da Faculdade de Agronomia de Botucatu, UNESP. O nível de fibrinogênio e o tempo de coagulação são calculados conforme desejado para o modelo experimental. A cola consta de 3 soluções que conjugadas no local designado exerce a função de selante e de suporte para as células implantadas.

#### 4.2.4 - Procedimento cirúrgico: tubulização (Fig. 3)

Após anestesia (0,2ml de cetamina e 0,2ml de xilazina, 0,2ml/100g peso corpóreo, intraperitoneal), os animais foram submetidos à tricotomia da coxa esquerda. Em seguida, colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico. A pele foi incisada e, afastando-se a musculatura, o nervo isquiático foi exposto **(A)** e transecionado. Após a retração dos cotos, foram realizadas as propostas para os grupos do projeto.

O implante dos tubos foi conduzido introduzindo e fixando os cotos nervosos com um ponto cirúrgico na prótese tubular (fio mononylon 8-0, Ethicon), mantendo o alinhamento e deixando um espaço de 6–7mm entre os cotos. No grupo no qual houve a adição de cola de fibrina no interior do tubo, fez-se isso com a ajuda de uma pipeta após fixação do coto proximal **(B)**. Já no grupo com adição de cola de fibrina e células tronco mesenquimais, a cola foi previamente colocada após a fixação do coto proximal, seguiu-se a fixação do coto distal e, posteriormente as células foram enxertadas com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* de espessura capilar acoplada a uma seringa de Hamilton **(C)**.

Encerrado este procedimento, o plano muscular foi suturado com um fio de seda 7-0 e a pele suturada com 3 pontos cirúrgicos (fio mononylon 4-0, Ethicon). Os animais foram mantidos em biotério, recebendo ração e água *ad libitum*.



**Figura 3:** Procedimento cirúrgico para tubulização do nervo isquiático. Em **A**, incisão da pele da região pósteromedial da coxa esquerda, e o afastamento da musculatura para exposição do nervo isquiático. **B**, fixação do coto proximal com um ponto cirúrgico na prótese tubular. **C**, fixação de ambos cotos nervosos na prótese tubular. Escala = 2mm.

#### **4.2.5 - Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia - Morfometria e contagem das fibras regeneradas**

Após o período de sobrevivência de 60 dias, os animais de todos os grupos foram anestesiados com 0,2ml de cetamina e 0,2ml de xilazina, 0,2ml/100g peso corpóreo, intraperitoneal, e submetidos a toracotomia e perfusão transcardíaca com 150ml de solução salina tamponada (NaCl 0,9% em PB 0,1M, pH 7,4). A fixação foi realizada pela perfusão de 300ml de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em PB 0,1M, pH 7,4. Posteriormente à fixação, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior do tubo foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 12 horas, à 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em PB 0,1M e dissecados sob lupa, sendo os cotos proximal e distal separados. Os fragmentos foram colocados individualmente em frascos e foram, então, pós-fixados por um período de 3 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em PB 0,2M. Posteriormente, os fragmentos foram lavados em água

destilada e desidratados em série de diluição crescente de álcool etílico e acetona e incluídos em resina (Durcupan ACS, Fluka).

Após polimerização da resina, os blocos contendo as porções médias dos nervos regenerados foram desbastados e secções transversais semi-finas ( $0,5\mu\text{m}$ ) obtidas e coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação ao microscópio de luz.

Para análise morfométrica, foram considerados os seguintes parâmetros: número de axônios mielinizados regenerados, diâmetro das fibras mielínicas (DFM), diâmetro dos axônios mielínicos (DAM), espessura da bainha de mielina (EBM) e razão "g" (RZG) ( $\text{RZG} = \text{DAM}/\text{DFM}$ ). O estudo do comportamento das células de Schwann em particular, é realizado a partir dos valores da EBM e da RZG, enquanto que a resposta regenerativa axonal é avaliada pelos resultados do DFM e DAM.

Para a contagem de axônios mielinizados, 4 campos representativos de cada nervo regenerado foram digitalizados com o auxílio de um microscópio Leica DM5500B conectado a uma câmera DFC292, utilizando o software LAS, versão 4.2. O número total de fibras foi estimado a partir de uma regra de três simples, levando-se em conta a área total do nervo regenerado.

Os campos amostrados também foram usados para obtenção das medidas do diâmetro das fibras e dos axônios mielinizados. Dois campos amostrados em cada nervo (em aumento de 100X) foram empregados para obtenção dos parâmetros morfométricos, procedimento que foi realizado utilizando-se o programa Adobe Photoshop CS4. Para tal, as imagens foram convertidas em preto e branco e aplicada a ferramenta "limiar". O background e as fibras incompletas foram apagados.

Os axônios foram selecionados de uma só vez através da aplicação da ferramenta de seleção apropriada e as medidas feitas automaticamente pelo programa, após devida calibração. O menor diâmetro medido de cada fibra foi utilizado para a determinação de DFM, uma vez que valores maiores

poderiam ser distorcidos pela inclinação do corte. Através da diferença entre DFM e DAM dividido por 2 é utilizado para obtenção da EBM (Mayhew & Sharma, 1984).

#### **4.2.6 - Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para imunoistoquímica**

Após perfusão com salina tamponada, seguiu-se a fixação com formaldeído a 4% em tampão de sódio 0,1M; pH 7,4. Após fixação, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior do tubo foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 4 horas a 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em PB 0,1M, pH 7,4 e dissecados sob lupa. Os nervos foram colocados individualmente em frascos contendo solução de sacarose 20% em PB 0,1M, pH 7,4 por 12 horas, sendo em seguida, incluídos em Tissue-Tek (Miles Inc., USA) e congelados à -35 a -40°C.

Cortes congelados longitudinais com 12µm de espessura do nervo regenerado na porção média do tubo foram obtidos em criostato (Leica) e as secções transferidas para lâminas gelatinizadas e estocadas a -20°C até o momento da realização das imunomarcações.

Para realização da imunoistoquímica, os espécimes, após atingirem a temperatura ambiente, foram imersos em PB 0,1M, pH 7,4. Posteriormente, as amostras foram incubadas em uma solução de soro de albumina bovina (BSA) 3% em PB 0,1M, por 1 hora, sendo, posteriormente, os anticorpos primários (**Tabela 3**) aplicados e incubados por 4 horas a temperatura ambiente ou *overnight*, a 4°C. Após lavagens em PB 0,1M, os respectivos anticorpos secundários conjugados a CY-2 ou CY-3 foram aplicados e incubados por 45 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente e montadas em glicerol/PB (3:1).

**Tabela 3:** Anticorpos primários usados no ensaio de imunistoquímica. Cada anticorpo é seguido pelo fornecedor, animal hospedeiro, código do produto e concentração utilizada.

<b>Anticorpo</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Código</b>	<b>Concentração</b>
Anti-S100	Dako	Coelho	Z0311	1/2000
Anti-neurofilamento	Dako	Camundongo	M0762	1/1500
Anti-colágeno IV	Santa Cruz	Coelho	sc-11360	1/250
Anti-NGFR p75	Santa Cruz	Coelho	sc-6188	1/200
Anti-BDNF	Millipore	Coelho	AB1534	1/1000

As lâminas imunomarcadas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon, eclipse TS 100) utilizando-se os filtros de rodamina (CY3) e fluoresceína (CY2). Foram capturadas quatro imagens representativas do nervo normal ou do nervo regenerado no interior da prótese tubular dos diferentes grupos experimentais, utilizando-se uma câmera de alta sensibilidade (Nikon, DXM 1200F).

Para a quantificação, a densidade integrada de pixels, que representa a intensidade da imunomarcção das proteínas, foi medida na área central das imagens obtidas, utilizando-se o software IMAGEJ (versão 1.33u, National Institutes of Health, USA). Foi, então, estabelecida a média para cada grupo  $\pm$  erro padrão.

#### **4.2.7 - Avaliação funcional**

Foram realizadas avaliações semanalmente em animais dos três grupos experimentais antes da lesão e até 8 semanas após tubulização. 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 detecta onde há pontos de contato no assoalho de vidro, mediante à pressão exercida pelas das patas dos animais caminhando. Através de um espelho, o assoalho do corredor é monitorado por uma câmera Fujinon DF6HA-1B equipada com uma objetiva grande angular (Cosimar 8,5 mm) que detecta a média de intensidade em pixels. A intensidade do sinal varia de acordo com a pressão aplicada pela pata do animal. Esses sinais são digitalizados pelo PCImage-SG quadro à quadro (Matrix vision GmH, Oppenheimer, Alemanha) e o programa CatWalk adquire, armazena e analisa os vídeos dos animais caminhando pelo corredor. Para o cálculo do índice de recuperação motora do nervo fibular, utilizamos dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo (*toe spread*, TS) e a distância entre o terceiro dedo e o calcanhar (*print length*, PL). Estes parâmetros foram utilizados para a medição das pegadas das patas posterior direita (normal) e posterior esquerda (lesada) e os valores aplicados na seguinte fórmula descrita por Bain, *et al* (1989):

$$\text{FFI} = 174.9 \times ((\text{ETS-NTS})/\text{NTS}) + 80.3 \times ((\text{ELP-NLP})/\text{NLP}) - 13.4$$

(E = lado lesionado, N = lado normal)

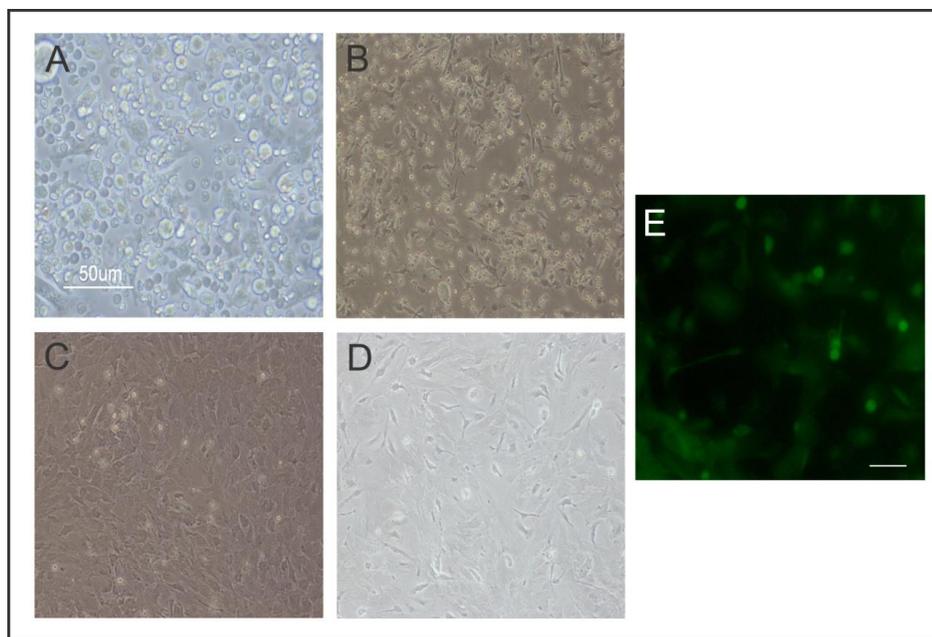
#### 4.2.8 - Análise estatística

Os dados do índice funcional do nervo fibular foram analisados pelo método da análise da variância – ANOVA de duas vias. Já a quantificação da densidade integrada de pixels, obtida através da análise das imagens de microscopia de fluorescência, o número estimado de fibras mielínicas e a área dos nervos foram analisados pelo método de análise de variância - ANOVA de uma via seguido do pós teste de Bonferroni. Assumiu-se um nível de significância igual a \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

# 5. Resultados

## 5.1 - Análise morfológica da cultura de células tronco mesenquimais (Fig. 4)

As MSC extraídas dos fêmures de tíbias de ratos Lewis e ratos Lewis-GFP foram cultivadas e o desenvolvimento das culturas acompanhado. Imagens representativas das culturas podem ser vistas na **Fig. 4**, destacando o aspecto de uma cultura de células tronco mesenquimais 48 horas após a extração (**A**), evidenciando-se a presença marcante de células não aderidas e células da linhagem hematopoiética. Em **B** vê-se uma micrografia da cultura de células 4 dias após a extração, onde percebemos grande parte das células já aderidas e pequena quantidade de células ovoides em suspensão. Já a micrografia em **C** mostra a cultura de células 11 dias após a extração, mostrando a uniformidade da cultura e a exibição da morfologia fusiforme característica das células tronco mesenquimais. Em **D**, micrografia que mostra a cultura de células tronco mesenquimais na segunda passagem. Em **E**, micrografia de fluorescência da cultura de células tronco mesenquimais extraídas de ratos Lewis-GFP, utilizadas para observarmos a sobrevivência celular no tecido, após procedimento cirúrgico.



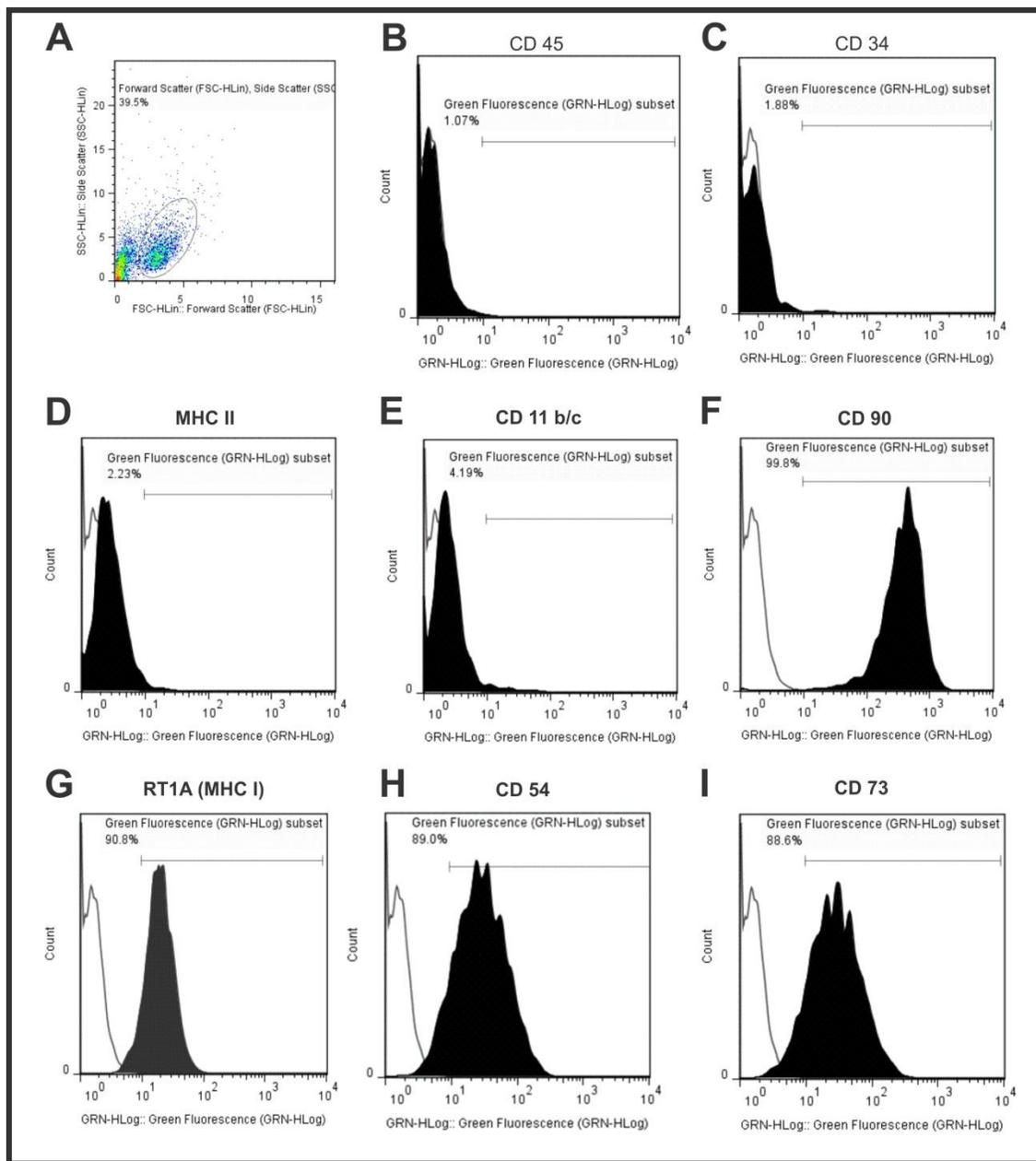
**Figura 4:** Aspecto da cultura de células-tronco mesenquimais 48h após a extração **(A)**, 4 dias após extração **(B)** e 11 dias após extração **(C)**. Já em **D**, o aspecto da cultura de células tronco mesenquimais na primeira passagem, mostrando a homogeneidade da cultura e a morfologia fusiforme característica dessas células. Em **E**, micrografia de fluorescência da cultura de células tronco mesenquimais GFP positivas. Barra de escala = 50µm.

## 5.2 - Análise fenotípica da cultura de células tronco mesenquimais por citometria de fluxo (Fig. 5 e 6)

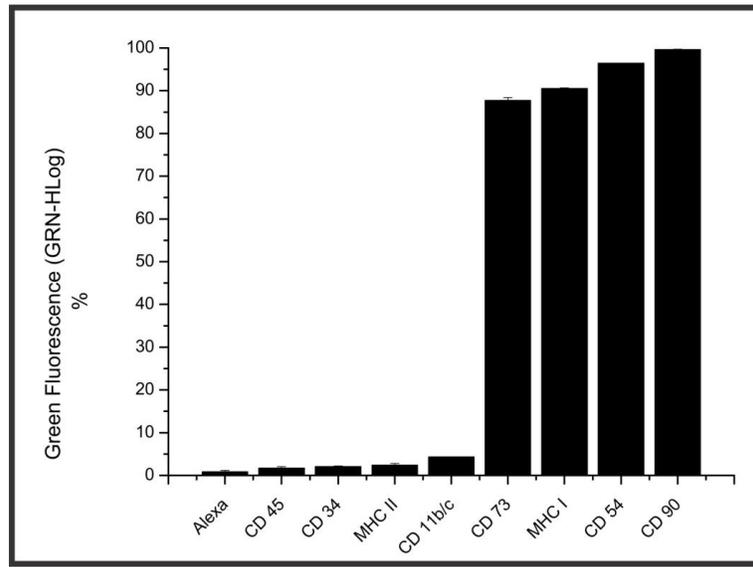
A análise quantitativa foi realizada através de ensaios de citometria de fluxo, utilizando-se os anticorpos monoclonais CD90, CD54, CD73, RT1A (MHCI), CD 45, CD11b/c, CD34 e I-Ad/I-Ed (MHCII). Os determinantes de complementaridade CD90, CD54, CD73 e RT1A são, de acordo com a literatura, moléculas eleitas para a caracterização das células tronco mesenquimais.

Cerca de 99,8% expressam CD90, 89% expressam CD54, 88,6% das células expressam CD73 e 90,8% expressam RT1A (MHCI). O determinante de complementaridade CD45, uma molécula expressa

por células hematopoéticas e seus precursores, foi detectado apenas em 1,07% das células analisadas, CD11b/c em 4,19% das células, CD34 em 1,88% das células e I-Ad/I-Ed (MHCII) em 2,23% das células **(Fig. 5 e 6)**. Esta análise permite definir uma população de células mesenquimais homogênea, claramente distinta da linhagem hematopoética. Para controle, foram utilizadas CTM submetidas apenas à incubação com o anticorpo secundário Alexa 488.



