



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS
MESTRADO FORA DE SEDE/UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

CINTIA PINHEIRO SILVEIRA ARAÚJO

**REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO EM
CAMUNDONGOS UTILIZANDO TUBULIZAÇÃO E
ENXERTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ADIPOSAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro e Universidade Federal da Bahia visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas

RIO DE JANEIRO/SALVADOR

AGOSTO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO EM CAMUNDONGOS
UTILIZANDO TUBULIZAÇÃO E ENXERTO DE CÉLULAS
MESENQUIMAIS ADIPOSAS**

CINTIA PINHEIRO SILVEIRA ARAÚJO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfológicas/Mestrado Fora de Sede como pré-
requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Morfológicas

Orientadora: Prof^a Tatiana Lobo Coelho de Sampaio (UFRJ)

Co-orientadora: Prof^a Lenira Camargo de M. Campos (UFRJ)

Co-orientadora: Prof^a Fabiana Paim Rosa (UFBA)

RIO DE JANEIRO/SALVADOR

**Agosto
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

ARAÚJO, Cintia Pinheiro Silveira

REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO EM CAMUNDONGOS UTILIZANDO TUBULIZAÇÃO E ENXERTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ADIPOSAS. Rio de Janeiro, UFRJ, 2008.

Dissertação de Mestrado

xvii, 128 pp.

1. Regeneração 2. Sistema Nervoso Periférico 3. Tubulização 4. Células mesenquimais derivadas do tecido adiposo 5. Polihidroxibutirato

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Ciências Biomédicas - ICB

II. Dissertação

**Título: REGENERAÇÃO DO NERVO CIÁTICO EM CAMUNDONGOS
UTILIZANDO TUBULIZAÇÃO E ENXERTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ADIPOSAS**

Autora: Cintia Pinheiro Silveira Araújo

Dissertação de mestrado submetida à avaliação pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ (Mestrado Fora de Sede UFRJ/UFBA), como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada por:

Prof^a. _____
Tatiana Lobo Coelho de Sampaio ICB/UFRJ
Orientadora

Prof^a. _____
Lenira Camargo de Moura Campos ICB/UFRJ
Co-Orientadora

Prof^a. _____
Fabiana Paim Rosa – UFBA
Co-Orientadora

Prof. _____
Radovan Borojevic – ICB/UFRJ
Presidente da Banca

Prof^a. _____
Maria de Fátima Dias Costas – UFBA

Prof. _____
Vítor Antonio Fortuna – UFBA

Prof. _____
Victor Túlio Ribeiro de Resende
Revisor e Suplente

Rio de Janeiro/Salvador

2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas na Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Tatiana Lobo Coelho de Sampaio e co-orientação das professoras Lenira Camargo de Moura Campos e Fabiana Paim Rosa, com auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO AO MEU MARAVILHOSO MARIDO
CHRISTIAN. FORAM TUAS MÃOS QUE ENCONTREI QUANDO PRECISEI
DE CARINHO E AS TUAS PALAVRAS QUE ENCONTREI QUANDO
PRECISEI DE FORÇA... ELAS ME GUIARAM E ME FORTALECERAM. SE
EU CHEGUEI ATÉ AQUI, É PORQUE VOCÊ ESTEVE E ESTÁ COMIGO!
OBRIGADA PELO SEU AMOR INCONDICIONAL! NÃO EXISTEM
PALAVRAS CAPAZES DE REPRESENTAR MINHA GRATIDÃO.
AMO VOCÊ!**

AGRADECIMENTOS

SE HOJE ESTE TRABALHO EXISTE, É PORQUE MUITAS PESSOAS ESTIVERAM AO MEU LADO E CONTRIBUÍRAM PARA QUE O MEU SONHO SE REALIZASSE. EM NOME DESSE SONHO, GOSTARIA DE AGRADECER, SEM HIERARQUIA, A TODOS QUE DIRETA OU INDIRETAMENTE PARTICIPARAM COMIGO DESSE LONGO PERCURSO:

AGRADEÇO IMENSAMENTE A DEUS PELA MINHA VIDA E SAÚDE E POR TER COLOCADO NO MEU CAMINHO PESSOAS TÃO PRECIOSAS;

AOS MEUS PAIS, WILSON E SHIRLEY, QUE ME PROPORCIONARAM A BASE DA EDUCAÇÃO E O APOIO PARA CONTINUAR. MINHA MÃE, MEU ALICERCE DE VIDA, SEM VOCÊ NADA NA MINHA VIDA FARIA SENTIDO, OBRIGADA POR ACREDITAR EM MIM, REZAR POR MIM, CUIDAR DE MIM, PARTICIPAR E SE ENVOLVER EM MINHA VIDA SEMPRE. *VOCÊS SÃO TUDO PRA MIM!*

A MEUS IRMÃOS: JÚNIOR, POR ME FAZER SENTIR AMADA; BRUNO PELA PACIÊNCIA, EMPENHO E TODO O APOIO CONCEDIDO NA CONSTRUÇÃO DESTE TRABALHO. CONTAR COM VOCÊ FOI ESSENCIAL NESTA FINALIZAÇÃO! *AMO VOCÊS SEMPRE E PARA SEMPRE!*