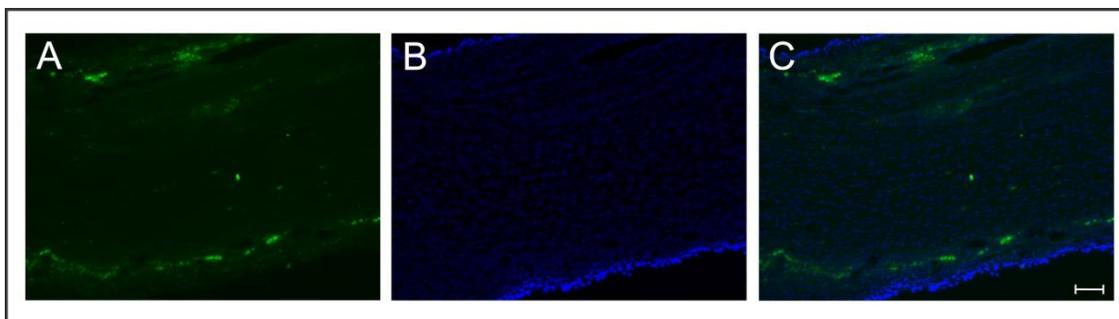
**Figura 5:** Análise fenotípica das MSC por citometria de fluxo. **A)** Gráfico de distribuição pontual FSC (tamanho) versus SSC (granulosidade) utilizado para a seleção da população analisada R1. **B-I)** Histogramas de intensidade média de fluorescência (GRN-HLog: green fluorescence) versus número de eventos (counts). **B)** CD45. **C)** CD34. **D)** MHC II. **E)** CD11b/c. **F)** CD90. **G)** MHC I (RT1A). **H)** CD54. **I)** CD 73.



**Figura 6:** Representação gráfica do percentual de células fluorescentes para cada anticorpo analisado dentro da população R1.

### 5.3 - Sobrevivência das células tronco mesenquimais no tecido (Fig. 7)

Sessenta dias após a tubulização, os animais foram sacrificados, o conjunto contendo tubo mais nervo foi extraído e os nervos dissecados e processados. Para avaliar a sobrevivência das células tronco no tecido, cortes congelados foram obtidos e analisados sob microscopia de fluorescência (**Fig. 7**). Notou-se a presença de células tronco mesenquimais GFP positivas no tecido, estando estas preferencialmente localizadas na periferia.

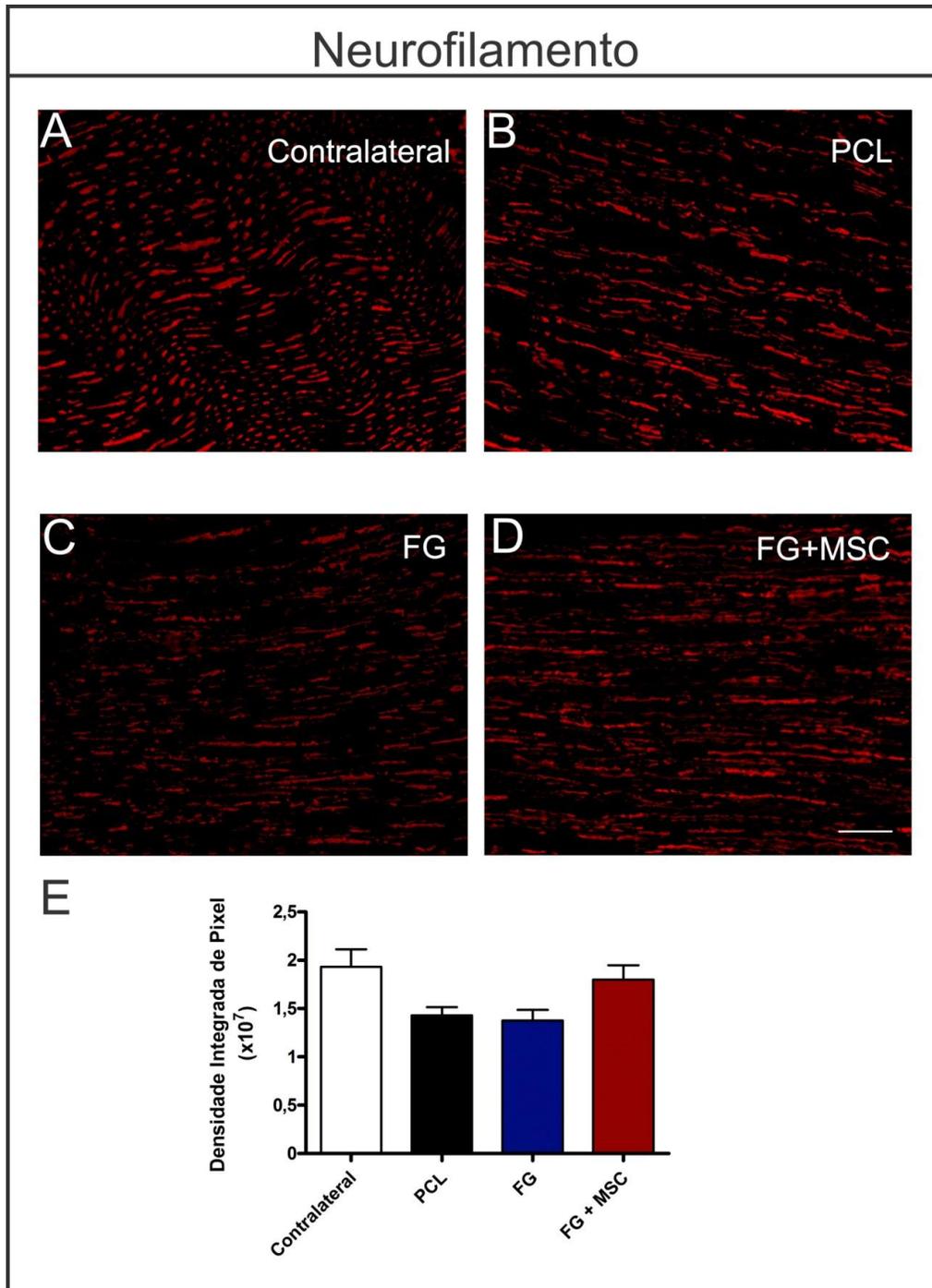


**Figura 7:** Micrografia de fluorescência evidenciando a detecção de células tronco mesenquimais GFP positivas no nervo tubulizado, 60 dias após o enxerto **(A)**, marcação com DAPI **(B)**, para observação da localização das células no nervo e as imagens combinadas **(C)**. Barra de escala = 25 $\mu$ m.

#### 5.4 - Imunoistoquímica (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12)

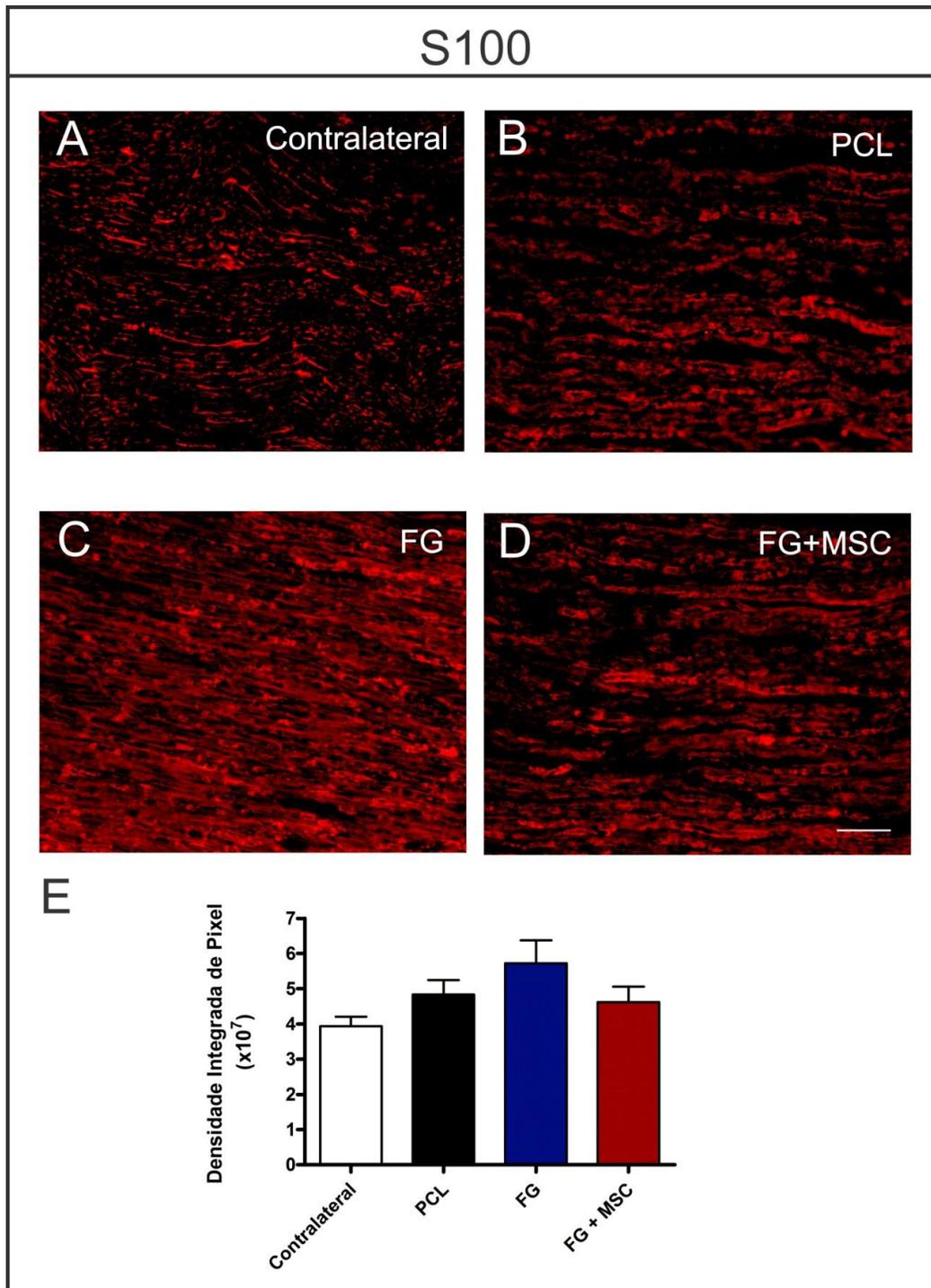
As imunomarcações foram realizadas em cortes longitudinais dos nervos regenerados, após 60 dias de sobrevivência.

Por meio do anticorpo anti-neurofilamento **(Fig. 8)**, pudemos analisar a organização dos filamentos intermediários que compõem os axônios dos nervos regenerados, bem como do nervo normal. Nos grupos PCL, FG e FG+MSC as fibras nervosas estabeleceram um padrão paralelo ao longo do eixo do nervo, enquanto que, no nervo íntegro, as fibras obedeceram um padrão paralelo ondulado. As intensidades médias das imunomarcações, quantificadas através da densidade integrada de pixels, foram  $1,9 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$  no nervo contralateral,  $1,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$  no grupo PCL,  $1,3 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$  no grupo FG e  $1,8 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$  no grupo FG+MSC. A análise estatística não apontou diferença significativa entre os grupos experimentais.



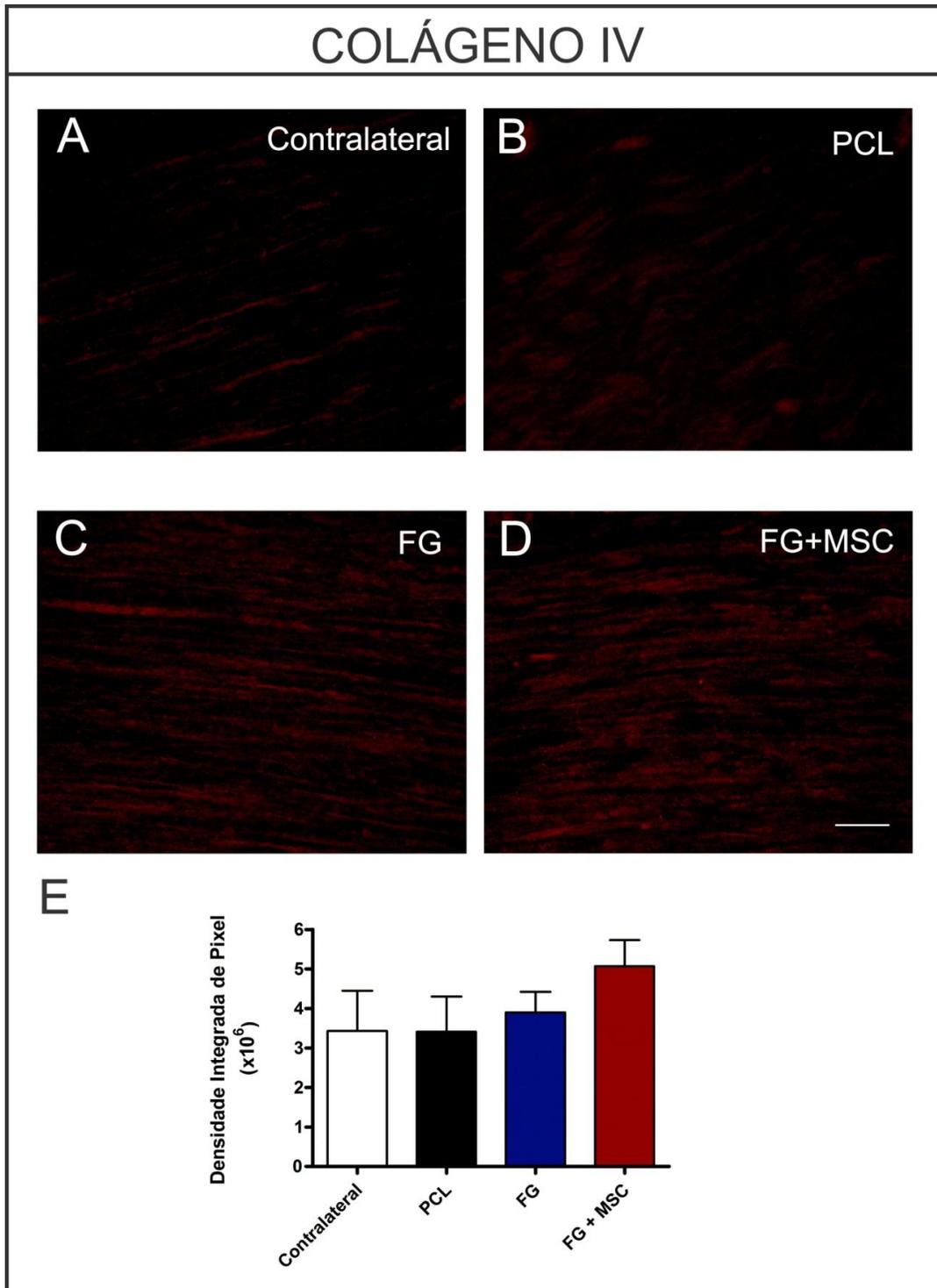
**Figura 8:** Imunomarcção anti-neurofilamento dos nervos contralaterais **(A)**, PCL **(B)**, FG **(C)** e FG+MSC **(D)**, 60 dias após tubulização. Em **E**, gráfico indicando a quantificação da densidade integrada de pixels nos grupos experimentais. Barra de escala = 100 $\mu$ m.

A imunomarcção anti-S100 (**Fig. 9**), marcador característico de células de Schwann foi intensa em nervos isquiáticos normais, bem como nos nervos regenerados no interior do tubo de policaprolactona vazio (PCL), preenchido com cola de fibrina (FG) e preenchido com cola de fibrina e enxerto de células tronco mesenquimais (FG+MSC). As intensidades médias das imunomarcções, quantificadas através da densidade integrada de pixels, foram  $3,9 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$  no nervo contralateral;  $4,8 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$  no grupo PCL;  $5,5 \times 10^7 \pm 0,6 \times 10^7$  no grupo FG e  $4,6 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$  no grupo FG+MSC. A análise estatísticas não apontou diferença significativa entre os grupos experimentais.



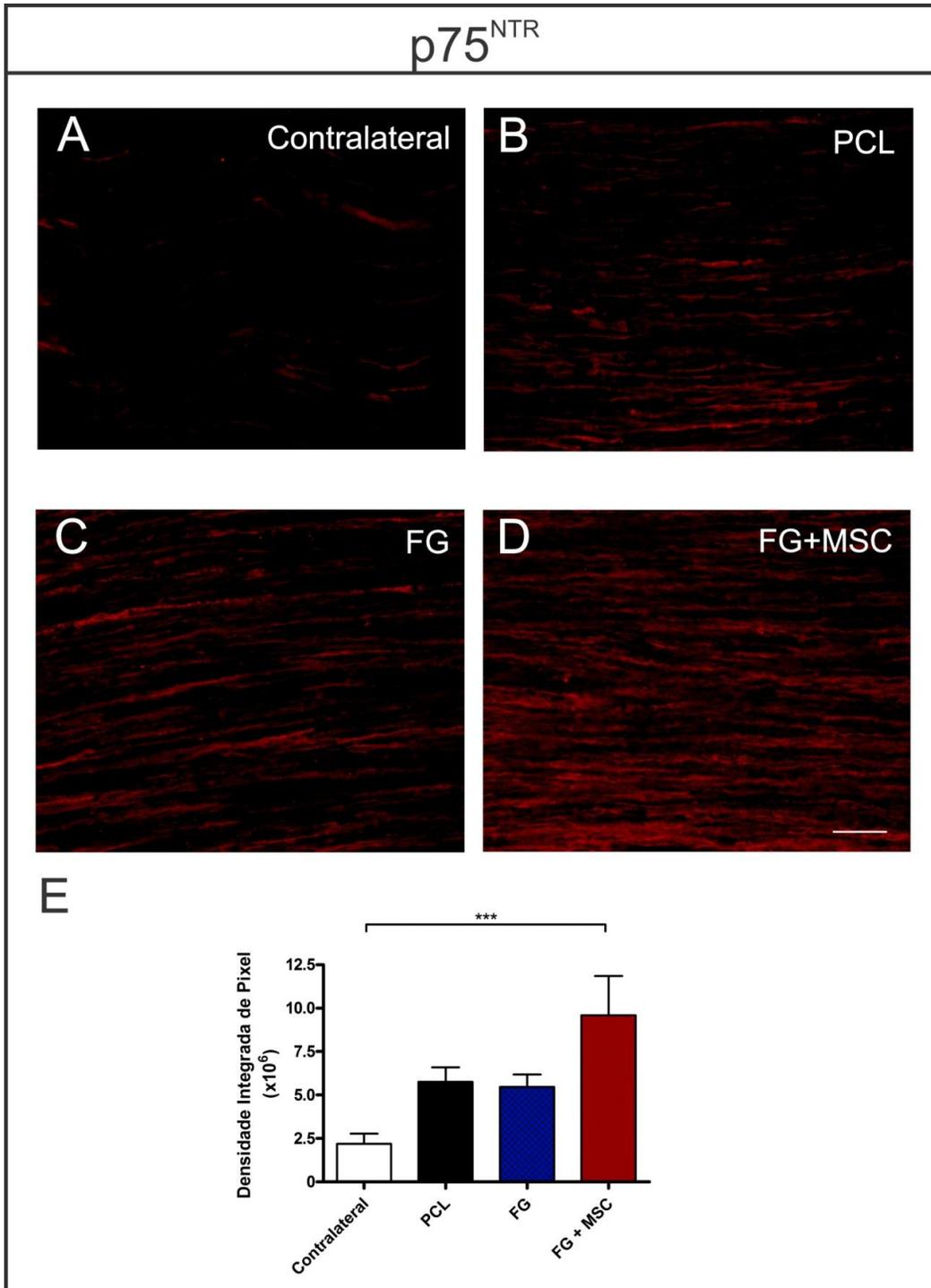
**Figura 9:** Imunomarcção anti-S100 dos nervos contralateral, PCL, FG e FG+MSC, 60 dias após tubulização. Em E, gráfico indicando a quantificação da densidade integrada de pixels nos grupos experimentais. Barra de escala = 100 $\mu$ m.

Através da utilização do anticorpo anti-colágeno IV, avaliamos a membrana basal das células de Schwann (**Fig. 10**). As intensidades médias das imunomarcações, quantificadas através da densidade integrada de pixels, foram  $3,4 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$  no nervo contralateral;  $3,4 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$  no grupo PCL;  $3,8 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$  no grupo FG e  $5,0 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$  no grupo FG+MSC. A análise estatísticas não apontou diferença significativa entre os grupos experimentais.



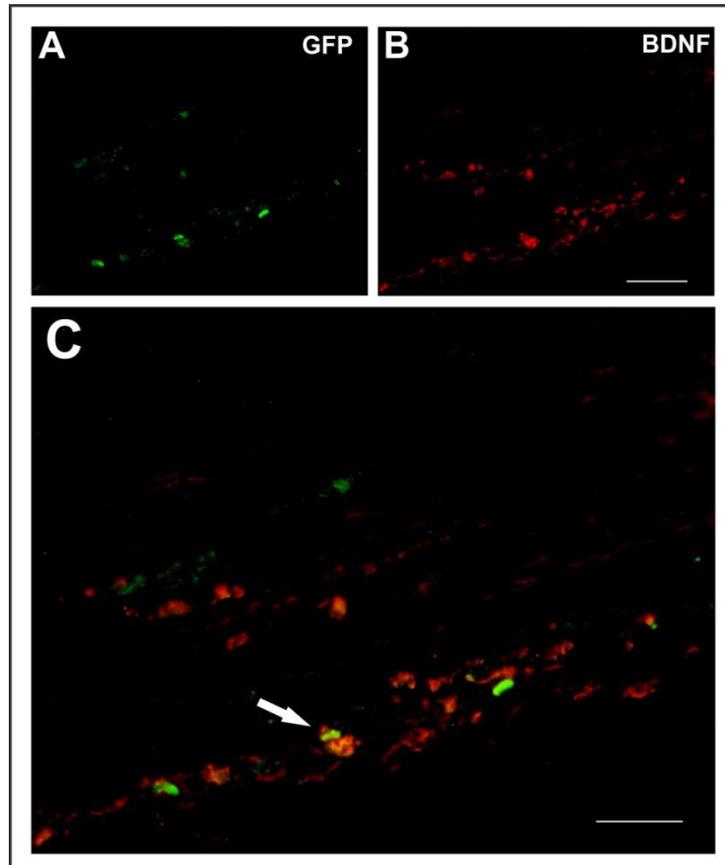
**Figura 10:** Imunomarcção anti-Colágeno IV dos nervos contralateral (A), PCL (B), FG (C) e FG+MSC (D), 60 dias após tubulização. Em E, gráfico indicando a quantificação da densidade integrada de pixels nos grupos experimentais. Barra de escala = 100 $\mu$ m.

Por meio do anticorpo anti-p75<sup>NTR</sup>, o receptor de baixa afinidade para o fator derivado do nervo (NGF) e outras neurotrofinas (como BDNF, NT3/4), pode-se obter informações sobre a reatividade das células de Schwann (**Fig. 11**). Houve uma leve marcação nos nervos normais, sendo que esta foi ampliada pelo processo regenerativo. As intensidades médias das imunomarcações, quantificadas através da densidade integrada de pixels, foram  $2,1 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$  no nervo contralateral;  $5,7 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$  no grupo PCL;  $5,4 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$  no grupo FG e  $9,5 \times 10^6 \pm 2,0 \times 10^6$  no grupo FG+MSC. A análise estatísticas apontou diferença significativa entre o grupo FG+MSC em relação ao nervo normal ( $p < 0,001$ ).



**Figura 11** : Imunomarcaco anti-p75<sup>NTR</sup> dos nervos contralateral **(A)**, PCL **(B)**, FG **(C)** e FG+MSC **(D)**, 60 dias aps tubulizao. Em **E**, grfico indicando a quantificao da densidade integrada de pixels nos grupos experimentais, sendo  $p < 0,001$ . Barra de escala = 100µm.

Através da imunomarcção anti-BDNF (**Fig. 12**), em nervos do grupo FG+MSC, foi possível detectar a colocalização das células tronco mesenquimais GFP positivas com a imunomarcção anti-BDNF.

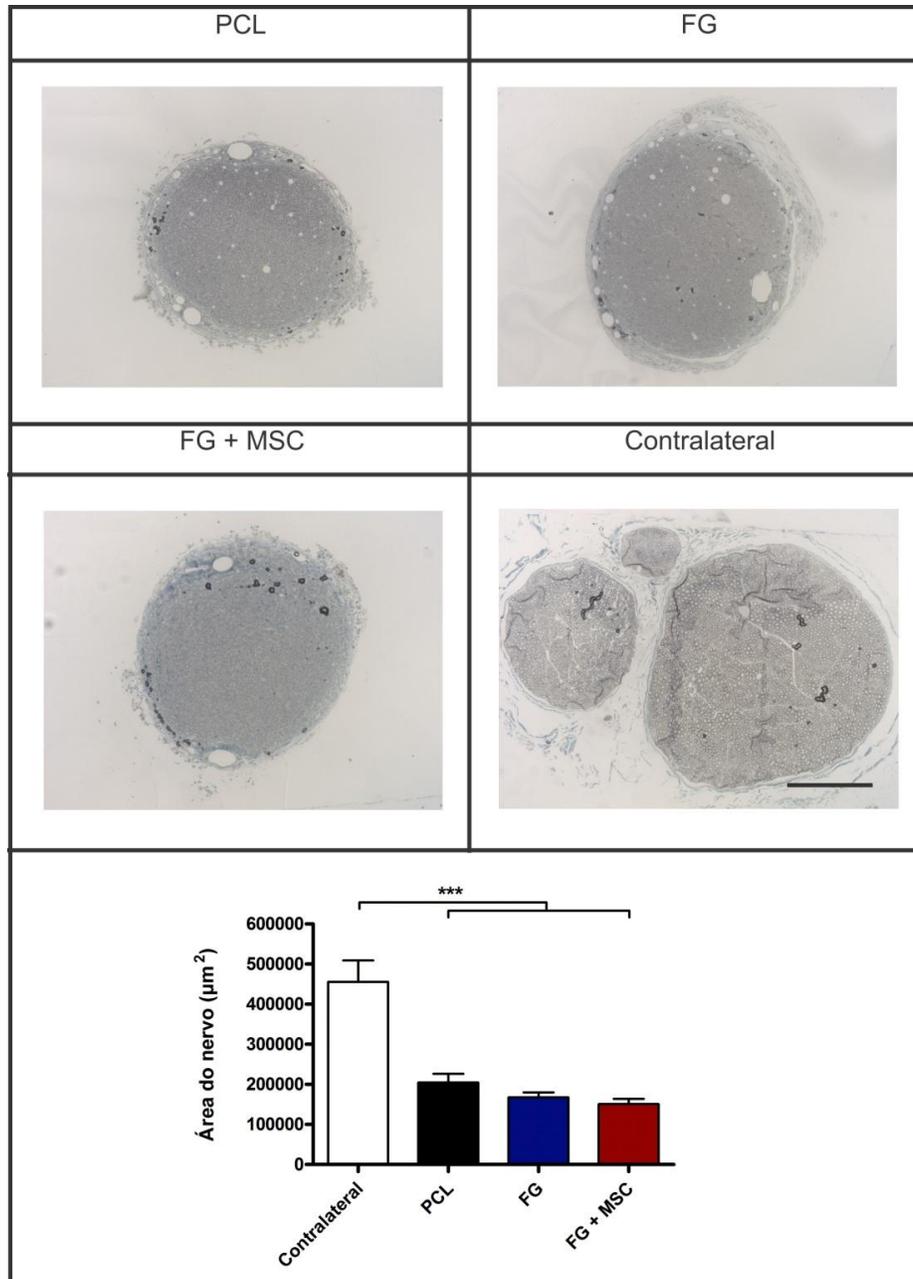


**Figura 12:** Em **A** , imagem representativa evidenciando células GFP positivas observadas nos nervos regenerados, 60 dias após tubulização. **B**, imunomarcção anti-BDNF na mesma região e **C**, presença da imunorreatividade anti-BDNF colocalizada com as MSC-GFP positivas (seta). Barra de escala = 100 $\mu$ m.

### 5.5 - Análise morfológica dos nervos regenerados (Fig. 13)

Após o período de 60 dias da tubulização, cortes transversais referentes aos grupos experimentais foram analisados sob microscópio de luz (Fig. 13).

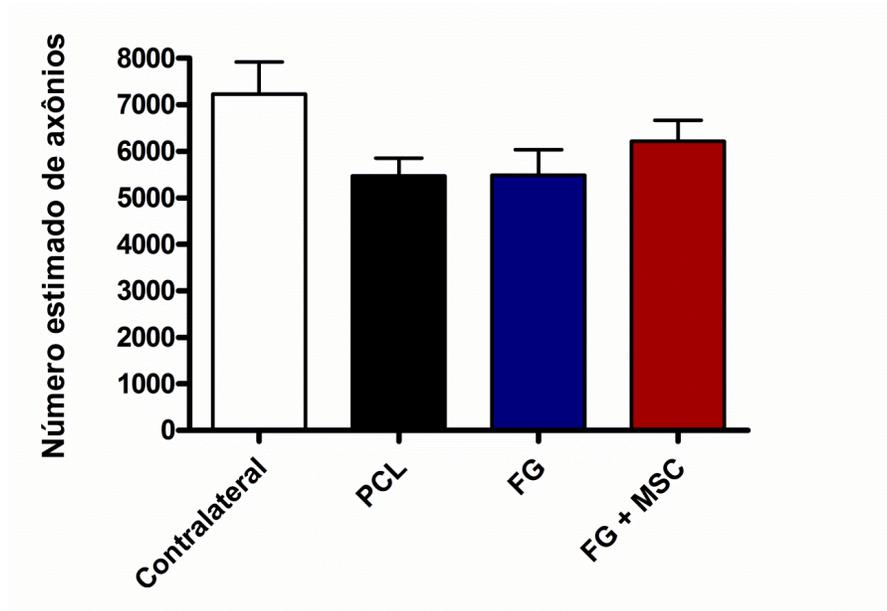
O nervo contralateral mostra a morfologia característica do nervo isquiático, sendo que, na maioria das amostras, este já havia sofrido ramificações. Nota-se também a presença de epineuro delgado, além de vasos epineurais, perineurais e endoneurais. A média da área dos nervos deste grupo (n = 5) foi de  $455.602,11 \pm 55.520\mu\text{m}^2$ . No grupo PCL observou-se epineuro delgado e, na maioria das amostras, morfologia cilíndrica característica e também formação de fasciculações entre os feixes de fibras nervosas. A média da área dos nervos (n = 5) deste grupo foi  $262.400 \pm 21.800\mu\text{m}^2$ . No grupo FG foi observado epineuro equivalente ao do grupo PCL. A média da área dos nervos deste grupo (n = 5) foi  $167.500 \pm 12.830\mu\text{m}^2$ . Já no grupo FG+MSC foi observado epineuro equivalente aos demais grupos experimentais. A média da área dos nervos deste grupo (n = 5) foi de  $150.500 \pm 53.520\mu\text{m}^2$ . Diferenças estatisticamente significantes foram detectadas quando comparadas as áreas dos nervos tubulizados dos diferentes grupos experimentais e dos nervos contralaterais.



**Figura 13:** Vista panorâmica nos nervos regenerados observados sob microscopia de luz, 60 dias após tubulização. Em **A**, implante do tubo de policaprolactona vazio, PCL, em **B**, implante do tubo de policaprolactona preenchido com cola de fibrina, FG, em **C**, implante do tubo de policaprolactona preenchido com cola de fibrina e enxerto de células tronco mesenquimais, FG+MSC e em **D**, nervo contralateral. Em **E**, gráfico mostrando a quantificação das áreas. Escala = 100µm.

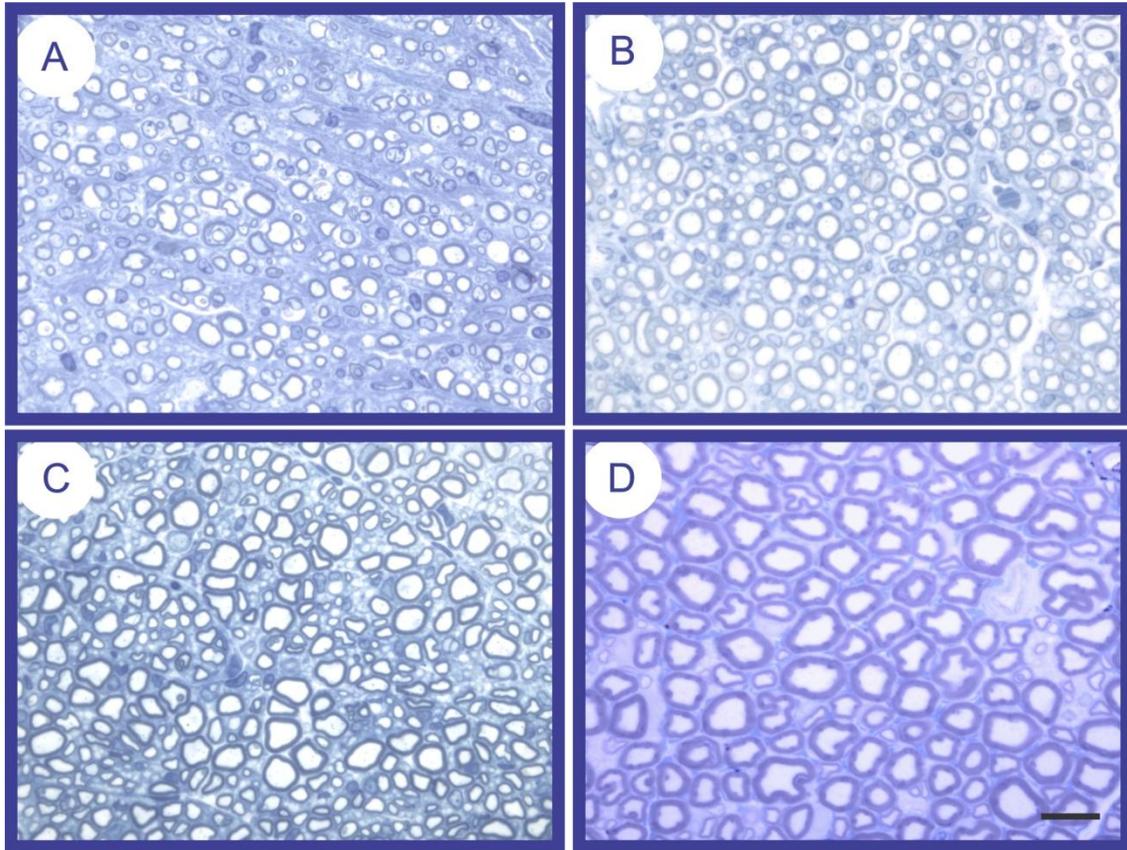
## 5.6 - Quantificação dos axônios mielinizados (Fig. 14, 15 e 16)

Sessenta dias após a tubulização, os nervos contralaterais apresentaram número médio de  $7.235 \pm 689,8$  fibras regeneradas. No grupo PCL obteve-se a média de  $5.477 \pm 381,3$  axônios mielinizados. Já no grupo FG houve a regeneração de  $5.493 \pm 941,9$  axônios mielinizados, em média, enquanto que no grupo FG+MSC foi obtido o número médio de  $6.216 \pm 452$  fibras regeneradas (**Fig. 14**). Não houve diferença estatística nos valores das estimativas do número de axônios mielínicos obtidas referentes aos grupos experimentais.

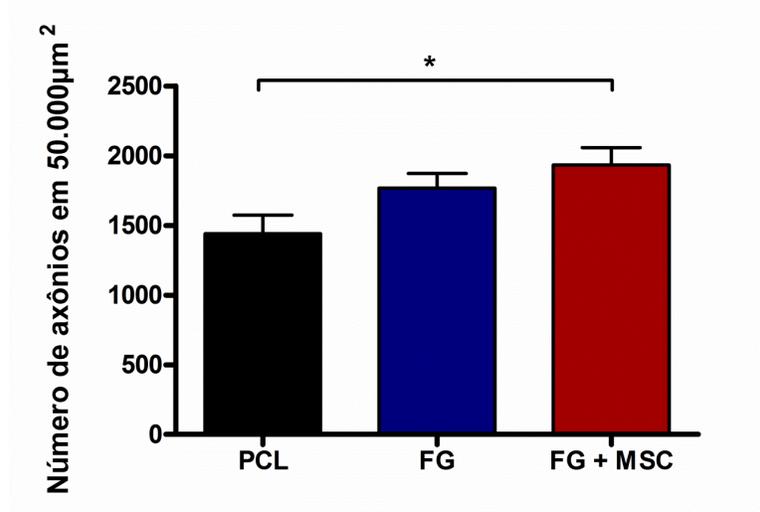


**Figura 14:** Gráfico contendo o número médio da estimativa total de fibras regeneradas  $\pm$  erro padrão, nos nervos contralaterais e nos grupos PCL, FG e FG+MSC.

Através da quantificação por área fixa ( $50.000\mu\text{m}^2$ ) obtivemos o número médio de  $1.440 \pm 132,9$  fibras por  $50.000\mu\text{m}^2$  no grupo PCL,  $1.769 \pm 103,5$  no grupo FG e  $1.932 \pm 126,5$  no grupo FG+MSC, sendo a estimativa média do grupo FG+MSC significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que a estimativa média do grupo PCL (**Fig. 16**).



**Figura 15:** Micrografias de luz dos nervos regenerados 60 dias após tubulização. Implante do tubo de policaprolactona vazio, PCL **(A)**, implante do tubo de policaprolactona preenchido com cola de fibrina, FG **(B)**, implante do tubo de policaprolactona preenchido com cola de fibrina e enxerto de células tronco mesenquimais, FG + MSC **(C)** e nervo contralateral **(D)**. Escala = 10 $\mu$ m.