A MINHA SEGUNDA FAMÍLIA, ALESSIA, JOEL, AMANDA, D. DETE, FABRIZIO E A NOSSA TÃO ESPERADA LAURA, QUE CHEGOU TRAZENDO TANTA ALEGRIA NUM MOMENTO DE TANTAS EMOÇÕES... OBRIGADA POR ACREDITAREM EM MIM E COMPREENDEREM A MINHA AUSÊNCIA NESTE PERÍODO. *VOCÊS SÃO ESPECIAIS!*

A MINHA QUERIDA ORIENTADORA TATIANA, PESSOA DE GRANDE CORAÇÃO E EXEMPLO CIENTÍFICO, *MINHA ESPECIAL ADMIRAÇÃO E GRATIDÃO ETERNA!*

A MINHA MARAVILHOSA ORIENTADORA LELA, QUE SE TORNOU MAIS DO QUE AMIGA... A VOCÊ QUALQUER AGRADECIMENTO SE TORNA PEQUENO DIANTE DE TUDO QUE FEZ POR MIM. ME ACOLHEU EM SEU LAR E EM SEU CORAÇÃO...VOCÊ FOI MAIS QUE ORIENTADORA DA DISSERTAÇÃO... FOI A MINHA ORIENTADORA DE VIDA ... OBRIGADA PELO SEU ASTRAL MARAVILHOSO E CONTAGIANTE, PELA SUA FRANQUEZA E POR CONTRIBUIR PARA QUE ESTE SONHO SE CONCRETIZASSE, TORNANDO MAIS LEVE OS MOMENTOS MAIS DIFÍCEIS QUE TIVEMOS QUE PASSAR... *MUITA EMOÇÃO!*

AO PROF. RADOVAN, MENTE BRILHANTE, EXEMPLO DE SIMPLICIDADE E ESPÍRITO NOBRE; GRANDE *INSPIRAÇÃO PARA CONTINUAR A DESBRAVAR O MUNDO DA CIÊNCIA!*

AOS COLABORADORES DESTE TRABALHO, PROF^a ISABEL, LEANDRA, PROF LEONARDO E SABRINA POR TODO APOIO E DISPONIBILIDADE!

À PROFESSORA CHRISTINA, SEMPRE SOLÍCITA, MEUS AGRADECIMENTOS POR TANTAS CONTRIBUIÇÕES E POR TAMBÉM ME ACOLHER EM SEU LABORATÓRIO;

AOS MEUS GRANDES EXEMPLOS DE PROFISSÃO E ETERNOS PROFESSORES ABRAHÃO, KATIA E ELEN. OBRIGADA PELOS ENSINAMENTOS E INCENTIVO. *SOU ETERNA ADMIRADORA DE VOCÊS!*

AOS COLEGAS E AMIGOS DO LBMEC: A SUPER CAMILA, AO MARQUITO, MADA, KIMIE, KARLINHA, RAFA E DILZA, PELOS MOMENTOS DE CONVÍVIO, TROCAS, AFETO, PELAS MILHARES DE AJUDAS E PELA AMIZADE SOLIDIFICADA AO LONGO DESTE TRABALHO, QUE, CERTAMENTE SE ETERNIZARÁ. *SAUDADES...*

A TODOS OS MEUS AMIGOS, VERDADEIROS TESOUROS, ESPECIALMENTE MABEL, RODRIGO E TALITHA, QUE ESTIVERAM COMIGO AO LONGO DESTA JORNADA... *VOCÊS FORAM ESSENCIAIS. AMO VOCÊS!*

À FAMÍLIA QUE GANHEI NO RJ, LITO, FELIPE E ANDRÉ, OBRIGADA POR ME FAZEREM SENTIR PARTE DESTA LINDA FAMÍLIA!

AOS MEUS ALUNOS POR ME ESTIMULAREM AO CRESCIMENTO COMO PESSOA E COMO PROFISSIONAL E AOS MEUS PACIENTES POR ENTENDEREM E PERMITIREM MINHA AUSÊNCIA PARA QUE ESTE TRABALHO FOSSE REALIZADO, *SEM VOCÊS EU NÃO CHEGARIA AQUI!*

AO PROFESSOR VICTOR RESENDE, REVISOR DESTE TRABALHO, POR TODA A PACIÊNCIA E AOS PROFESSORES EXAMINADORES DESTA DISSERTAÇÃO, PELA OPORTUNIDADE QUE ESTÃO ME DANDO!

FUI TRANSPASSADA PELAS HISTÓRIAS DE CADA UM DE VOCÊS. HOJE ME SINTO TRANSFORMADA!

“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada, os cumes das montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através de povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Nem você pode voltar. Voltar é impossível na existência; você pode apenas ir em frente. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entra no oceano o medo desaparece, porque apenas o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas torna-se oceano. Por um lado é desaparecimento e, por outro lado, é uma tremenda ressurreição.”