**Figura 16:** Gráfico contendo o número estimado de fibras regeneradas em  $50.000\mu\text{m}^2 \pm$  erro padrão nos grupos PCL, FG e FG+MSC, sendo  $p < 0,01$

## 5.7 - Parâmetros Morfométricos

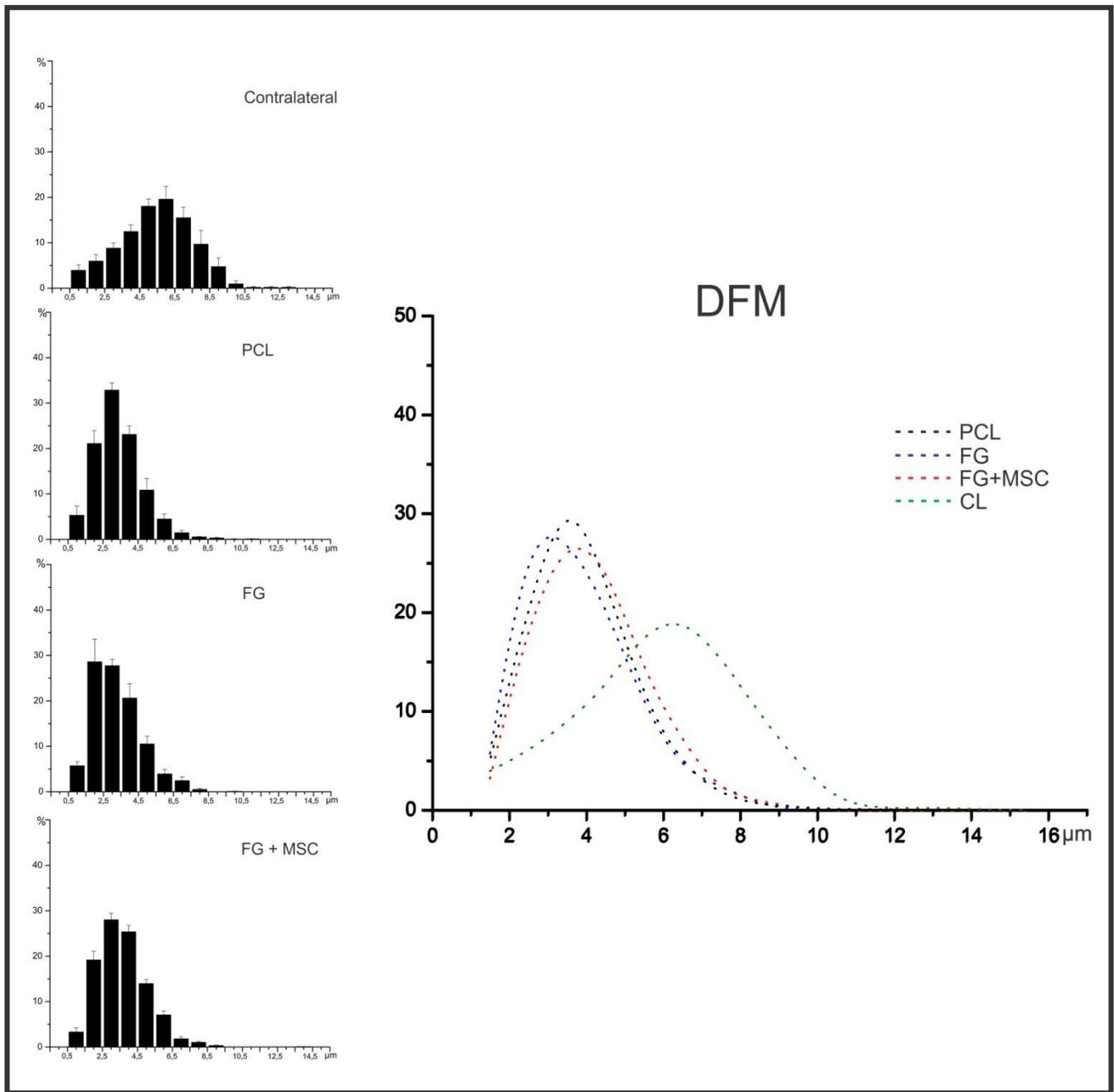
### 5.7.1 - Diâmetro das Fibras Mielínicas (Fig. 17 e 18)

Os nervos contralaterais apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando entre 0,5 a 12,5  $\mu\text{m}$ , sendo a média igual a  $4,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . As maiores porcentagens das fibras foram encontradas nos intervalos de 4,51 a 5,5  $\mu\text{m}$ , de 5,51 a 6,5  $\mu\text{m}$  e de 6,51 a 7,5  $\mu\text{m}$ , o que corresponde a 18%, 19,5% e 15,5%, respectivamente.

Os animais do grupo PCL, 60 dias após a tubulização, apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando entre 0,5 e 10,9  $\mu\text{m}$ , sendo a média igual a  $3,2 \pm 0,04 \mu\text{m}$ . As maiores porcentagens das fibras foram encontradas nos intervalos de 1,51 a 2,5  $\mu\text{m}$ , de 2,51 a 3,5  $\mu\text{m}$  e de 3,51 a 4,5  $\mu\text{m}$ , o que corresponde a 21,1%, 32,8% e 23,1%, respectivamente.

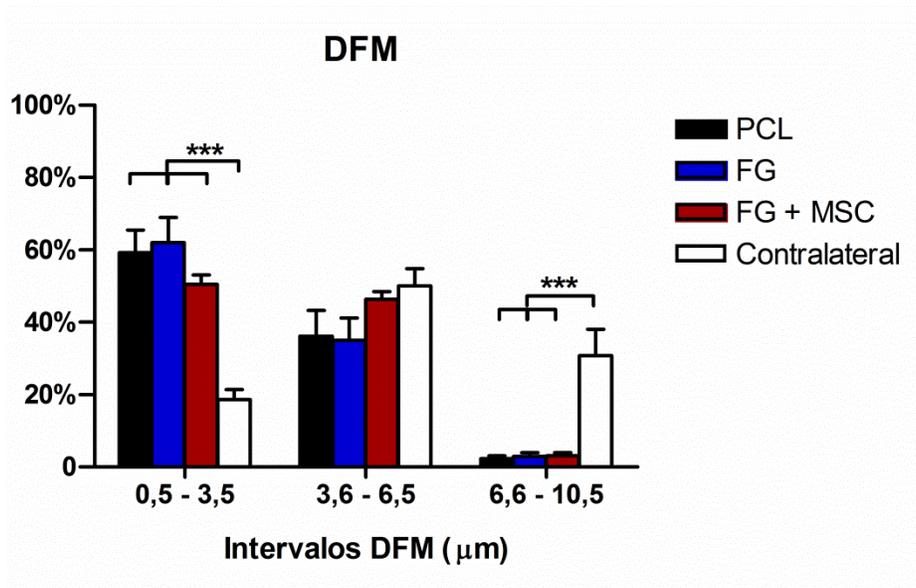
Quanto ao grupo FG, os nervos tubulizados apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando entre 0,5 e 10,4  $\mu\text{m}$ , sendo a média igual a  $3,03 \pm 0,03 \mu\text{m}$ . As maiores porcentagens das

fibras foram encontradas nos intervalos de 1,51 a 2,5 $\mu$ m, de 2,51 a 3,5 $\mu$ m e de 3,51 a 4,5 $\mu$ m, o que corresponde a 28,6%, 27,7% e 20,6%, respectivamente. Os nervos dos animais do grupo FG+MSC apresentaram fibras mielínicas com diâmetro variando entre 0,5 e 14,0 $\mu$ m, sendo a média igual a 3,47  $\pm$  0,03  $\mu$ m. As maiores porcentagens das fibras foram encontradas nos intervalos de 1,51 a 2,5 $\mu$ m, de 2,51 a 3,5 $\mu$ m e de 3,51 a 4,5 $\mu$ m, o que corresponde a 19,1%, 28,0% e 25,3%, respectivamente.



**Figura 17:** Distribuição de frequência do diâmetro das fibras mielínicas (DFM) regeneradas nos diferentes grupos experimentais e gráfico de sobreposição das curvas.

A análise estatística do diâmetros das fibras mielínicas (**Fig. 18**) mostrou diferença significativa nos intervalos: de 0,5 a 3,5 $\mu\text{m}$  entre o grupo contralateral e os demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ); de 6,51 a 10,5 $\mu\text{m}$  entre o grupo contralateral e os demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). No intervalo de 3,51 a 6,5 $\mu\text{m}$  não houve diferença estatística entre os grupos.



**Figura 18:** Análise estatística comparativa dos grupos experimentais nos respectivos intervalos da DFM, sendo \*\*\*  $p < 0,001$ .

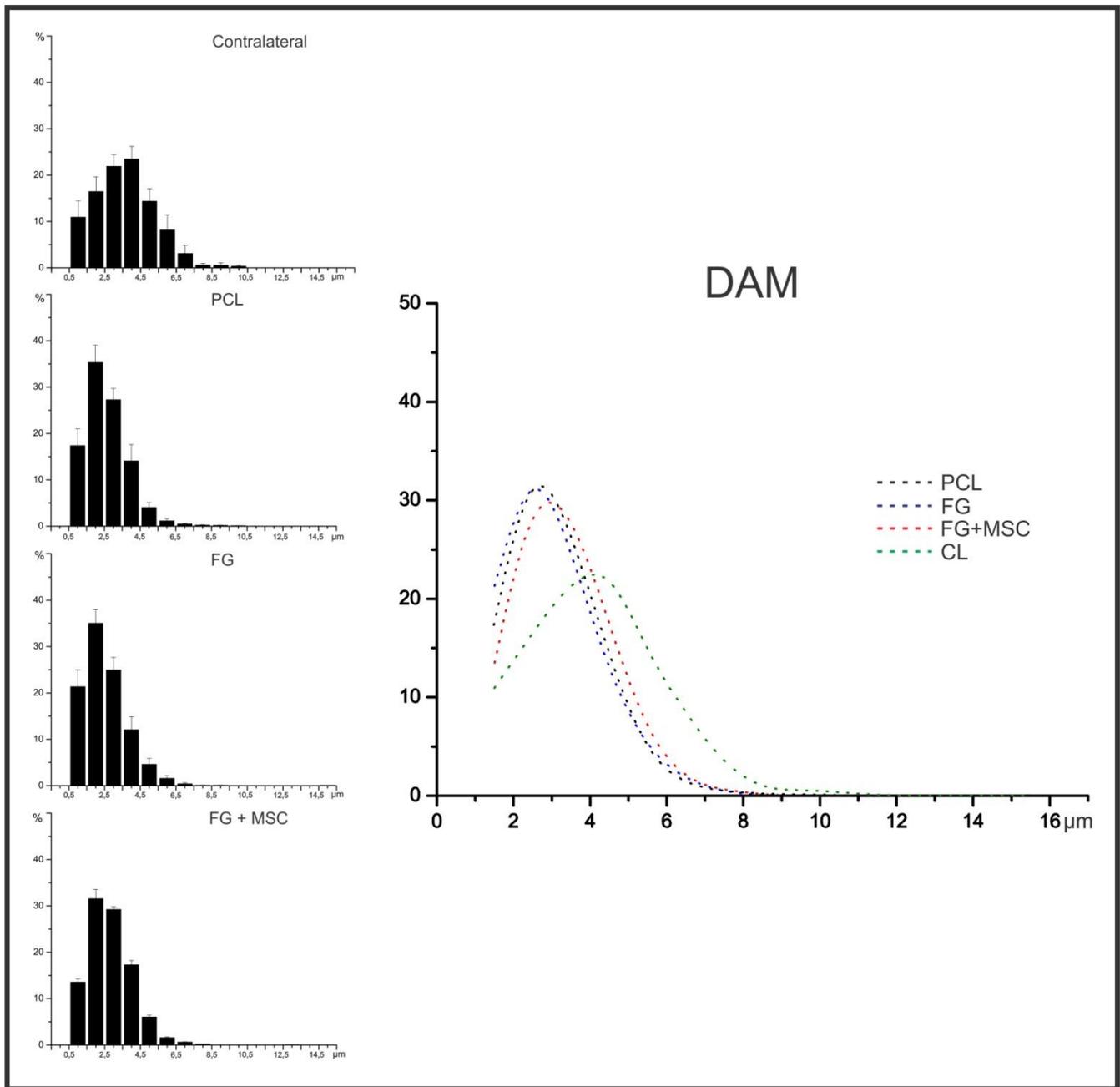
### 5.7.2 - Diâmetro dos Axônios Mielínicos (Fig. 19 e 20)

Os nervos contralaterais apresentaram axônios com diâmetro variando entre 0,5 a 10,0 $\mu\text{m}$ , sendo a média igual a  $3,16 \pm 0,07\mu\text{m}$ . As maiores porcentagens das fibras foram encontradas nos intervalos de 4,51 a 5,5 $\mu\text{m}$ , de 5,51 a 6,5 $\mu\text{m}$  e de 6,51 a 7,5 $\mu\text{m}$ , o que corresponde a 21,9%, 23,5% e 14,3%, respectivamente.

Os animais do grupo PCL, 60 dias após a tubulização, apresentaram axônios com diâmetro variando entre 0,5 e 10,1  $\mu\text{m}$ , sendo a média igual a  $2,45 \pm 0,03\mu\text{m}$ . As maiores porcentagens das fibras

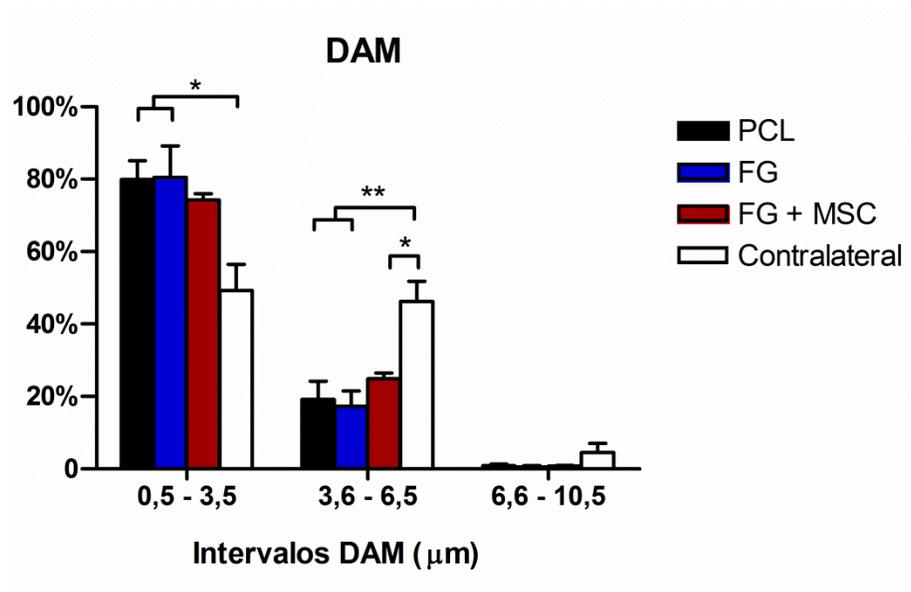
foram encontradas nos intervalos de 0,5 a 1,5 $\mu$ m, de 1,51 a 2,5 $\mu$ m e de 2,51 a 3,5 $\mu$ m, o que corresponde a 17,3%, 35,3% e 27,2%, respectivamente.

Quanto ao grupo FG, os nervos tubulizados apresentaram axônios com diâmetro variando entre 0,5 e 9,35 $\mu$ m, sendo a média igual a 2,3  $\pm$  0,03 $\mu$ m. As maiores porcentagens das fibras foram encontradas nos intervalos de 0,5 a 1,5  $\mu$ m, de 1,51 a 2,5 $\mu$ m e de 2,51 a 3,5 $\mu$ m, o que corresponde a 21,3%, 35% e 25%, respectivamente. Os nervos dos animais do grupo FG+MSC apresentaram axônios com diâmetro variando entre 0,5 e 14,0 $\mu$ m, sendo a média igual a 2,6  $\pm$  0,03  $\mu$ m. As maiores porcentagens das fibras foram encontradas nos intervalos de 1,51 a 2,5 $\mu$ m, de 2,51 a 3,5 $\mu$ m e de 3,51 a 4,5 $\mu$ m, o que corresponde a 31,5%, 29,2% e 17,3%, respectivamente.



**Figura 19:** Distribuição de frequência do diâmetro dos axônios mielínicos (DAM) regenerados nos diferentes grupos experimentais e gráfico de sobreposição das curvas.

A análise estatística dos diâmetros dos axônios mielínicos (**Fig. 20**) mostrou diferença significativa nos intervalos: de 0,5 a 3,5µm entre o grupo contralateral e os grupos PCL e FG ( $p < 0,05$ ); de 3,51 a 6,5µm entre o grupo contralateral e os grupos PCL e FG ( $p < 0,01$ ) e os grupos contralateral e FG+MSC ( $p < 0,05$ ). No intervalo de 6,51 a 10,5µm não houve diferença estatística entre os grupos.



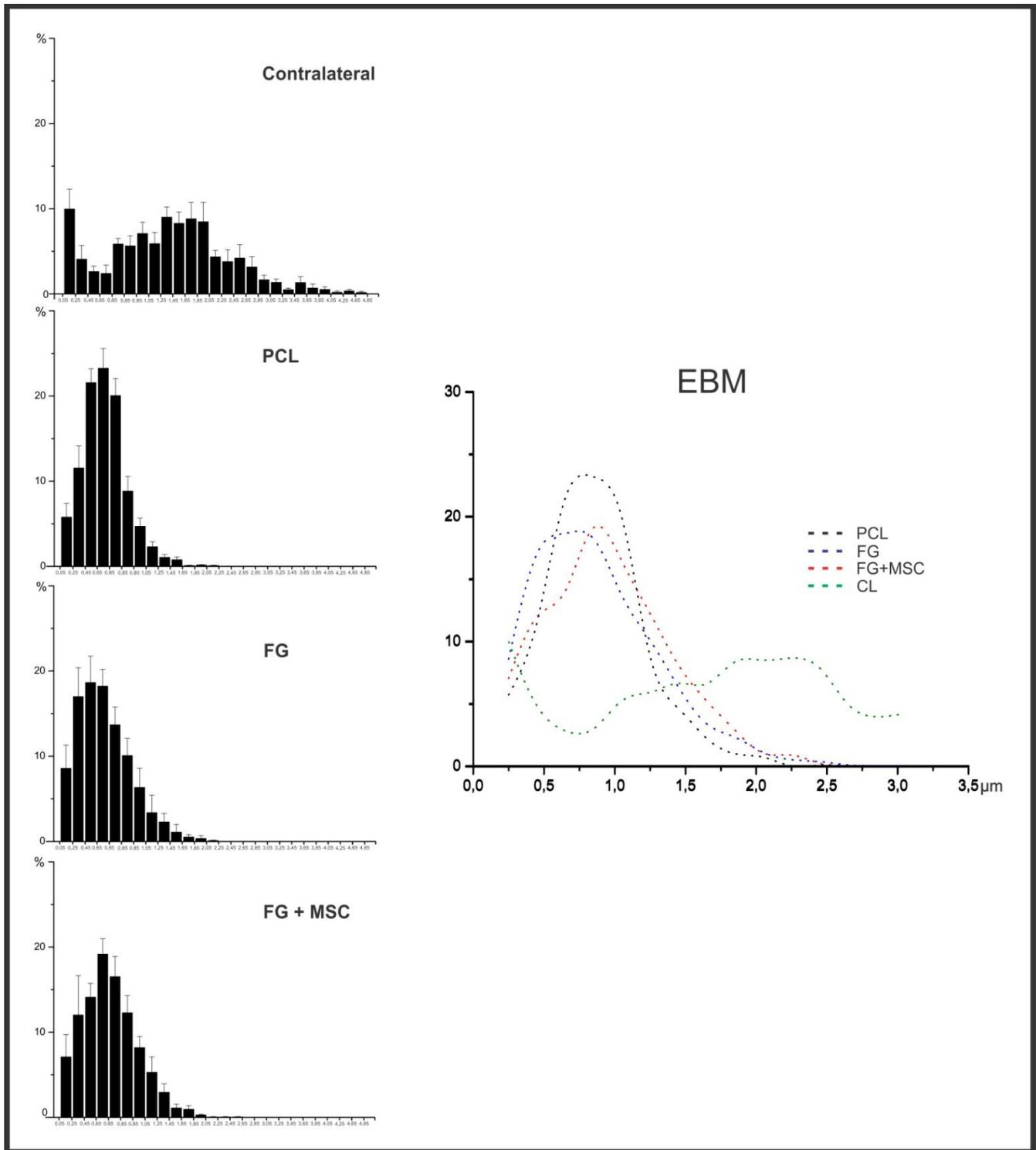
**Figura 20:** Análise estatística comparativa dos grupos experimentais nos respectivos intervalos da DAM, sendo \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

### 5.7.3 - Espessura da Bainha de Mielina (Fig. 21 e 22)

Os nervos contralaterais apresentaram bainha de mielina com espessura variando entre 0,05 a 6,0µm, sendo a média igual a  $1,69 \pm 0,04\mu\text{m}$ . A distribuição das porcentagens das EBM seguiram a distribuição mais homogênea entre os intervalos de frequência, sendo que as maiores porcentagens foram encontradas nos intervalos de 0,05 a 0,25 µm, de 1,66 a 1,85µm e de 2,06 a 2,25µm, o que corresponde a 9,9%, 9% e 8,8%, respectivamente.