OSHO

RESUMO

As lesões do sistema nervoso periférico (SNP) causam danos motores e sensitivos com conseqüente perda funcional da extremidade acometida. Os prejuízos causados por uma lesão completa ou neurotmesa são ainda mais sérios, podendo levar a síndromes de dor neuropática e diminuição da qualidade de vida, o que constitui um grande desafio para pesquisadores e clínicos. Embora haja no SNP evidências de um franco processo regenerativo após lesão, permanece o interesse em se descobrir mecanismos e técnicas que acelerem este processo reparador. Muitos esforços têm sido realizados para induzir a regeneração nervosa no local da lesão do nervo, incluindo desde procedimentos cirúrgicos à utilização de biomateriais, terapias celulares e reabilitação. O objetivo desse estudo foi verificar a contribuição das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano (ADSCs) no processo de regeneração após cinco semanas da secção total. Para isto realizou-se transecção total, seguida de tubulização com uma prótese de poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) no nervo ciático esquerdo de 15 camundongos *Balb-C*. No primeiro grupo (n=5) foram adicionadas ADSCs dentro do tubo (grupo MA); no segundo grupo (n=5) foi injetado apenas meio de cultura DMEM (grupo DMEM) e no terceiro grupo (n=5) o tubo foi deixado vazio (grupo TP). Os resultados mostraram uma piora do Índice Estático do Ciático após uma, três e cinco semanas em todos os três grupos experimentais, sendo que o grupo TP apresentou os piores índices. Porém, na oitava semana após a lesão, o grupo MA apresentou melhora da função, diferente do grupo DMEM que continuou piorando. Em todos os grupos foi possível observar a presença de reação inflamatória localizada, degeneração axonal, vacuolização e neovascularização. A marcação para macrófagos e vasos permitiu evidenciar similaridade entre os grupos, porém a imunomarcação para células de Schwann (SCs) mostrou maior presença destas células no grupo MA e maior organização do tecido. Ao contrário, o grupo DMEM possuiu um tecido mais frouxo e desorganizado e o grupo TP apresentou menos marcação. Nas medidas dos nervos em cortes transversais o grupo MA apresentou nervo regenerado com maior área de tecido nervoso. O grupo DMEM obteve uma área total maior que a área de tecido nervoso encontrado, evidenciando tecido frouxo. A análise do diâmetro médio dos nervos mostrou que no grupo DMEM houve aumento do tecido não neural no segmento regenerado, o que não ocorreu nos demais grupos. Quando se comparou a média dos diâmetros dos diferentes grupos verificou-se que o grupo MA apresentou tanto o diâmetro total do segmento quanto do tecido neural presente maior que o do grupo TP com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Houve também diferença entre DMEM e TP ($p < 0,01$), porém o diâmetro total ou do tecido neural presente no grupo MA não foi diferente que o visto nos animais do grupo DMEM ($p > 0,05$). Os resultados indicam que a associação entre tubulização com P3(HB) e transplante de células mesenquimais adiposas constitui-se em uma opção promissora para o desenvolvimento de tratamentos para lesões periféricas.

Palavras-chave: Regeneração; sistema nervoso periférico; tubulização; células mesenquimais derivadas do tecido adiposo, polihidroxibutirato.

ABSTRACT

Peripheral nervous system (PNS) injury causes serious sensory and motor deficiencies with consequent functional deficit of the denervated extremities. The damage caused by a complete injury or neurotmesis are still more serious, eventually leading to neuropathic pain syndromes and to a decrease in quality of life. This constitutes a great challenge for scientists and physicians. Despite the spontaneous PNS regeneration, interest remains in discovering mechanisms and techniques that can contribute to accelerate and improve the repairing process. Many efforts have been carried out to induce nervous regeneration at the injury site, including surgical procedures, the use of biomaterials, cellular therapies and rehabilitation. The main goal of this study is to investigate the contribution of grafted human adipose-derived stem cells (ADSCs) in the process of regeneration after five weeks of a complete transection. The surgery was followed by tubulization with a prosthesis of poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) in the sciatic left nerve of 15 Balb-C mice. In the first group (n=5) ADSCs were added inside the tube (MA group); in the second group (n=5) only DMEM culture medium was injected (DMEM group) and in the third group (n=5) the tube was left empty (TP group). The results showed a progressive worsening of the sciatic static index (SSI) after one, three and five weeks in all the three experimental groups, whereas TP presented the worst rates. In the eighth week after injury, the MA group slightly improved, differently from the group DMEM, which kept on getting worse. In all the three groups it was possible to observe the presence of a localized inflammatory reaction, axonal degeneration, vacuolization and neovascularization. Immunolabeling for macrophages and capillaries were similar among the groups. On the other hand, labeling for Schwann cells (SCs) showed a higher number of such cells in the MA group. It was also possible to note that the overall appearance of the regenerated nerves revealed areas of unorganized and loose tissue in the DMEM group, while in MA treated animals the nervous tissue seemed more compact. The DMEM group presented a total diameter larger than the diameter of the nervous tissue, which is compatible with the idea of DMEM inducing the formation of a loose non nervous tissue at the regeneration site. Comparison of the average diameters for the three groups showed that TP was significantly narrower than the others ($p < 0,001$). There was also a difference between DMEM and TP ($p < 0,01$). However, the diameters of both total or only neural tissue were not significantly different between MA and DMEM ($p > 0,05$). These results indicate what the association between tubulization with P3(HB) and transplant of mesenchymal adipose cells constitutes in a promising opportunity for the development of new treatments for peripheral injuries.

Key words: Regeneration; peripheral nervous system; tubulization; adipose-derived stem cells, poly-hydroxybutyrate.

ABREVIATURAS

ADSCs – células-tronco derivadas do tecido adiposo (do inglês, *adipose-derived stem cells*)

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*)

BSA – soro albumina bovina (do inglês, *bovine serum albumin*)

CAM – molécula de adesão celular (do inglês, *cell adhesion molecule*)

cAMP – adenosina monofosfato cíclica (do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*)

CN – condute neuronal

CNTF – fator neurotrófico ciliar (do inglês, *ciliary neurotrophic factor*)

CP – comprimento da pegada

DAPI – 4',6-Diamidino-2-fenilindol (do inglês, *4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*)

DMEM – (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DRG – gânglio da raiz dorsal (do inglês, *dorsal root ganglia*)

DTn – diâmetro do nervo normal

ECM – matriz extracelular (do inglês, *extracellular matrix*)

ED – espalhamento dos dedos

EGF– fator de crescimento da epiderme (do inglês, *epidermal growth factor*)

Fc – fator de correção

FGF– fator de crescimento de fibroblasto (do inglês, *basic fibroblast growth factor*)

GDNF – fator neurotrófico derivado da glia (do inglês, *glial derived neurotrophic factor*)

GFAP– proteína acídica fibrilar glial (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*)

GGF– fator de crescimento glial (do inglês, *glial growth factor*)

GSK-3 β – Glicogênio Sintase Quinase 3 β (do inglês, *glicogênio sintase kinase 3 β*)

HE – hematoxilina & eosina

IL-6 – interleucina-6

LLn – largura do nervo normal

MA – mesenquimais adiposas

MAG – glicoproteína associada à mielina (do inglês, *myelin-associated glycoprotein*)

MBP – proteína básica da mielina, (do inglês, *myelin basic protein*)

MO – medula óssea

MSCs – células-tronco mesenquimais (do inglês, *mesenchymal stem cells*)

NGF – fator de crescimento do nervo (do inglês, *nerve growth factor*)

NIH – Instituto Nacional de Saúde (do inglês, *National Institutes of Health*)

NT – neurotrofina 3 (do inglês, *neurotrophin-3*)

P(3HB) – poli-hidroxi-3-butilato

P0 – proteína zero

PBS – salina tamponada por fosfato (do inglês, *phosphate buffered saline*)

PDGF – fator de crescimento derivado das plaquetas (do inglês *platelet-derived growth factor*)

PHA – polihidroxialcanoato

PHB – polihidroxibutilato

PHH – polihidroxihexanoato

PHO – polihidroxi octanoato

PHV – polihidroxivalerato

PI3K – fosfatidil-inositol-3 quinase (do inglês, *phosphatidylinositol-3 kinase*)

PKA – proteína cinase A (do inglês, *protein kinase A*)

PMP22 – proteína periférica da mielina 22 (do inglês, *peripheral myelin protein 22*)

PP – polipropilenos

SC – células de Schwann (do inglês, *Schwann cells*)

SFI – índice funcional do ciático (do inglês, *sciatic functional index*)

SN – sistema nervoso

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

SSI – índice estático do ciático (do inglês, *sciatic static index*)

STAT3 – sinal transdutor e ativador da transcrição 3 (do inglês, *Signal transducer and activator of transcription 3*)

TGF – fator de crescimento transformante (do inglês, *transforming growth factor*)

TGF β – fator de crescimento transformante tipo beta (do inglês, *transforming growth factor β*)

TGF α – fator de crescimento transformante tipo alfa (do inglês, *transforming growth factor alpha*)

TNF – fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)

TNF- α – fator de necrose tumoral tipo alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*)

TP – tubo puro

WD – degeneração Walleriana (do inglês, *wallerian degeneration*)

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema ilustrando os componentes do Sistema Nervoso Periférico	22
FIGURA 2: Composição esquemática do nervo periférico	24
FIGURA 3: Fascículo do nervo ciático em corte transversal	24
FIGURA 4: Inervação do nervo ciático	25
FIGURA 5: Relação anatômica da divisão do nervo ciático na região glútea	26
FIGURA 6: Vista frontal do nervo ciático, com o osso pélvico parcialmente removido	27
FIGURA 7: Processo de degeneração e regeneração de uma fibra nervosa após uma lesão	34
FIGURA 8: Esquema representando a ativação da capacidade de crescimento intrínseca pela lesão nervosa periférica	37
FIGURA 9: Esquema mostrando os eventos do processo de regeneração axonal periférica	39
FIGURA 10: Esquema da sutura epineural externa	41
FIGURA 11: Seqüência do Procedimento de tubulização do nervo ciático do camundongo	58
FIGURA 12: Procedimento de tubulização do nervo ciático do camundongo após transecção	59
FIGURA 13: Fotografia em baixo aumento do tubo P3HB	60
FIGURA 14: Cultura das células mesenquimais do tecido adiposo	63
FIGURA 15: Potencial de diferenciação de MSCs de tecido adiposo	63
FIGURA 16: Aparato utilizado para o teste funcional	73
FIGURA 17: Fotografia das patas do camundongo obtida para realização das medidas do teste funcional	74
FIGURA 18: Macroscopia do nervo ciático do camundongo	79
FIGURA 19: Corte transversal da porção proximal do nervo ciático do camundongo, evidenciando os três fascículos	79
FIGURA 20: Micrografias eletrônicas de varredura da superfície externa do tubo de Polihidroxibutirato	81
FIGURA 21: Micrografias eletrônicas de varredura do tubo de Polihidroxibutirato	82
FIGURA 22: Gráfico do Índice Estático do nervo ciático com desvio padrão ao longo de oito semanas	84
Figura 23: Vista macroscópica e microscópica do nervo ciático do camundongo após 5 semanas da neurotinese	86
Figura 24: Resposta pós-traumática do nervo ciático, evidenciada pelo processo inflamatório e degenerativo	87
Figura 25: Fotomicrografias de cortes longitudinais do nervo ciático em HE	89
Figura 26: Coloração com Pricosirius Red para eosinófilos	91
Figura 27: Imunomarcção com Griffonia e F4 80	93
Figura 28: Imunomarcção com Griffonia e F4 80	94
Figura 29: Cortes longitudinais do nervo ciático com marcação para S100	95
Figura 30: Medidas dos cortes longitudinais	97
Figura 31: Medidas das áreas dos cortes transversais	98
Figura 32: Diâmetros de tecido total e de tecido nervoso	99