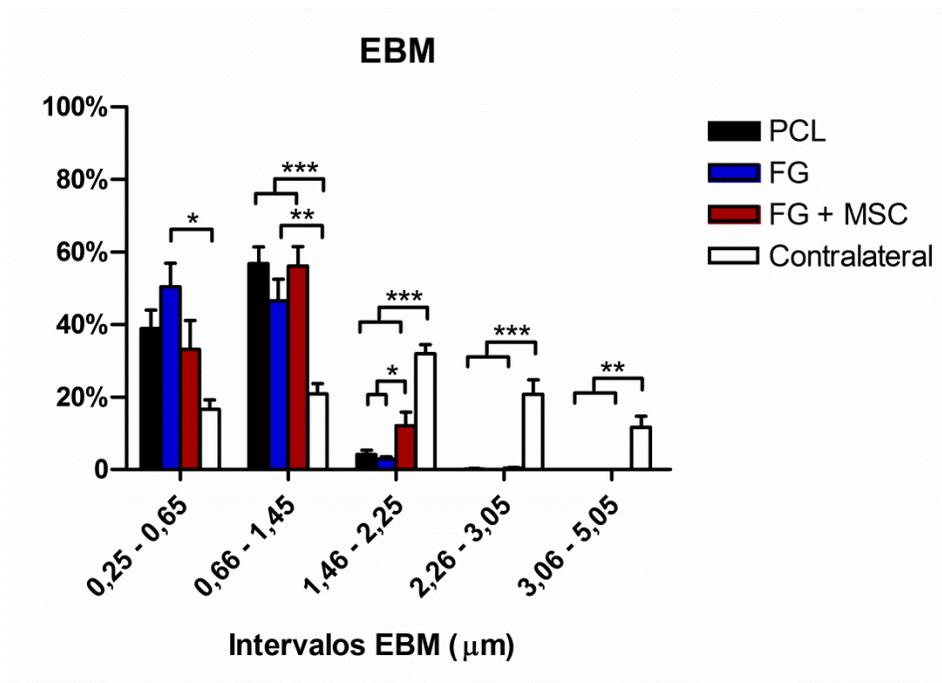
Os animais do grupo PCL, 60 dias após a tubulização, apresentaram bainha de mielina com espessura variando entre 0,05 e 2,5 $\mu$ m, sendo a média igual a 0,73  $\pm$  0,01  $\mu$ m. As maiores porcentagens das fibras foram encontradas nos intervalos de 0,46 a 0,65 $\mu$ m, de 0,66 a 0,85 $\mu$ m e de 0,86 a 1,05 $\mu$ m, o que corresponde a 21,5%, 23,2% e 20,0%, respectivamente.

Quanto ao grupo FG, os nervos tubulizados apresentaram EBM variando entre 0,05 e 2,6  $\mu$ m, sendo a média igual a 0,74  $\pm$  0,01 $\mu$ m. As maiores porcentagens das fibras foram encontradas nos intervalos de 0,46 a 0,65 $\mu$ m, de 0,66 a 0,85 $\mu$ m e de 0,86 a 1,05 $\mu$ m, o que corresponde a 18,6%, 18,2% e 13,6%, respectivamente. Os nervos dos animais do grupo FG+MSC apresentaram EBM variando entre 0,05 e 2,9 $\mu$ m, sendo a média igual a 0,84  $\pm$  0,01 $\mu$ m. As maiores porcentagens das fibras foram encontradas nos intervalos de 1,51 a 2,5 $\mu$ m, de 2,51 a 3,5 $\mu$ m e de 3,51 a 4,5 $\mu$ m, o que corresponde a 14,1%, 19,2% e 16,5%, respectivamente.



**Figura 21:** Distribuição de frequência da espessura da bainha de mielina (EBM) dos axônios regenerados nos diferentes grupos experimentais e gráfico de sobreposição das curvas.

A análise estatística da espessura da bainha de mielina (**Fig. 22**) mostrou diferença significativa nos intervalos: de 0,25 a 0,65 entre os grupos contralateral e PCL ( $p < 0,05$ ); de 0,651 a 1,45 entre os grupos contralateral e PCL e FG ( $p < 0,001$ ) e entre os grupos contralateral e FG+MSC ( $p < 0,001$ ); de 1,451 a 2,25 entre o grupo contralateral e os demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ) e entre o grupo FG+MSC e os grupos PCL e FG ( $p < 0,05$ ); de 2,251 a 3,05 entre o grupo contralateral e os demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ).



**Figura 22:** Análise estatística comparativa dos grupos experimentais nos respectivos intervalos da EBM, sendo \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ .

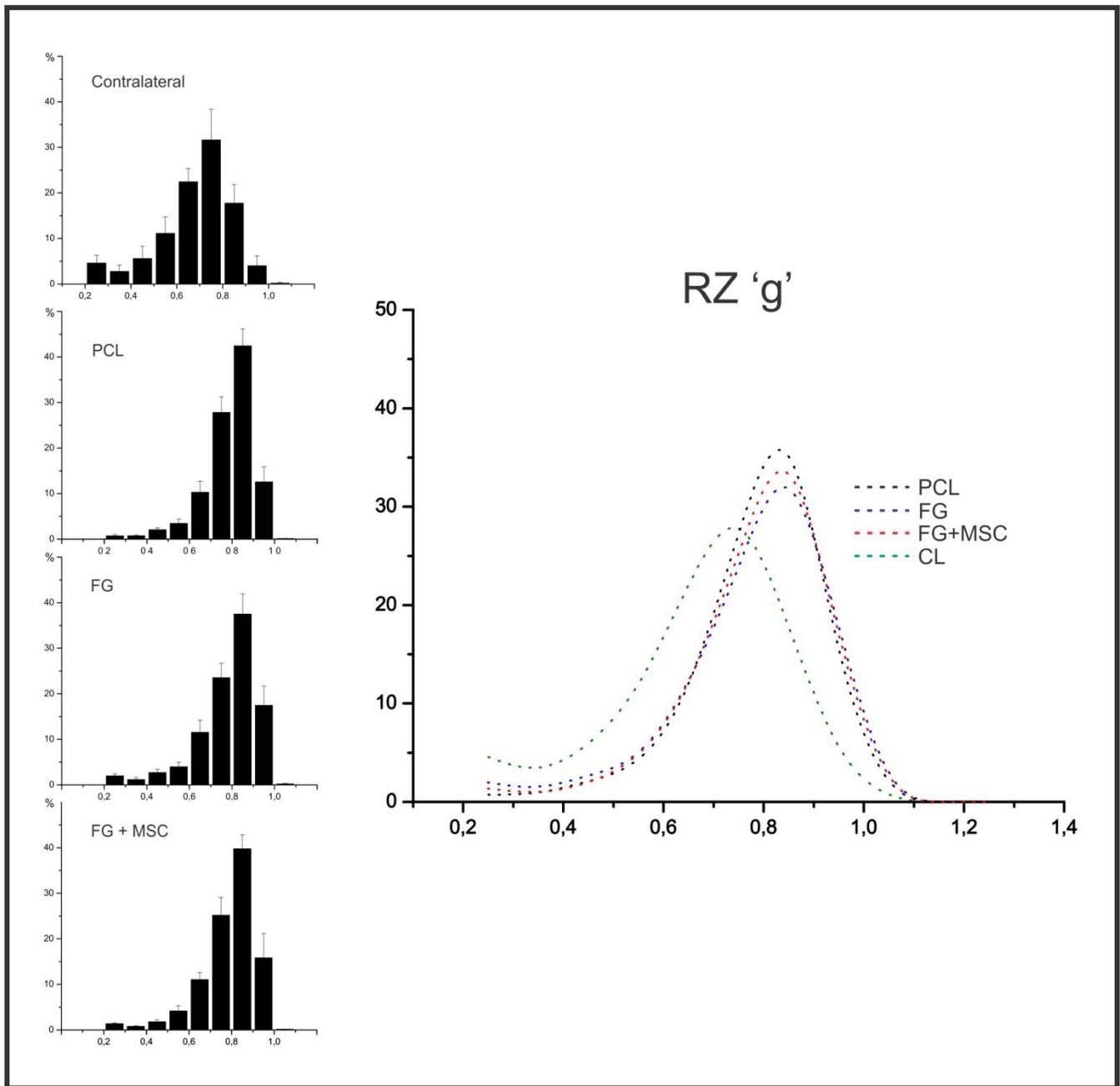
#### 5.7.4 - Razão "g" (RZG) (Fig. 23 e 24)

Os nervos contralaterais apresentaram RZG variando de 0,2 a 0,95, sendo a média igual a  $0,62 \pm 0,006$ . Destas, a maioria estava distribuída nos intervalos de 0,56 a 0,65, 0,66 a 0,75 e 0,75 a 0,85, correspondendo a 22,4%, 31,6% e 17,7%, respectivamente.

Os animais do grupo PCL, 60 dias após a tubulização, RZG variando entre 0,2 e 0,94, sendo a média igual a  $0,74 \pm 0,003$ . Destas, a maioria se encontra distribuída nos intervalos 0,66 a 0,75, 0,76 a 0,85 e 0,86 a 0,95, correspondendo a 27,8%, 42,4% e 15,6%, respectivamente.

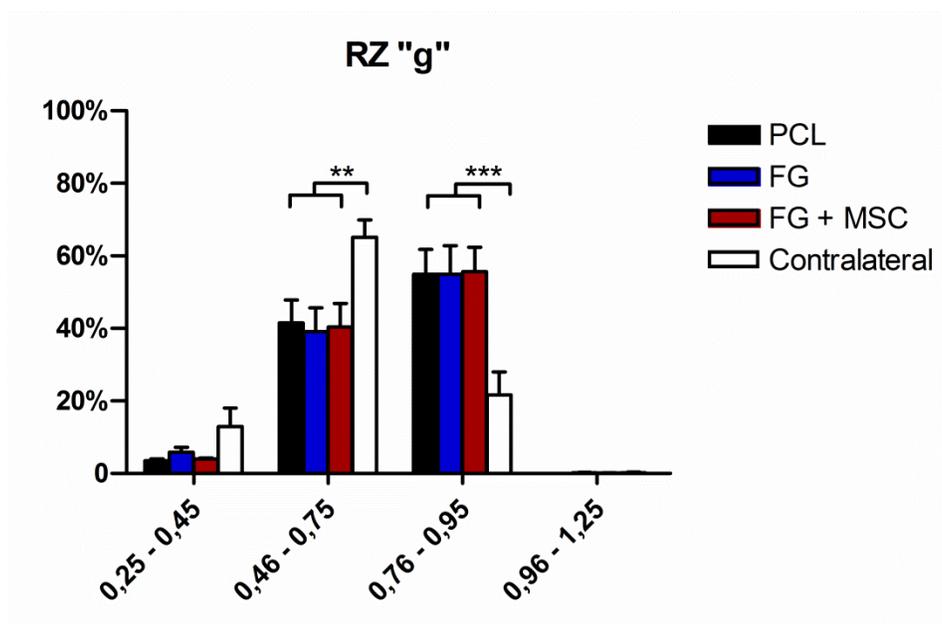
A RZG do grupo FG variou entre 0,2 e 0,97, sendo a média igual a  $0,73 \pm 0,003$ . A maioria se encontra distribuída nos intervalos 0,66 a 0,75, 0,76 a 0,85 e 0,86 a 0,95, correspondendo a 23,5%, 37,5% e 17,4%, respectivamente.

No grupo FG+MSC a RZG variou entre 0,2 e 0,95, sendo a média igual a  $0,73 \pm 0,003$ . A maioria se encontra distribuída nos intervalos 0,66 a 0,75, 0,76 a 0,85 e 0,86 a 0,95, correspondendo a 25,2%, 39,7% e 15,8%, respectivamente.



**Figura 23:** Distribuição de frequência da Razão "g" (RZG) nos diferentes grupos experimentais e gráfico de sobreposição das curvas.

A análise estatística da Razão "g" (**Fig. 24**) apontou diferenças significativas nos intervalos: de 0,451 a 0,75 entre o grupo contralateral e os demais grupos experimentais ( $p < 0,01$ ) e de 0,751 a 0,95 entre o grupo contralateral e os demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença significativa nos intervalos de 0,25 a 0,45 e de 0,951 a 1,25.

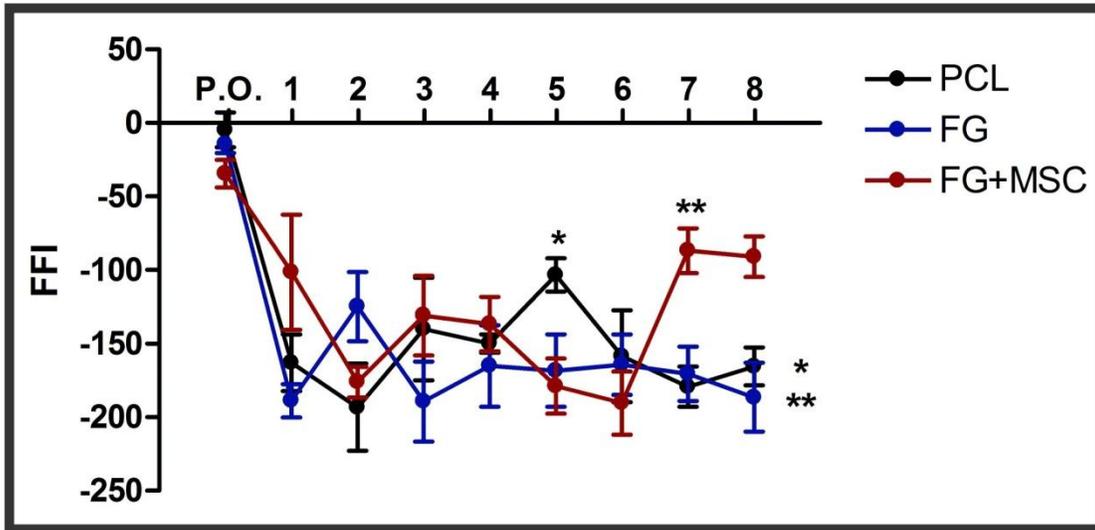


**Figura 24:** Análise estatística comparativa dos grupos experimentais nos respectivos intervalos da Razão "g", sendo \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$ .

### 5.8 - Avaliação Funcional (Fig. 25)

Os animais foram submetidos à avaliação funcional semanalmente durante 8 semanas. A cada semana os dados foram colhidos. Para o cálculo do índice funcional do nervo fibular foram utilizados dois parâmetros: a distância entre o primeiro e o quinto dedo (parâmetro *Print Width*, cedido pelo programa Catwalk), bem como entre o terceiro dedo e o calcanhar (parâmetro *Print Length*, cedido pelo programa Catwalk). A análise estatística do índice funcional do fibular mostrou que o grupo cola de fibrina

com células tronco mesenquimais obteve uma recuperação motora significativamente maior (em relação aos grupos PCL e FG) na sétima semana ( $p < 0,01$ ) e na oitava semana ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente).



**Figura 25:** Análise da função motora dos animais 8 semanas após a lesão. Gráfico construído com valores do índice funcional do nervo fibular, sendo \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

## 6. Discussão

Com o passar dos anos e com o acúmulo de conhecimento sobre a biologia das células tronco mesenquimais, tornou-se claro que estas podem formar a base de um sistema de reparo tecidual extremamente poderoso (Schipani e Kronenberg, 2009). As células tronco mesenquimais apresentam diversas vantagens por serem de fácil extração e expansão, além de possuírem menor potencial oncogênico. A extração é simples, sendo, mais comumente, feita a partir da medula óssea. A capacidade destas células de aderir a superfícies plásticas faz com que a expansão seja extremamente facilitada e rápida (Maltman, *et al*, 2011) resultando em rendimento suficiente para exploração clínica e científica (Uccelli, *et al*, 2011). Devido a essas características, a administração exógena de células tronco mesenquimais como agentes terapêuticos (tanto isoladas quanto em associação com outros elementos) é testada em diversos modelos de lesões teciduais.

Como descrito por Dominici e colaboradores (2006), dentre os critérios mínimos para caracterização das células tronco mesenquimais estão a capacidade de aderência em superfícies plásticas e a expressão ou não de certos antígenos de superfície. Em uma cultura primária de células tronco mesenquimais, portanto, ao menos 95% das células devem expressar as moléculas CD105, CD90 e CD73 e menos de 2% das células devem expressar CD45, CD34, CD11b/c ou CD54. Através da análise das culturas de células tronco mesenquimais em quarta passagem, utilizadas nos ensaios experimentais, grande parte das células estavam aderidas à superfície da placa e, através da análise por citometria de fluxo, nós detectamos que 99,8% das células expressam CD90, 89% expressam CD54

e 88,6% das células expressam CD73. Por outro lado, 1,07% das células expressam CD45 e 1,88% expressam CD34.

Uma análise feita por Prockop (2007), mostrou que a eficácia terapêutica do enxerto das células tronco mesenquimais não consiste no transplante em si, sugerindo que a capacidade de reparo não é devido à transdiferenciação das células tronco mesenquimais em fenótipos celulares apropriados ou à fusão celular, mas sim à secreção de fatores solúveis bioativos que promovem um microambiente regenerativo, viabilizando uma resposta tissular autorregulada. Esse fato foi denominado por Caplan (2007) como "atividade trófica".

Nossos resultados demonstraram presença das células tronco mesenquimais indiferenciadas nos nervos regenerados mesmo 60 dias após tubulização, sugerindo que essas células podem atuar liberando continuamente os fatores neurotróficos no local da lesão, atuando no processo regenerativo.

Quando uma fibra nervosa é danificada os axônios e a mielina distais à lesão degeneram em um processo denominado Degeneração Walleriana. Se o neurônio sobrevive, este modifica seu metabolismo de um estado de transmissão para um estado regenerativo e o axônio pode, assim, crescer a partir do coto proximal. A regeneração nervosa depende de um substrato adequado de componentes da matriz extracelular e de fatores tróficos no local da lesão e isto é mais difícil quando a lesão origina perda da continuidade do nervo (Navarro *et al.*, 2001).

Quando a perda de tecido nervoso é bastante extensa, inviabilizando a aposição e sutura dos cotos sem a geração de tensão (neurorrafia), o padrão cirúrgico para reunião dos cotos é a utilização de enxerto autólogo de nervo, apesar das dificuldades inerentes. Por isso, grandes esforços são direcionados para o desenvolvimento de enxertos alternativos ao uso dos autólogos. Estes enxertos artificiais, tipicamente, são compostos por um elemento estrutural chamado conduíte e uma matriz

interna que serve como esqueleto para a inclusão de implantes celulares, citocinas e/ou fatores de crescimento (Wang *et al.*, 2009). Da mesma maneira, são bastante numerosas as investigações do uso de células tronco mesenquimais em modelos animais de doenças neurodegenerativas, como a Esclerose Múltipla, bem como após lesões (Uccelli *et al.*, 2011).

No sentido de proporcionar suporte estrutural para o enxerto de células, uma alternativa é a adição do selante de fibrina no interior da prótese tubular, uma vez que este biomaterial já mostrou-se um veículo adequado para células (Gille *et al.*, 2005) e, além disso, quando aplicada no reparo de nervos periféricos, não causou prejuízo no crescimento axonal (Silver *et al.*, 1995). Os resultados descritos na literatura corroboram com nossos achados, uma vez que detectamos a presença de MSC sob a estrutura do selante de fibrina 60 dias após a tubulização, mostrando que o novo selante de fibrina derivado do veneno de serpente, utilizado neste trabalho possibilitou a sobrevivência das células no interior da prótese e, também, não causou prejuízo ao crescimento dos axônios ao longo do tubo, comprovado pelos cortes histológicos dos nervos regenerados.

Recentemente, a introdução das células tronco mesenquimais em conduítes utilizados para a regeneração nervosa periférica é tida como uma promissora abordagem (Pereira Lopes *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Carlson *et al.*, 2011). O presente trabalho, portanto, apresenta este tipo de desenho experimental, utilizando como conduíte para ligação entre os cotos uma prótese tubular construída a partir do polímero poli-caprolactona, cuja aplicação na regeneração periférica é bastante apropriada, uma vez que é um material biocompatível e reabsorvível. Como *scaffold* para o enxerto de células tronco mesenquimais utilizamos o selante de fibrina.