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
ABREVIATURAS	xii
INDICE DE FIGURAS	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	18
1.1. Sistema Nervoso Periférico	21
1.1.1. Anatomia Básica	21
1.1.2. Nervo Ciático	24
1.2. Lesão Nervosa Periférica	28
1.2.1 Classificação e Quadro Clínico	29
1.2.2 Fisiopatologia	30
1.2.2.1 Degeneração e Regeneração do Sistema Nervoso Periférico	30
1.2.3 Estratégias de tratamento da lesão nervosa Periférica	40
1.2.3.1 Reparo Cirúrgico	41
1.2.3.2 Tubulização	42
1.2.3.3 Transplante Celular	45
a) Células de Schwann	46
b) Células-tronco mesenquimais da medula óssea	46
c) Células-tronco derivadas do tecido adiposo	49
1.2.4 Avaliação funcional do nervo ciático após lesão	51
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	55
2.1 Geral	55
2.2 Específicos	55
CAPÍTULO 3: METODOLOGIA	56
3.1 Animais Experimentais	57
3.2 Procedimento Cirúrgico	57
3.3 Tubo de Polihidroxibutirato – P(3HB)	59
3.4 Desenho Experimental	60
3.5 Isolamento das Células Mesenquimais do Tecido Adiposo Humano	61
3.6 Perfusão e Fixação do Tecido	64
3.7 Processamento do Tecido	64
3.8 Colorações Histológicas	65
a) Hematoxilina & Eosina (HE)	66
b) Picrosirius Red para Eosinófilos	66
3.9 Imunohistoquímica	67
a) S100 – Rabbit Anti Cow – marcação das células de Schwann	67
b) Griffonia – Lectina – Bandeiraea simplicifolia – L 2140	68
c) Anti-F4/80 – marcação dos Macrófagos	69
3.10 Mensuração da Zona de Regeneração	70
3.11 Teste Funcional do Ciático	72
3.12 Análise Estatística	75
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	76
4.1 Tubo de Poli-3hidroxibutirato (P3HB)	80
4.2 Testes Funcionais	83
4.3 Observação Morfológica	85
4.4 Identificação de Tipos Celulares por Imunohistoquímica	92

4.5	Quantificação da Área, Diâmetro e Largura do Nervo Regenerado	96
CAPÍTULO 5:	DISCUSSÃO	100
CAPÍTULO 6:	CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS		114

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A regeneração do tecido nervoso tem sido tema importante de pesquisa científica. Embora haja no Sistema Nervoso Periférico (SNP) evidências de um franco processo regenerativo após lesão, permanece o interesse em se descobrir mecanismos e técnicas que acelerem esse processo reparador, contribuindo para a redução de comprometimentos funcionais posteriores.

No ano de 1995, estimou-se cerca de cinqüenta mil procedimentos para reparo neuronal nos Estados Unidos (EUA) (BELLAMKONDA, 2006). No Hospital de Base do Distrito Federal (Brasília), foram atendidos cinqüenta e três pacientes com lesões traumáticas de nervos periféricos no período de um ano (FLORES, 2006). O grande número de lesões traumáticas, os altos custos gerados e a grande perda funcional, acompanhada por dor e desconforto, resultam em importante impacto social e psicológico, constituindo um problema de saúde pública.

Diversas abordagens microcirúrgicas refinadas são utilizadas para promover o reparo de nervos periféricos, porém os resultados clínicos permanecem desapontadores, especialmente quanto à recuperação funcional motora e sensitiva, e melhores estratégias são necessárias (JEROSCH-HEROLD, 1993; ROSÉN, 2000; LUNDBORG, 2004). O uso de enxertos autólogos tem sido a técnica mais utilizada, porém possui como desvantagens a perda da função neuronal do local doador, a incompatibilidade entre as dimensões do nervo e o enxerto, e a probabilidade de formação de neuroma (LANGONE *et al.*, 1995).

O uso de próteses tubulares visando à reconexão do segmento deixado entre dois cotos nervosos após uma injúria tem sido intensamente investigado (MOHANNA *et al.*, 2003; MURAKAMI, *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2007; PFISTER *et al.*, 2007; PANSERI *et al.*, 2008). A tubulização é uma técnica que

consiste na utilização clínica de tubos artificiais em nervos seccionados para promover a regeneração nos casos onde permanece uma fenda irreduzível entre os cotos proximal e distal. Dessa forma, serve como um conduto ou guia para o crescimento das fibras por orientação mecânica e confinamento e para desestimular a formação de neuromas ou outros prejuízos funcionais causados pelo crescimento axonal mal direcionado (FIELDS *et al.*, 1989; LANGONE *et al.*, 1995).

O avanço da bioengenharia tecidual vem contribuindo para o aumento das pesquisas que associam a utilização de próteses tubulares ao enxerto de diversos tipos celulares, como por exemplo, células da medula óssea e transplante de células de Schwann. Essa abordagem tende a favorecer a regeneração do nervo periférico (DEZAWA *et al.*, 2001; PEREIRA LOPES *et al.*, 2006; BRAGA-SILVA *et al.*, 2006; BRAGA-SILVA *et al.*, 2008a) . As células mesenquimais derivadas do tecido adiposo são uma população de células progenitoras extraídas do tecido adiposo descartado em cirurgias de lipoaspiração. Pesquisas recentes têm reportado sua diferenciação em condrócitos, miócitos, osteoblastos e, mais recentemente, em células progenitoras neurais (KANG *et al.*, 2003a; TOHILL *et al.*, 2004; KOKAI *et al.*, 2005, BAPTISTA *et al.*, 2007; WOSNITZA *et al.*, 2007). O transplante dessas células já foi testado inclusive no Sistema Nervoso Central (SNC), e os estudos sugerem que esse tipo celular seja capaz de sofrer diferenciação neuronal (KANG *et al.*, 2003b).

A resposta neuronal à lesão nervosa periférica tem sido intensamente estudada por mais de um século, e certamente é o melhor exemplo da plasticidade neuronal em vertebrados adultos (RAMON Y CAJAL, 1991 *apud* STOLL *et al.*, 2002; SNIDER *et al.*, 2002). Este estudo, aqui apresentado, utilizou a tubulização do nervo ciático em camundongos com prótese de Poli-3-hidroxibutirato (P3HB) e células mesenquimais do tecido adiposo humano, para verificação da regeneração nervosa.

1.1 SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO

1.1.1 Anatomia Básica

Anatomicamente, o Sistema Nervoso (SN) é dividido em Sistema Nervoso Central (SNC), compreendido pelo encéfalo, medula espinhal e partes neurais do olho, e em Sistema Nervoso Periférico (SNP), contendo os nervos periféricos, gânglios e terminações nervosas (TORTORA & GRABOWSKI, 2002).

O estudo da organização interna dos nervos periféricos ganhou interesse adicional no início do século XX, em virtude das patologias traumáticas durante a primeira e segunda Guerra Mundial (PRODANOV *et al.*, 2007). O nervo é composto de tecidos derivados de células do ectoderma e mesoderma (FIELDS *et al.*, 1989)

As fibras nervosas periféricas estão presentes em todos os tecidos e órgãos do corpo. A fibra nervosa é definida como condutora ou como unidade funcional da célula nervosa. O neurônio, ou célula neuronal, consiste em um corpo celular que realiza atividade metabólica intensa e de prolongamentos, dentre os quais o axônio, que irá se conectar aos tecidos periféricos.

O SNP contém componentes somáticos e autonômicos, sendo que o primeiro é responsável pela inervação dos músculos esqueléticos e regiões sensitivas da pele, enquanto o segundo irá inervar a musculatura lisa (**FIGURA 1**). Os corpos celulares dos neurônios motores estão contidos no corno anterior da substância cinzenta da medula, enquanto que os neurônios sensoriais estão localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) (NETTER *et al.*, 2002; SMIT, 2006).

Os neurônios sensoriais primários são pseudobipolares e têm apenas um axônio que se conecta ao corpo celular. No entanto, os axônios se ramificam em dois, logo após o início de sua extensão a partir do corpo celular: as projeções

periféricas inervam órgãos sensoriais nos tecidos periféricos, bem como as fibras musculares formando o fuso muscular. Além disso, projeções centrais conectam a medula espinhal, podendo levar a informação sensorial até o encéfalo. (CHEN *et al.*, 2007).