As células de Schwann, sendo os componentes gliais primários do sistema nervoso periférico, detém uma função crucial na regeneração nervosa. A atuação destas células no processo regenerativo

vai desde a internalização dos detritos de axônios e mielina derivados da degeneração Walleriana, passando pela formação das bandas de Büngner, até a função na correta expressão de componentes da matriz extracelular e o suporte de fatores neurotróficos (Zochodne, 2012).

Utilizando o modelo *in vivo* de tubulização com aplicação de células tronco mesenquimais, Wang e colaboradores (2009) observaram, através da análise da expressão de neurofilamento e S100 pela técnica de imunistoquímica, 7 e 14 dias após lesão, que, nos grupos nos quais houve a administração de células tronco mesenquimais, o processo de crescimento axonal foi mais rápido e houve intensa proliferação de células de Schwann. Além disso, através da análise dos níveis de mRNA pela técnica de PCR em tempo real, os autores demonstraram também o aumento da expressão de receptores para fatores neurotróficos nas células de Schwann.

Tal fato é compatível com os nossos resultados de quantificação de imunistoquímica, uma vez que, mesmo 60 dias após a tubulização, as células tronco mesenquimais extraídas de animais transgênicos GFP foram detectadas no tecido e, ainda, obtivemos uma expressão significativamente maior de p75<sup>NTR</sup> nos nervos do grupo FG+MSC, em relação ao nervo normal.

Uma explicação plausível para não termos encontrado diferenças significativas na imunomarcagem anti-S100 pode residir no fato de o período crítico para a proliferação destas células ser mais agudo à lesão e que, por termos obtido as amostras 60 dias após a tubulização, o número de células de Schwann tenha se estabilizado.

As células de Schwann também são responsáveis pela mielinização dos axônios periféricos. Este processo ocorre quando as células de Schwann envolvem os axônios, formando mielina a partir de múltiplas camadas de membrana plasmática. O processo de maturação das células de Schwann é mediado por diversos componentes, como a laminina, uma proteína integrante da membrana basal

das células de Schwann. Carlson e colaboradores (2011) utilizaram animais deficientes em laminina  $\gamma 1$  no sistema nervoso periférico, cujos nervos periféricos são desorganizados e hipomielinizados, e trataram os nervos isquiáticos com células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Através do tratamento, os pesquisadores conseguiram restaurar a diferenciação das células de Schwann endógenas dos camundongos mutantes, possibilitando a mielinização dos axônios.

Nesse sentido, nós detectamos colocalização entre as células tronco mesenquimais (encontradas no tecido 60 dias após tubulização) e imunodeteção de BDNF. O BDNF é um regulador endógeno do processo de mielinização durante o desenvolvimento e processo regenerativo do SNP, onde o aumento da produção de mielina é mediado pelo receptor de neurotrofinas  $p75^{NTR}$  (Cosgaya *et al.*, 2002; Tolwani *et al.*, 2004). As células tronco mesenquimais transplantadas no local da lesão, portanto, exercem sua eficácia não somente via liberação de fatores de crescimento por elas mesmas, mas também através da modulação indireta do comportamento das células de Schwann (Wang *et al.*, 2009). No caso do presente trabalho, as células de Schwann continuariam a ser estimuladas mesmo 60 dias após o enxerto, através da secreção de moléculas bioativas, como o BDNF, por parte das células tronco mesenquimais.

Corroborando com o descrito acima, observamos que os axônios dos nervos do grupo FG+MSC distinguiram-se por apresentar bainha de mielina mais espessa, em relação a dos axônios dos nervos dos grupos PCL e FG, especialmente no intervalo de 1,46 a 2,25 $\mu$ m. Tal fato contribui como outra evidência indicando a possível ação das células tronco mesenquimais sobre a reatividade das células de Schwann. Da mesma maneira, Pereira Lopes *et al.* (2006) avaliaram o efeito do enxerto de células derivadas da medula óssea no interior de um tubo de colágeno e observaram que o número de fibras mielínicas e a área de mielina foi significativamente maior no grupo onde foram enxertadas as células.

A recuperação funcional também foi mais rápida nos animais do grupo experimental, o que reflete o estabelecimento de um ambiente adequado e propício para o crescimento e mielinização de axônios em regeneração.

As áreas dos nervos no interior do tubo regenerado não diferiram estatisticamente entre os grupos experimentais, sendo a média das áreas do grupo PCL ligeiramente maior que as médias dos grupos FG e FG+MSC.

Nossos resultados da estimativa do número total de axônios mielinizados regenerados no interior da prótese tubular, obtidos através da relação entre a área da imagem e a área total do nervo, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais. Já a estimativa de axônios mielínicos por área fixa mostrou que os animais do grupo FG+MSC apresentaram 25% a mais de axônios, quando comparado com o grupo PCL, demonstrando maior grau de compactação das fibras, o que reflete uma organização mais próxima da normalidade.

A avaliação funcional é o resultado definitivo do sucesso da regeneração nervosa periférica. Como resultado funcional dos achados acima, houve diferença significativa na recuperação motora dos animais dos diferentes grupos experimentais, avaliada através do cálculo do índice funcional do nervo fibular, que leva em consideração o comprimento e a largura das pegadas, tanto da pata cujo nervo ipsilateral foi lesado, quanto da pata contralateral, sendo que os animais do grupo FG+MSC mostraram aproximadamente 55% de recuperação em relação à primeira análise pós lesão, situação que se manteve por duas semanas consecutivas. Os demais grupos experimentais apresentaram pouca recuperação funcional.

# 7. Conclusões

1. As células tronco mesenquimais, extraídas de animais transgênicos para a proteína GFP, foram encontradas no tecido nervoso sessenta dias após o enxerto, indicando a sobrevivência de longo prazo destas células;
2. A estimativa de fibras regeneradas, avaliada por área fixa, demonstrou diferença significativa entre o grupo PCL e o grupo FG+MSC, sendo que este demonstrou maior grau de compactação axonal, exibindo, portanto, padrão mais próximo do nervo normal;
3. As imunomarcações para neurofilamento, células de Schwann e colágeno IV mostraram-se quantitativamente equivalentes entre os grupos experimentais e evidenciaram uma organização nervo compatível com o processo regenerativo em todos os grupos;
4. A imunomarcação anti-p75<sup>NTR</sup> mostrou-se estatisticamente maior no grupo FG+MSC em relação ao nervo controle normal, indicando maior resposta local a fatores neurotróficos neste grupo;
5. Foi detectada colocalização entre MSC GFP-positivas e BDNF;
6. O enxerto de MSC influenciou positivamente o processo de mielinização dos axônios em regeneração;
7. O grupo FG+MSC mostrou recuperação funcional significativamente maior em relação aos grupos PCL e FG nas duas últimas semanas de análise.



# CAPÍTULO II



## ***Abstract***

For analysis of the progression of regeneration in the central and peripheral nervous system usually are used techniques from histological sections that provide a two-dimensional image of the regenerating axons, showing only fragments, and may thus lead to misinterpretations. In order to overcome this obstacle, the tetrahydrofuran (THF)-based clearing technique was proposed. Through this technique, the brain and spinal cords of rodents become transparent allowing the deep-tissue imaging of axons. Since this technique is standardized only for spinal cord, the present work proposes the establishment of the technique for peripheral nerves. For this, we used transgenic mice that express fluorescent proteins in neurons, astrocytes and microglia as well as double hybrids. Microscopic analysis, by 2P-LSM, include the observation of cleared tissues from transgenic mice before and after injury.



## Resumo

Para analisar a progressão da regeneração tanto no sistema nervoso central quanto no periférico, normalmente, são utilizadas técnicas que partem da secção histológica dos órgãos. Estas secções provêm imagens bidimensionais dos axônios em regeneração, que podem mostrar apenas fragmentos, levando a possíveis interpretações errôneas. Com o intuito de superar este obstáculo, foi proposta da técnica de clareamento tecidual baseada na incubação com tetraidrofurano (THF). Através desta técnica, o encéfalo e as medulas espinais de roedores se tornam transparente, permitindo o acesso aos axônios localizados mais profundamente no tecido. Como esta técnica foi padronizada somente para encéfalo e medula espinal, o presente trabalho padronizou a técnica para nervos periféricos. Para isto, utilizamos animais transgênicos que expressam proteínas fluorescentes em neurônios, astrócitos e microglia, bem como duplos híbridos. A análise microscópica do processo regenerativo, através do 2P-LSM, inclui a observação de tecidos clareados ou não dos animais transgênicos antes e após a injúria periférica.



# 3. Objetivos

1. Estabelecer a técnica de clareamento tecidual (método com THF) para o nervo isquiático de animais transgênicos;
2. Avaliar o padrão de expressão das proteínas fluorescentes no sistema nervoso periférico dos animais transgênicos com marcação celular específica;
3. Adquirir imagens dos nervos isquiáticos antes e após esmagamento, através do microscópio 2-photon, com o intuito de avaliar as alterações morfológicas locais.



# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 Animais Transgênicos

Nós usamos para este estudo animais das seguintes linhagens transgênicas: *TgH(CX3CR1-EGFP)*; linhagem duplo-híbrida TFGD e linhagem duplo-híbrida NGYT.

**CXCR** - os animais desta linhagem expressam GFP sob controle do gene CX3CR1. CX3CR1 é o receptor de quimiocina CX3C 1. A expressão deste receptor está associada a linfócitos (Imai *et al.*, 1997), monócitos e também a células microgliais.

**TFGD** - os animais desta linhagem duplo-híbrida expressam a proteína GFAP-eCFP e Thy1-eYFP, em astrócitos e neurônios, respectivamente. Estes animais expressam altos níveis de Thy-YFP tanto em neurônios motores quanto sensitivos. Thy-1 é uma proteína ancoradora de GPI presente na membrana externa dos *lipid rafts* na membrana neuronal e são usadas como marcador de prolongamentos axonais em neurônios maduros (Kemshead *et al.*; 1982). Estes animais também expressam CFP sob controle do promotor da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). A expressão de GFAP é classicamente usada como marcador de astrócitos, porém também pode ser utilizada como marcador de células de Schwann (Eng *et al.* 2000).

**NGYT** - Animais desta linhagem expressam GFP sob controle do promotor da proteína Thy-1 e expressam CFP sob controle do promotor da proteína GFAP.

#### **4.2 Procedimento cirúrgico: esmagamento do nervo isquiático**

Os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura contendo midazolam (Dormicum, 2 mg/kg, Rebopharm), medetomidine (Domitor, 0.15 mg/kg, Rebopharm), e fentanyl (0.05 mg/kg, Hexal).

Para o esmagamento, o nervo isquiático foi exposto ao nível médio da coxa e esmagado com a ajuda de uma pinça, a pressão total por 30 segundos, de acordo com Xin *et al.* O músculo e a pele foram suturados e os animais mantidos em placa aquecida por 24 horas. Os animais experimentais foram mantidos vivos por 3, 7 ou 14 dias. Todos os experimentos foram feitos em acordo com as leis de manejo animal do governo da Alemanha e União Europeia.

#### **4.3 Clareamento tecidual (método com THF)**

Nervos isquiáticos intactos e nervos axotomizados 3, 7 e 14 dias após a lesão foram removidos de camundongos após perfusão transcardíaca com PBS e paraformaldeído 4%. Os nervos foram dissecados e mantidos em paraformaldeído 4% por 4 horas e, após, as amostras foram processadas para o clareamento tecidual, de acordo com Ertürk, *et al.* (2012). Ao fim, as amostras foram removidas dos recipientes de vidro e colocadas em uma lamínula coberta quase completamente (exceto a região central da lamínula) com fita dupla-face, e cobertas com outra lamínula.

#### **4.4 2P-LSM**

2P-LSM foi feita utilizando um 2P-LSM comercial feito sob encomenda equipado com um laser Ti:sapphire (Vision II, Coherent), como descrito por Ertürk *et al.*, (2012) e Steffens *et al.*, (2011).

#### **4.4.1 Processamento das Imagens**

Todas as imagens adquiridas no 2P-LSM foram processadas usando o software ImageJ (versão 1.45s, National Institute of Health, USA). Projeções 3D foram feitas utilizando a ferramenta Volume Viewer, pertencente ao pacote de processamento de imagens para ImageJ, FIJI (<http://fiji.sc/Fiji>) (Schindelin, J., *et al.* 2012).

#### **4.5 Preparação do Tecido para Microscopia de Fluorescência**

As medulas espinais dos animais submetidos ao esmagamento do nervo isquiático foram removidas, dissecadas, crioprotégidas com sacarose (sacarose 10%, 20% e 30% em PB, por 12 horas cada) e congeladas a - 40°C para secções em criostato (12µm). As secções foram, então, transferidas para uma lâmina gelatinizada e montadas em uma mistura de glicerol e PBS (3:1), observadas e documentadas em microscópio de fluorescência (Eclipse TS100, Nikon, Tokyo, Japan).



# 5. Resultados

## 5.1 Clareamento tecidual à base de THF do nervo isquiático (Tabela 4 e Fig. 26)

Devido à similaridade na composição tecidual altamente lipídica, para padronização da técnica de clareamento do nervo isquiático nós testamos primeiramente o protocolo descrito por Ertürk e colaboradores (2012) para medula espinal. Os espécimes foram incubados em THF (Sigma-Aldrich) 50% (vol/vol) THF, em THF 70%, THF 80%, 3 vezes em THF 100%. Posteriormente, os espécimes foram incubados em diclorometano (DCM) (Sigma-Aldrich) e, finalmente, em dibenzil-éter (DBE) (Sigma-Aldrich). Os reagentes e respectivos tempo de incubação empregados estão descritos na **tabela 4**.

**Tabela 4:** Reagentes e respectivos tempos de incubação para procedimento de clareamento tecidual.

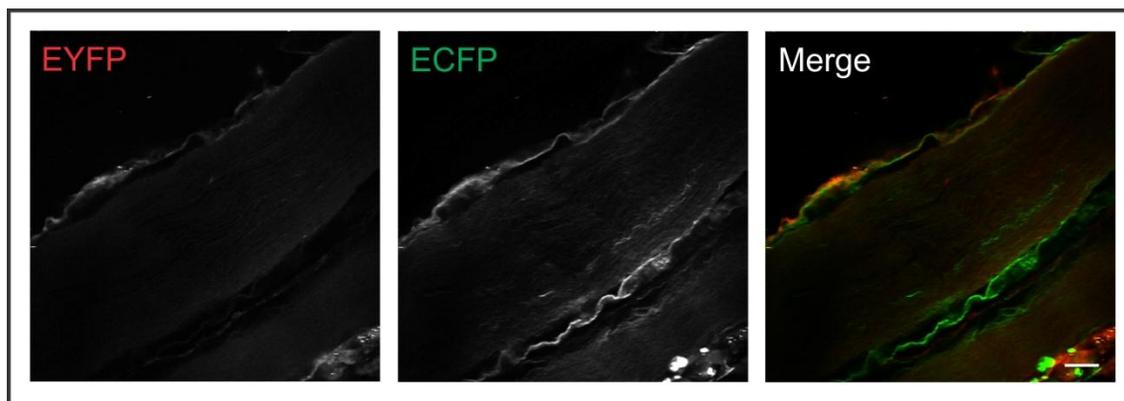
Reagentes	Tempos de Incubação
50% (vol/vol) THF	30 min
70% (vol/vol) THF	30 min
80% (vol/vol) THF	30 min
100% (vol/vol) THF	3 x 30 min
DCM	20 min
DBE	≥ 15 min

Todas as soluções de trabalho (THF 50%, 70%, 80%) foram feitas com água destilada e estocadas em garrafas de vidro. Para as soluções de trabalho de THF 100%, DCM e DBE, 100ml das

soluções estoque foram transferidas para uma garrafa de vidro. As soluções de trabalho foram mantidas ao abrigo da luz, seladas e à temperatura ambiente.

O procedimento de clareamento tecidual foi feito totalmente em capela à temperatura ambiente. Os frascos de vidro contendo as amostras foram colocados em constante rotação entre as trocas de soluções.

Após o clareamento tecidual, os nervos clareados foram observados sob 2P-LSM para atestarmos que o clareamento funcionou e que os tempos de incubação estavam adequados. Nós fomos capazes de observar a fluorescência da proteína Thy-1-YFP e da proteína GFAP-CFP (**Fig. 26**).

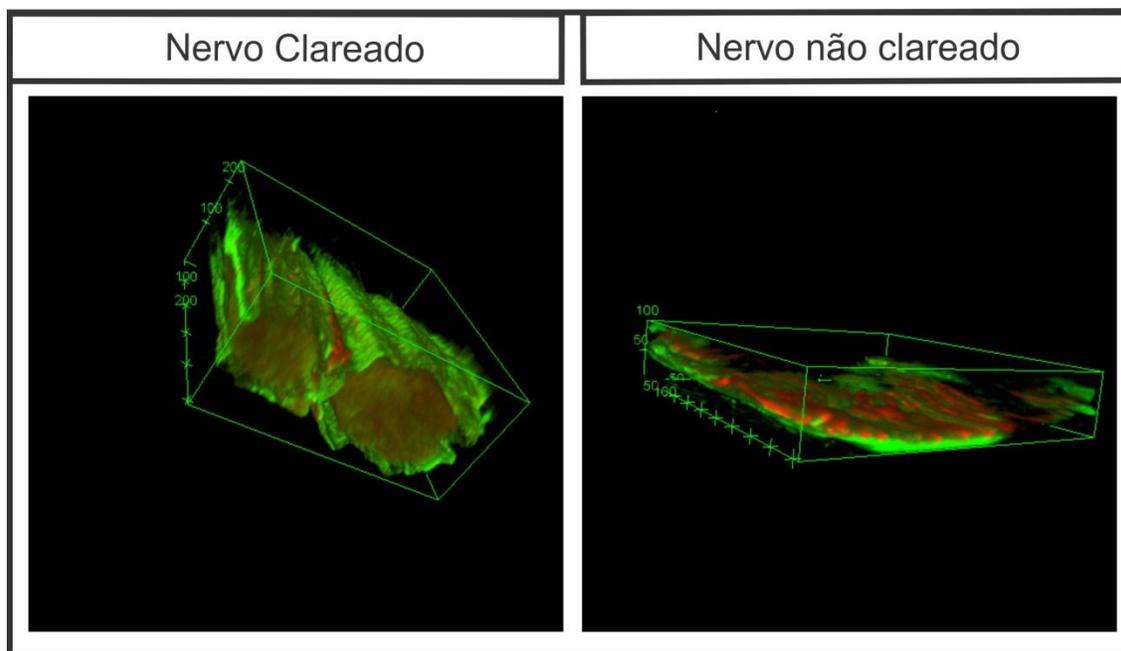


**Figura 26:** Micrografias geradas a partir do imageamento ao 2P-LSM, mostrando a expressão de proteínas fluorescentes no nervo normal de um animal da linhagem TFGD: Thy1-eYFP em vermelho, GFAP-eCFP em verde e a sobreposição de ambos. Barra de escala = 10 $\mu$ m.

## 5.2 Imageamento em profundidade dos nervos isquiáticos antes e após o clareamento tecidual (Fig. 27)

A fim de comparar o imageamento permitido pela técnica de clareamento tecidual, analisamos nervos isquiáticos clareados (depois do clareamento tecidual à base de THF descrito acima) e os nervos normais sob 2P-LSM. Para este fim, foram utilizados dois (direito e esquerdo) nervos isquiáticos do mesmo camundongo transgênico, da linhagem TFGD.

Após a análise pudemos observar que o procedimento de clareamento tecidual à base de THF possibilitou o imageamento de todo o nervo em profundidade (200-250  $\mu\text{m}$ ), com menos potência do laser (aproximadamente 15%) quando comparado com o imageamento do nervo não clareado, para o qual foi necessário usar cerca de 30% da energia do laser para obtermos imagem de 50 $\mu\text{m}$  de profundidade, o que corresponde à superfície do nervo, como podemos ver nas projeções 3D de ambos os nervos, mostradas na **Fig. 27**.

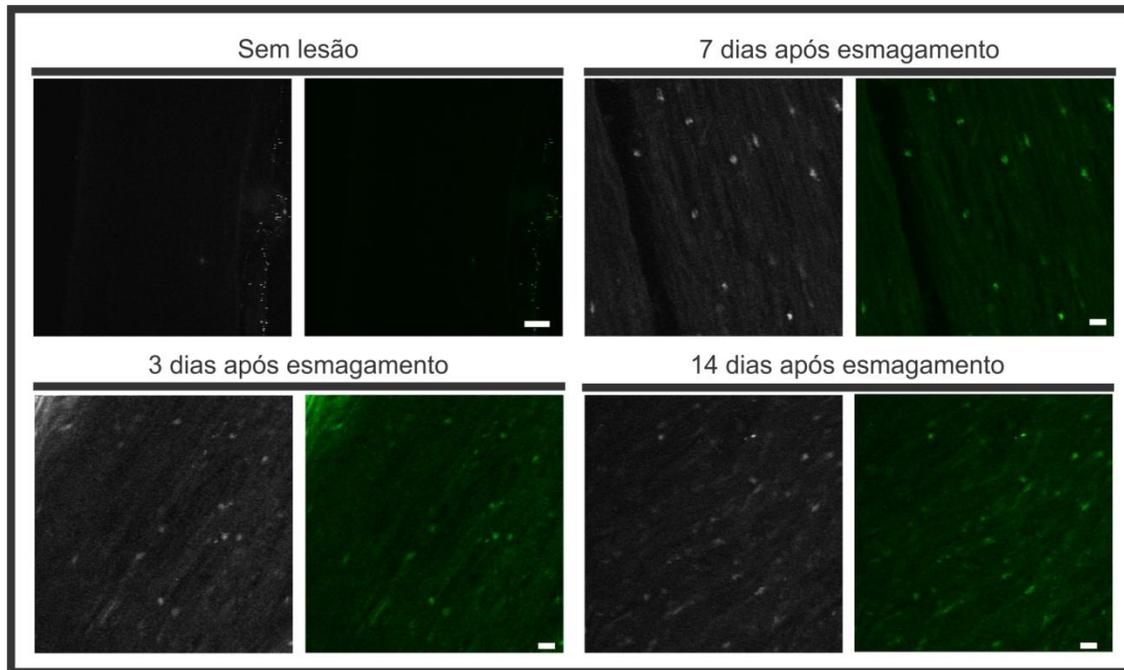


**Figura 27:** Projeções 3D nos nervos clareados e não clareados do camundongo da linhagem TFGD: mostrando em vermelho Thy1-EYFP e em verde GFAP-ECFP.

### 5.3 Alterações morfológicas no nervo isquiático após injúria (Fig. 28, 29 e 30)

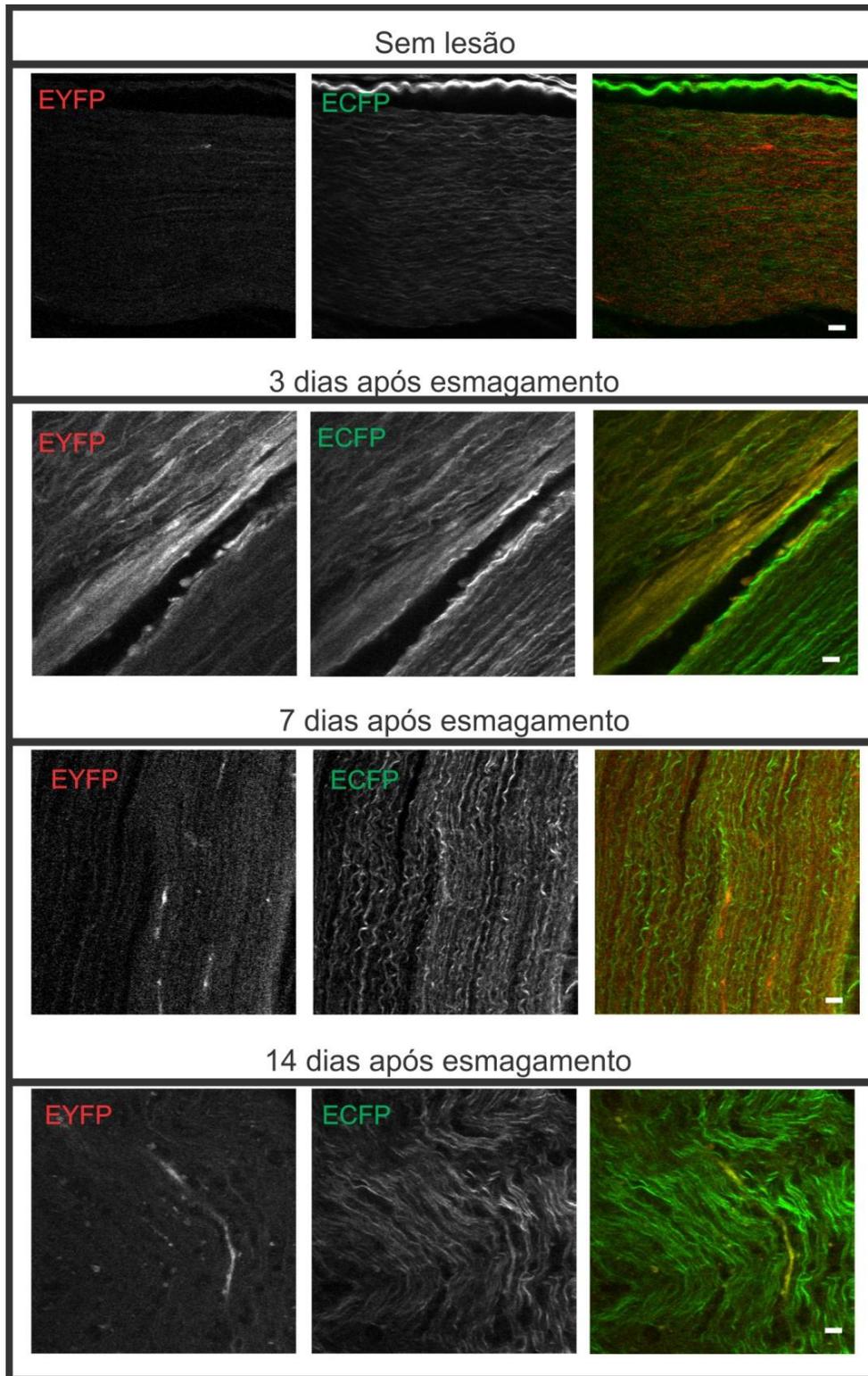
Depois de escolher as linhagens de camundongos transgênicos e estabelecer técnica de clareamento de tecidos à base de THF para nervo periférico, realizamos o esmagamento do nervo isquiático nesses camundongos. Para isto, foram utilizados basicamente três pontos para a análise do nervo: 3, 7 e 14 dias após a lesão em animais da linhagem CXCR, TFGD e NGYT, sendo que nesta última linhagem, os nervos foram analisados antes e três dias após a lesão.

Através da análise dos nervos dos animais da linhagem CXCR sob 2P-LSM pudemos detectar células CX3CR1-GFP positivas após a lesão (**Fig. 28**).



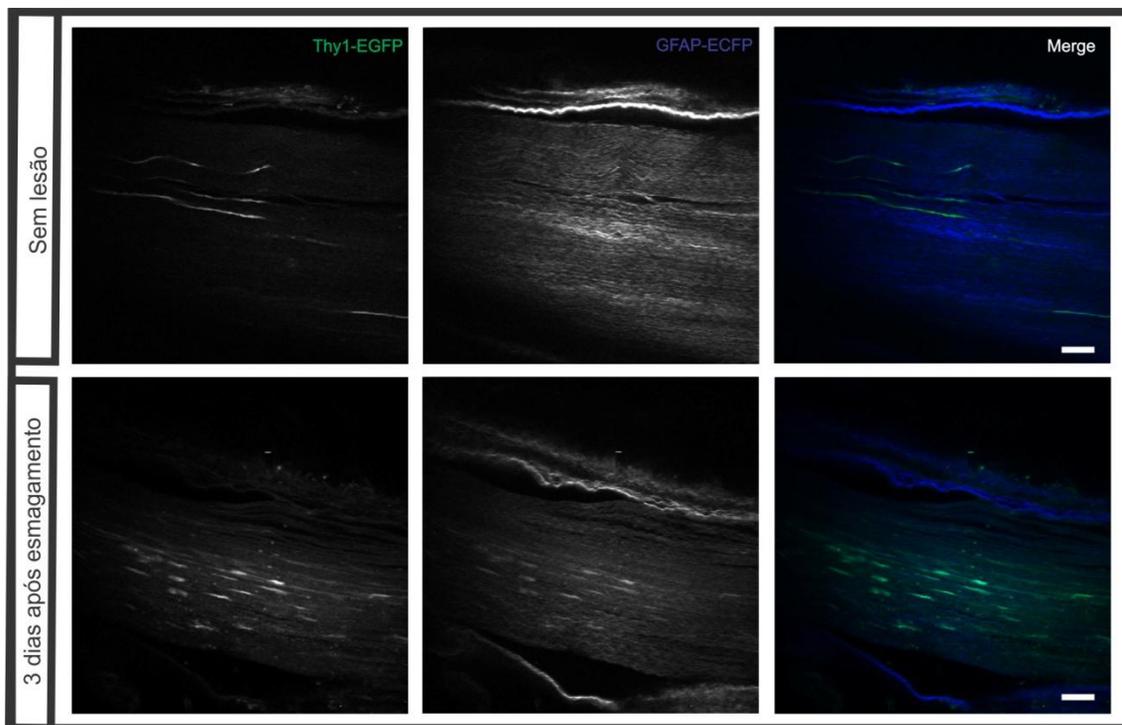
**Figura 28:** Imagens dos nervos de animais CXCR mostrando o nervo não lesionado e nervos 3, 7 e 14 dias após esmagamento. Note que não há quase nenhuma detecção fluorescente nos nervos não lesionados, enquanto nos nervos esmagados há detecção de células CX3CR1-GFP positivas. Barra de escala = 10 $\mu$ m.

Utilizando animais da linhagem TFGD fomos capazes de analisar a reação dos axônios e células de Schwann após injúria. Na **Fig. 29**, podemos ver o aspecto do nervo intacto, tanto para Thy1-YFP e GFAP-CFP. Depois de lesão fomos capazes de notar o rearranjo de ambos os componentes do nervo.



**Figura 29:** Imagens de nervos de animais da linhagem TFGD sem lesão, 3, 7 e 14 dias após esmagamento do nervo isquiático. Barra de escala = 10 $\mu$ m.

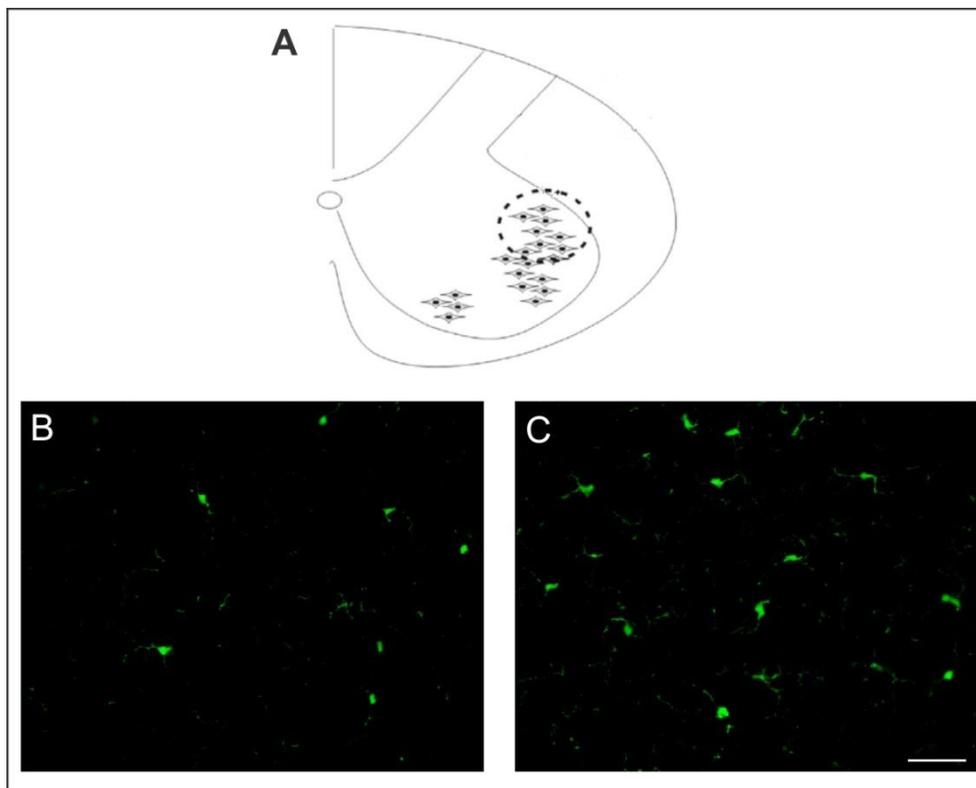
O mesmo tipo de análise foi realizada em nervos isquiáticos de animais da linhagem NGYT, tanto 3 dias após o esmagamento, quanto no nervo intacto (**Fig. 30**). Analisando os nervos desta linhagem, fomos capazes de ver o padrão de axônios com mais detalhes, tanto nos nervos normais (primeira linha) quanto após esmagamento (segunda linha). Como resultado da degeneração Walleriana resquícios de GFP permaneceram nas bandas formadas pelas células de Schwann, como podemos ver na segunda linha.



**Figura 30:** Imagens adquiridas de nervos de animais da linhagem NGYT, tanto sem lesão quanto 3 dias após esmagamento do nervo isquiático. Observe os remanescentes de GFP, resultantes da degeneração Walleriana no nervo lesado Barra de escala = 10 $\mu$ m.

#### 4.4 Reação microglial após esmagamento do nervo isquiático (Fig. 31)

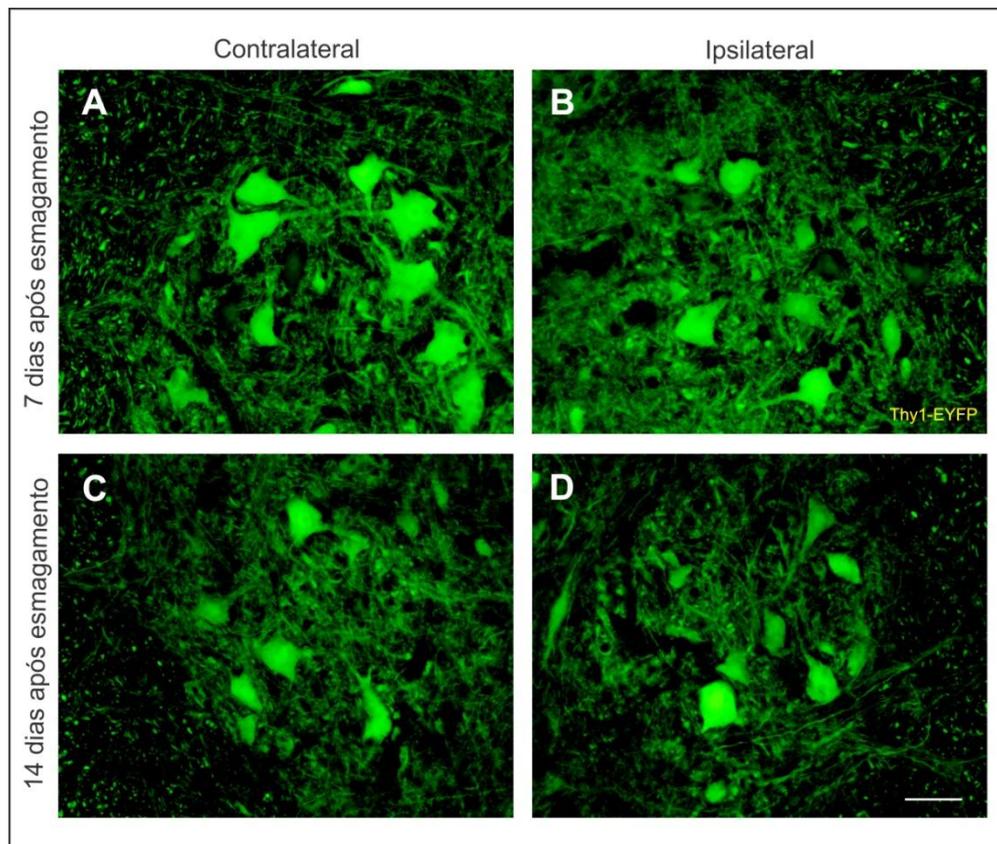
A análise da medula espinal de camundongos CXCR sob microscópio de fluorescência regular, 14 dias após o esmagamento do nervo isquiático (**Fig. 31**), demonstrou a presença de células CX3CR1-GFP positivas no pool do nervo isquiático (**A**), localizado na intumescência lombar. As células microgliais se tornaram maiores e mais arborizadas no lado ipsilateral à lesão (**C**), quando comparadas ao lado contralateral (**B**).



**Figura 31:** Secções da medula espinal lombar de animais CXCR 14 dias após esmagamento do nervo isquiático. Em **A**, representação esquemática do *pool* do nervo isquiático (delimitado pelo círculo) no corno anterior da medula espinal. **B** e **C** mostram a detecção de células CX3CR1-GFP positivas nos lados contra e ipsilateral à lesão, respectivamente. Barra de escala = 50 $\mu$ m.

#### 4.5 Alterações morfológicas em motoneurônios após injúria (Fig. 32)

Através análise da medula espinal de camundongos TFGD, 7 e 14 dias após o esmagamento do nervo isquiático, pudemos ver as alterações morfológicas em motoneurônios localizados no pool do nervo isquiático, localizado na intumescência lombar.



**Figura 32:** Secções da medula espinal lombar de camundongos TFGD, 7 e 14 dias após o esmagamento do nervo isquiático. **A** e **B** são os lados contra e ipsilateral à lesão, respectivamente, 7 dias após lesão. **C** e **D** mostram os lados contra e ipsilateral, 14 dias após o esmagamento, respectivamente. Barra de escala = 50 $\mu$ m.



## 6. Discussão

Ao longo dos anos, a resposta regenerativa do sistema nervoso aos diferentes tipos de injúria é estudada com base em técnicas histológicas que são dependentes da secção de tecidos. Estas técnicas fornecem, em última análise, uma imagem bidimensional dos axônios em regeneração, o que pode levar a interpretações errôneas do processo regenerativo (Becker *et al.*, 2012; Ertürk *et al.*, 2012). O clareamento químico é uma técnica amplamente utilizada para transpor este problema.

O efeito desta técnica depende da imersão das amostras, após desidratação do tecido, em um meio que possui índice de refração similar ao das proteínas (Becker *et al.*, 2012). Dessa maneira, a dispersão da luz é consideravelmente reduzida, portanto os espécimes tornam-se transparentes, permitindo imageamento de camadas mais profundas do tecido (Ertürk *et al.*, 2012).

Diversos agentes clareadores ópticos são utilizados atualmente (Genina *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2012), porém o mais comumente aplicado é o benzil álcool - benzil benzoato (BABB). A exposição do tecido ao BABB pode causar declínio acentuado ou mesmo total do sinal fluorescente (Becker *et al.*, 2012). No sentido de preservar a fluorescência, nós escolhemos o THF como substituto ao etanol para a desidratação do tecido e o DBE como agente clareador óptico.