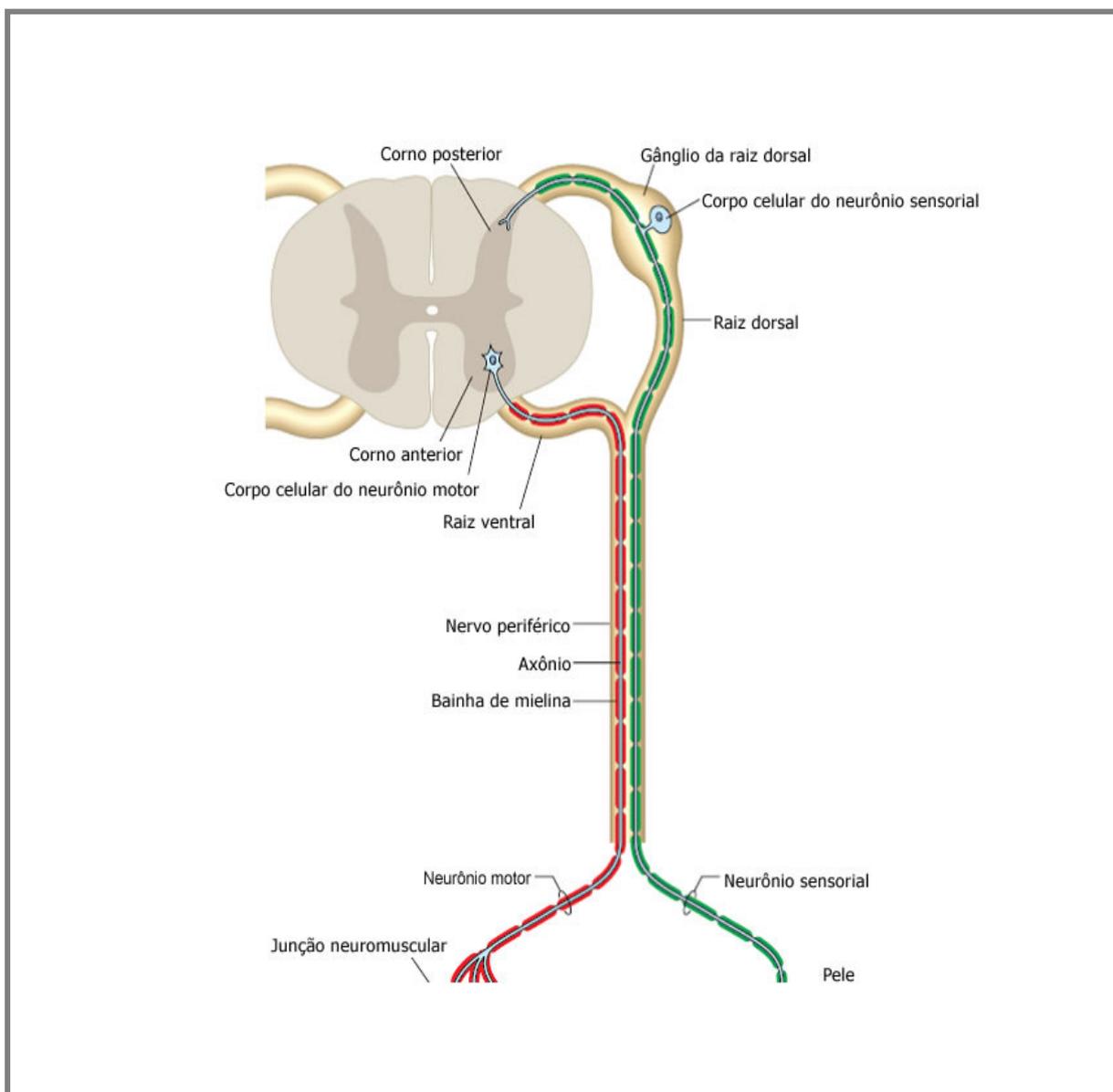


Figura 1. Esquema ilustrando os componentes do Sistema Nervoso Periférico. (Adaptado de: Netter *et al.*, 2002. Atlas of Neuroanatomy and Neurophysiology).

Nos nervos periféricos, as células de Schwann (SCs) representam as células gliais que, além de envolverem os axônios, lhes conferem suporte trófico através da

produção de fatores neurotróficos (PFISTER *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007). Tanto as fibras mielinizadas quanto as não-mielinizadas do SNP são circundadas pelas SCs, que, por sua vez, são cobertas na superfície externa pela lâmina basal. As SCs formam a bainha de mielina internodal nos axônios mielinizados, e a região compreendida entre duas SCs envolvendo um axônio é denominada nodo de Ranvier. Os nodos de Ranvier contêm os canais iônicos que permitem o fluxo de íons e conseqüente geração de potenciais que conduzem o impulso elétrico de forma saltatória. Dessa forma, as SCs são alinhadas descontinuamente ao longo do axônio, separadas pelos nodos de Ranvier, tanto na porção proximal quanto distal do internodo. A lâmina basal, no entanto, é contínua entre as SCs adjacentes, inclusive nos nodos. Em contraste, as fibras não mielinizadas possuem as SCs contínuas, sem fendas ou nodos entre elas. Todas as fibras dos nervos periféricos, portanto, possuem em volta de si um tubo de lâmina basal contínua (THANOS *et al.*, 1998).

Cada fibra nervosa é circundada individualmente pelo endoneuro, que consiste em tecido conjuntivo ao redor de cada unidade individual - célula de Schwann-axônio e a bainha de mielina (CHEN *et al.*, 2007). Os fascículos são formados por grupos de fibras que são circundadas por sua vez pelo perineuro, composto por fibroblastos e colágeno. A camada mais externa do nervo que envolve os fascículos é o tecido fibrocolagenoso denominado epineuro (**Figura 2 e Figura 3**).

A irrigação para os nervos periféricos geralmente se faz através do mesoneuro ou da suspensão do mesentério. O *vasa nervorum* é um sistema longitudinal de vasos dentro do nervo que permite a circulação. (TOWNSEND, 1994).

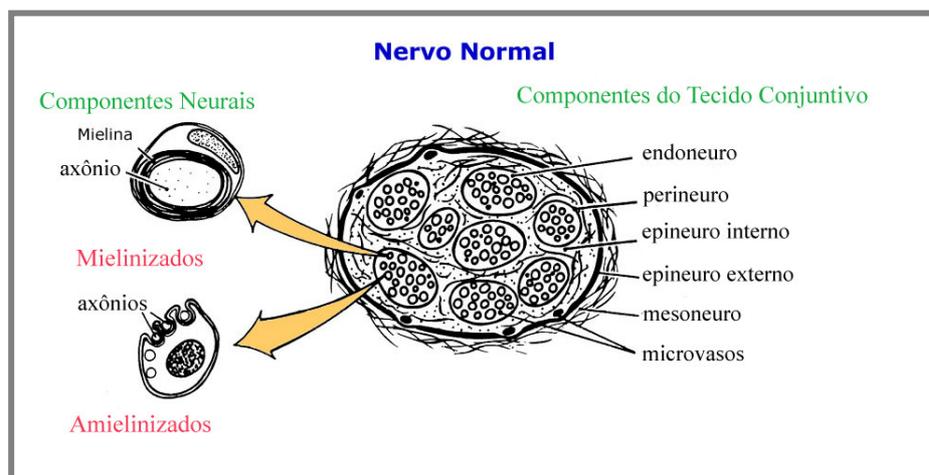


FIGURA 2. Composição esquemática do nervo periférico. (Adaptado de: MacKinnon & Dellon: Surgery of the Peripheral Nerve. New York: Thieme Medical Publishers, Inc, *in* SMIT, 2006).

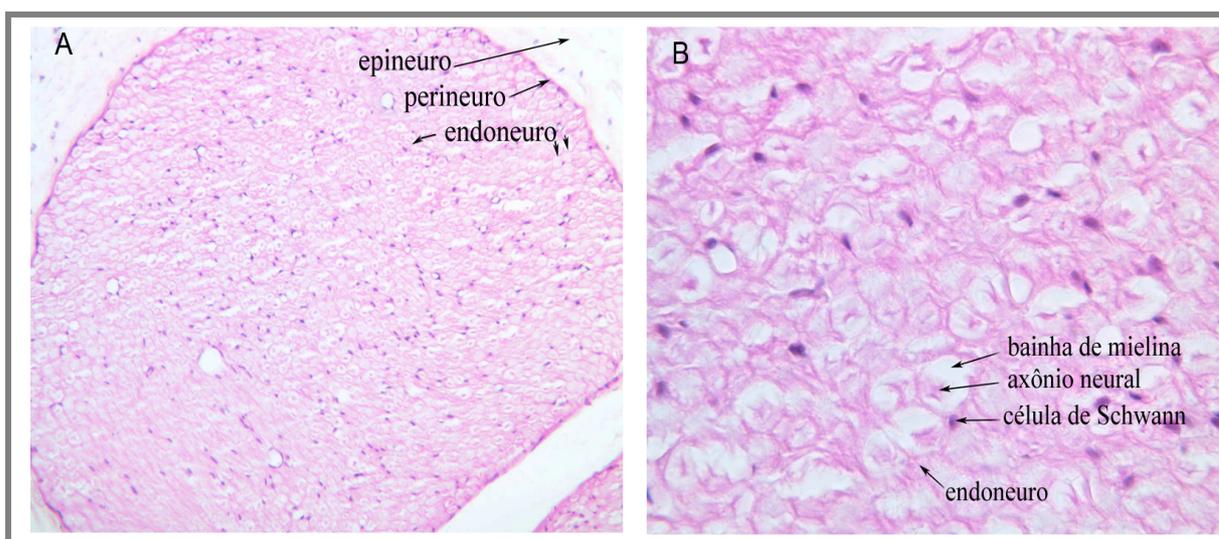


FIGURA 3. Fascículo do nervo ciático em corte transversal, com coloração HE (hematoxilina-eosina), evidenciando as camadas do nervo e a bainha de mielina (setas). (A) aumento de 10X e (B) aumento de 40X. (Adaptado de: <http://www.medicalhistology.us/twiki/bin/view/Main/NervousTissueAtlas04>)

1.1.2 Nervo Ciático

O nervo ciático é um nervo misto, composto por fibras motoras, sensitivas e autonômicas. É a continuação do fascículo superior do plexo sacral, formado pelas raízes ventrais de L4-S3, sendo o maior do corpo humano em diâmetro. Emerge da pelve através do forame isquiático maior, e cursa abaixo ou entre o músculo

piriforme, descendendo entre o trocânter maior do fêmur e a tuberosidade isquiática. Ao longo da face posterior da coxa, o nervo ciático localiza-se anterior aos músculos bíceps femoral e semi-tendinoso, até seu terço inferior, onde se divide em dois ramos denominados nervos tibial e fibular comum (FONSECA *et al.*, 2002) (Figura 4).