O THF é um éter cíclico solúvel em água em qualquer proporção e, dessa maneira, pode ser aplicado para substituição da água. Além disso, mostrou não influenciar no sinal fluorescente do tecido (Becker *et al.*, 2012; Ertürk *et al.*, 2012). Da mesma maneira, o clareamento tecidual com DBE mostrou ser mais rápido e mais eficiente que com BABB, provavelmente em virtude da sua baixa viscosidade, que aumenta o poder de penetração (Becker *et al.*, 2012). Além disso, o BABB tem sucesso limitado no

clareamento do tecido nervoso (Ertürk *et al.*, 2012). O clareamento tecidual com THF e DBE também preserva a fluorescência em tecidos nervosos marcados com imunofluorescência (Dodt *et al.*, 2007).

Portanto, através do clareamento tecidual com THF e DBE nós conseguimos o clareamento do nervo isquiático, utilizando os mesmos tempos de incubação para clareamento da medula espinal, padronizados por Ertürk e colaboradores (2011 e 2012). Após o procedimento da técnica, sob observação ao 2P-LSM, fomos capazes de imagear o nervo como um todo. Ao observarmos o tecido somente fixado ao 2P-LSM fomos capazes de detectar a fluorescência na camada superficial do nervo.

Ao olharmos atentamente às projeções 3D dos nervos clareado e não clareado podemos detectar o encolhimento do tecido após clareamento. Este encolhimento é efeito colateral inevitável da técnica. A quantidade total de encolhimento do tecido é relacionada à necessidade de eliminação da água do tecido, necessária para progressão do clareamento (Becker *et al.*, 2012).

O sinal YFP, após clareamento tecidual, não é tão forte quanto o sinal de GFP ou CFP. Isto acontece porque a YFP é menos estável em soluções de clareamento (Ertürk *et al.* 2012). A linhagem TFGD (Thy-1-YFP e GFAP-CFP) foi escolhida para os ensaios de esmagamento do nervo isquiático, apesar da instabilidade do YFP após clareamento, por causa da dupla marcação de neurônios e células de Schwann (no tecido nervoso periférico) e também em função da disponibilidade de animais.

Após esmagamento do nervo isquiático (de animais transgênicos com marcações específicas de populações celulares) nós detectamos, através da análise da linhagem CXCR, aumento na detecção de células CX3CR1 positivas no nervo periférico. Nós correlacionamos o aumento da detecção à infiltração de linfócitos e macrófagos derivados de monócitos no nervo lesionado. A infiltração já ocorre no terceiro dia após o esmagamento e persiste até ao décimo quarto dia, enquanto que no nervo não lesionado a detecção de células CX3CR1-positivas é rara. A presença dessas células imunes no tecido

lesionado é necessária tanto para a fagocitose de restos do processo degenerativo, quanto na secreção de substâncias facilitadoras da regeneração (Zochodne, 2012). Da mesma maneira, a partir da análise das intumescências lombares de animais CXCR submetidos ao esmagamento do nervo isquiático, foi possível detectar aumento no número e no grau de arborização das células microgliais no lado ipsilateral à lesão, em comparação ao lado contralateral.

A partir das análises dos nervos isquiáticos de camundongos da linhagem duplo-híbrida TFGD (Thy1-YFP e GFAP-ECFP) pudemos detectar as alterações morfológicas características da reação do tecido nervoso periférico após injúria. Há detecção do sinal fluorescente de GFAP, correlacionado com a marcação das células de Schwann, no nervo não lesionado e após injúria. A manutenção das células de Schwann no tecido após injúria está relacionada com a função primordial que estas células exercem durante o período regenerativo, seja secretando substâncias pró-regenerativas ou ao guiar o crescimento axonal através a formação das Bandas de Büngner (Kandel *et al.*, 2000; Zochodne, 2012). A detecção da proteína Thy-1, marcador neuronal, sofre um pequeno declínio a partir do sétimo dia e, no décimo quarto dia, há o surgimento de algumas marcações bastante evidentes que podem ser relacionadas com o processo de degeneração Walleriana e início da regeneração axonal, respectivamente.

Já analisando os nervos isquiáticos de camundongos da linhagem NGYT pudemos detectar um acúmulo de proteína GFP em intervalos regulares, coincidentes com a marcação das Células de Schwann. Interpretamos estas estruturas como remanescentes do processo da degeneração Walleriana.

Diferenças significativas no padrão de marcação, especialmente da proteína Thy-1, podem ser notadas entre as linhagens TFGD e NGYT. Basicamente, na linhagem TFGD a YFP é expressa em uma grande população de neurônios, enquanto na linhagem NGYT, apenas uma subpopulação é marcada.

Tendo-se em vista os resultados apresentados, podemos concluir que o procedimento de clareamento tecidual, foi padronizado com sucesso para nervos periféricos e pode ser utilizado para estudo do processo regenerativo após diferentes tipos de injúrias, como esmagamento ou transecção, da mesma maneira que para acompanhar a regeneração no interior de próteses tubulares.

# 7. Conclusões

1. Os tempos de incubação para o procedimento de clareamento do nervo isquiático foram os mesmos já estabelecidos anteriormente para clareamento de medula espinal;

2. O clareamento do nervo isquiático nos permitiu imagear o nervo isquiático todo, em profundidade, sob 2P-LSM;

3. Foi possível detectar alterações morfológicas nos nervos isquiáticos 3, 7 e 14 dias após esmagamento. Dentre as alterações: infiltração de macrófagos e acumulação de produtos da Degeneração Walleriana.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bain, J.R; Mackinnon, S.E; Hunter, D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. 1989. *Plast Reconstr Surg.* 83(1):129-38.
2. Barker, RA. & Widner, H. 2004. Immune problems in central nervous system cell therapy. *NeuroRx.* 1(4): 472-81.
3. Barros, LC; Ferreira-Junior, RS; Berraviera, SRCS; Stolf, HO; Thomazini-Santos, IA; Mendes-Gianini, MJS; Toscano, E; Berraviera, B. 2009. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: application in medicine. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 12(8): 553-571.
4. Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. 2008. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 3ª. edição. Artmed.
5. Becker, K., Järling, N., Saghafi, S., Weiler, R., Dodt, H-U. 2012. Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *Plos One* 7(3): e33916.
6. Bloch, J; Fine, EG; Bouche, N; Zurn, AD; Aebischer, P. 2001. Nerve growth factor- and neurotrophin-3- releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. *Exp. Neurol.* 172(2): 425-432.
7. Bruck, W. 1997. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.* 7(2): 741-752.
8. Caplan, A. I. Adult Mesenchymal Stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. 2007. *Journal of Cellular Physiology.* 213: 341-347.

9. Carlson, K.B; Singh, P; Feaster, M.M; Ramnarain, A; Pavlides, C; Chen, Z.L; Yu, W.M; Feltri, M.L; Stricklan, S. 2011. Mesenchymal stem cells facilitate axon sorting, myelination and functional recovery in paralyzed mice deficient in Schwann cell-derived laminin. *Glia* 59: 267-277.
10. Chan, J.R.; Cosgaya, J.M.; Wu, Y.J.; Shooter, E.M. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *PNAS* 98: 14661-14668.
11. Chao, MV. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4: 299-209.
12. Chen, ZL; Yu, WM; Strickland, S. 2007. Peripheral Regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 30: 209-233.
13. Chen, YS; Hsieh, CL; Tsai, CC; Chen, TH; Cheng, WC; Hu, CL; Yao, CH. 2000. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*. 21(15): 1541-7.
14. Cosgaya, J.M.; Chan, J.R.; Shooter, E.M. 2002. The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science* 298: 1245.
15. Cruz, NI; Debs, N; Fiol, RE. 1986. Evaluation of fibrin glue in rat sciatic nerve repairs. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 78(6): 369-373.
16. Dangelo & Fattini. 2011. Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar. 3ª edição. Atheneu.
17. da Silva, CF; da Gama, SA; Júnior, RM; Pereira, FC. 2003. Influence of highly purified of hyaluronic acid on peripheral nerve regeneration in vivo. *Braz. J. of Morfol. Sci.* 20(2): 121-124.
18. Delorme, B; Ringe, J; Gallay, N; Levern, Y; Kerboeuf, D; Jorgensen, C; Rosset, P; Sensebe, L; Layrolle, P; Haupl, T; Charbord, P. 2007. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*.

19. Dodt, H.U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglgänsberger, W., Becker, K. 2007. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature Methods* 4: 331-336.
20. Dominici, M; Le Blanc, K; Mueller, I; Slaper-Cortenbach, I; Marini, F; Krause, D; Deans, R; Keating, A; Prockop, D; Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*. 8: 315-317.
21. Eng, L.F., Girnikar, R.S., Lee, Y. L. Glial fibrillary acid protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). 2000. *Neurochemical Research*. 23, pp. 1499-1451.
22. Ertürk, A; Richter, M., Hübener, M., Kramer, E., Kirchhoff, F., Dodt, H.U., Bradke, F. 2011. Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nature Medicine*. 18:166-71.
23. Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D. Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M. & Dodt, H. 2012. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nature Protocols*. 7: 1983-1995.
24. Evans, GR; Brandt, K; Katz, S; Chauvin, P; Otto, L; Bogle, M; Wang, B; Meszlenyi, RK; Lu, L; Mikos, AG; Patrick, CW Jr. 2002. Bioactive poly (L-lactic acid) conduits seed with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*. 23(3): 841-848.
25. Fields, RD; Le Beau, JM; Longo, FM; Ellisman, MH. 1989. Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Prog. Neurobiol*. 33(2): 87-134.
26. Frostick, SP; Yin, Q; Kemp, GJ. 1998. Schwann cells, neurotrophic factors and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 18: 397-405.

27. Garbay, B., Heape, A.M., Sargueil, F., Cassagne, C. 2000. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology* 61: 267-304
28. Gaudet, AD; Popovich, PG; Ramer, MS. 2011. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation* 8: 110-123.
29. Genina, E.A.; Bashkatov, A.N., Tuchin, V.V. 2010. Tissue optical immersion clearing. *Expert Rev Med Devices* 7: 825-842
30. Gerdoni, E; Gallo, B; Casazza, S; Musio, S; Bonanni, I; Pedemonte, E; Mantegazza, R; Frassoni, F; Mancardi, G; Pedotti, R; Uccelli, A. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental encephalomyelitis. 2007. *Ann Neurol* 61(3): 219-227.
31. Gille, J; Meisner, U; Ehlers, EM; Muller, A; Russlies, M; Behrens, P. 2005. Migration pattern, morphology and viability of cells suspended in or sealed with fibrin glue: a histomorphologic study. *Tissue and Cell*. 37(5): 339-348.
32. Hell, RCR. 2008. Sobrevivência e plasticidade neuronal após avulsão de raízes motoras e terapia com células tronco mesenquimais. *Universidade Federal de Minas Gerais*. Belo Horizonte, MG.
33. Ide, C. 1996. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci. Res.* 25(2): 101-121.
34. Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T.J., Yoshie, O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leucocyte migration and adhesion. 1997. *Cell*, 91 (4), pp. 521-530.
35. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. 2000. Principles of neural science. 4ª. edição.
36. Keller, P.J., Dodt, H-U. 2012. Light sheet microscopy of living or cleared specimens. *Current Opinion in Neurobiology* 22: 138-143.

37. Kemshead, J.T., Ritter, M.A., Cotmore, S.F. Greaves, M.F. 1982. Human Thy-1: Expression on the cell surface of neuronal and glial cells. *Brain Research* 236: 451-461.
38. Kettenmann, H e Ransom, BR. 2005. Neuroglia. 2ª edição.
39. Labrador, RO; Buti, M; Navarro, X. 1995 Peripheral nerve repair: role of agarose matrix density on functional recovery. *Neuroreport* 6(15): 2022-2026.
40. Labrador, RO; Butí, M, Navarro, X. 1998. Influence of collagen and laminin gels concentration nerve regeneration after resection and tube repair. *Exp. Neurol.* 149(1): 243-252.
41. Ladak, A; Olson, J; Tredget, EE; Gordon, T. 2011. Differentiation of mesenchymal stem cells to support nerve regeneration in a rat model. *Exp. Neurol.* Article in press.
42. Lee, S.K.; Wolfe, W. 2000. Peripheral Nerve Injury and Repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 8:243-252.
43. Li, Y; Chen, XG; Wang, L. Gautam, SC; Xu YX; Katakowski, M; Zhang, LJ; Lu, M; Janakiraman, N; Chopp, M. 2002. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 27(4): 514-523.
44. Lundborg, G; Rosen, B; Abrahamson, SO; Dahlin, L; Danielsen, N. 1994. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. *J. Hand Sur.* 19: 273-276.
45. Lundborg, G; Rosen, L; Dahlin, L; Holmberg, J; Rosen, I. 2004. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J. Hand Surg.* 29: 100-107.
46. Machado, A.B.M. 2006. Neuronatomia Funcional, 2ª. edição. Atheneu, São Paulo.
47. Maltman, DJ; Hardy, SA; Przyborski, SA. 2011. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochemistry International.* 59: 347-356

48. Maniatopoulos, C; Sodek, J; Melcher, AH. 1988. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young a adult rats. *Cell Tissue Res.* 254: 317-330.
49. Mayhew, TM & Sharma, AK. 1984. Sampling schemes for estimating nerve fibre size. II. Methods for unifascicular nerve trunks. *J. Anat.* 139(Pt 1): 59-66.
50. Morales, MM. 2007. Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. São Paulo. Atheneu.
51. Navarro, X; Verdú, E; Rodriguez, F.J; Ceballos, D. Artificial nerve graft for the repair of peripheral nerve injuries. 2001. *Neurol Sci* 22: S7-S13
52. Oliveira, ALR; Pierucci, A; Pereira, KB. 2004. Review: Peripheral nerve through the nerve tubulization technique. *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(4): 225-231.
53. Pereira Lopes, FR; Campos, LCM; Corrêa Jr, JD; Balduino, A; Lora, S; Langone, F; Borojevic, R; Martinez, AMB. 2006. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Experimental Neurology.* 198(2): 457-468.
54. Pierucci, A; Faria, AM; Pimentel, ER; Santos, AR Jr.; Oliveira, ALR. 2004. Effects of agrecan on Schwann cell migration *in vitro* and nerve regeneration *in vivo*. *Braz. J. Morphol. Sci.* 21(3): 125-130.
55. Prockop, DJ. 2007. "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 82: 241-243.
56. Ribeiro-Resende, VT; Koenig, B; Nichterwitz, S; Oberhorffner, S. Schlosshauer, B. 2009. Strategies for inducing the formation of bands of Büngner in peripheral nerve regeneration. *Biomat.* 30: 5251-5259.
57. Rodrigues, FJ; Verdú, E; Ceballos, D; Navarro, X. 2000. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 161(2): 571-584.

58. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. 2012. FIJI: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9 (7): 676-682.
59. Schmidt, CE & Leach, JB. 2003. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5: 293-347.
60. Schipani, E; Kronenberg, H.M. Adult Mesenchymal Stem Cells. 2009. Stem Book.
61. Schlosshauer, B; Muller, E; Schroder, B; Planck, H; Muller, HW. 2003. Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration. *Brain Res.* 963(1-2): 321-326.
62. Seddon, H. 1943. Three types of nerve injury. *Brain* 66: 237-288.
63. Siemionow, M e Brzezicki, G. 2009. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *International Review of Neurobiology* 87: 141-172.
64. Silver, FH; Wang, MC; Pins, GD. 1995. Preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials.* 16(12): 891-903.
65. Steffens, H., Nadrigny, F. and Kirchhoff, F. 2011. Two-Photon Imaging of Neurons and Glia in the Spinal Cord In Vivo. *Imaging in Neuroscience: A Laboratory Manual.* pp. 715-727. Cold Spring Harbor Laboratory.
66. Stewart, O; Zheng, B; Tessier-Lavigne, M. 2003. False resurrections: distinguishing regenerated axons from spared axons in the injured central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 459(1): 1-8.

67. Sundback, C; Hadlock, T; Cheney, M; Vacanti, J. 2003. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials*. 24(5): 819-830.
68. Sunderland, S. 1990. The anatomy and physiology of nerve injury. *Muscle & Nerve*. 13(9): 771-784.
69. Tolwani, R.J; Cosgaya, J.M.; Varma, S.; Jacob, R.; Kuo, L.E.; Shooter, E.M. 2004. BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 77: 662 - 669.
70. Tong, XJ; Hirai, K; Shimada, H; Mizutani, Y; Izumi, T; Toda, N; Yu, P. 1994. Sciatic nerve regeneration navigated by laminin-fibronectin double coated biodegradable collagen grafts in rats. *Brain Res*. 663(1): 155-162.
71. Uccelli, A; Moretta, L; Pistora, V. 2008. Mesenchymal stem cells in healthy and disease. *Nature Reviews: Immunology* 8: 726-736.
72. Uccelli, A; Benvenuto, F; Laroni, A; Giunti, D. 2011a. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 24: 59-64
73. Uccelli, A; Laroni, A; Freedman, M.S. 2011. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol* 10: 649-56.
74. Urbán, VS; Kiss, J; Kovács, J; Góczy, E; Vas, V; Monostori, E; Uher, F. 2008. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 26: 244-253.
75. Vries, J; Menovsky, T; Gulik, SV; Wesseling, P. 2002. Histological effects of fibrin glue on nervous tissue - a safety study in rats. *Surg Neurol*. 57(6): 415-22.
76. Wang, J; Ding, F; Gu, Y; Liu, J; Gu, X. 2009. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells *in vitro* and *in vivo*. *Brain Research* 1262: 7-15.

77. Wennersten, A; Holmin, S; Al Nimer, F; Meijer, X; Wahlberg, LU; Mathiesen, T. 2006. Sustained survival of xenografted human neural stem/progenitor cells in experimental brain trauma despite discontinuation of immunosuppression. *Exp Neurol*. 199(2): 339-47.
78. Widmer, M.S.; Gupta, PK; Lu, L; Meszlenyi, RK; Evans, GR; Brandt, K; Savel, T; Gurlek, A; Patrick, CW Jr; Mikos, AG. 1998. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials*. 19(21): 1945-1955.
79. Williams, D.F. 1999. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool University Press, p.42.
80. Wood, M.D.; Kemp, S.W.P.; Gregory, C.W.H.; Tessa Gordon, B. 2011. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Annals of Anatomy* 193: 321-333
81. Yannas, IV e Hill, BJ. 2004. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. *Biomaterials*. 25(9): 1593-1600.
82. Yoshimura, T; Kawano, Y; Arimura, N; Kawabata, S; Kikuchi, A; Kaibuchi, K. 2005. GSK-3 $\beta$  regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120: 137-149.
83. Zochodne, D. W. 2000. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle Nerve Suppl*. 9: S33-S38.
84. Zochodne, D. W. 2012. The challenges and beauty of peripheral nerve regrowth. *Journal of Peripheral Nervous System* 17: 1- 18.

# Anexos - Declaração e certificado CEUA/UNICAMP

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "UTILIZAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA COMBINADO COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NO REPARO DE NERVOS PERIFÉRICOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE TUBULIZAÇÃO".

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

( x ) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2076-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº \_\_\_\_\_, Instituição: \_\_\_\_\_

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

*Luciana Politti Cartarozzi*  
Aluna: Luciana Politti Cartarozzi

*Alexandre L.R. Oliveira* Prof. Alexandre L.R. Oliveira  
Orientador: Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:  
(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

*Ana Maria Aparecida Guaraldo*  
Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:  
( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura



UNICAMP



CEUA/Unicamp

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

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 2076-1, sobre "Utilização de selante de fibrina e colágeno com organização supramolecular combinados com células tronco mesenquimais e células de Schwann no reparo de nervos periféricos através da técnica de tubulização", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira / Luiz Gabriel Maturana / Luciana Politti Cartarozzi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 08 de fevereiro 2010.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 2076-1, entitled "The use of a fibrin sealant combined with naturally supraorganized collagen, mesenchymal stem cells and Schwann cells in the repair of peripheral nerves through the tubulization technique", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on February 8, 2010.

Campinas, 1º. de março 2011.

2ª. VIA

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva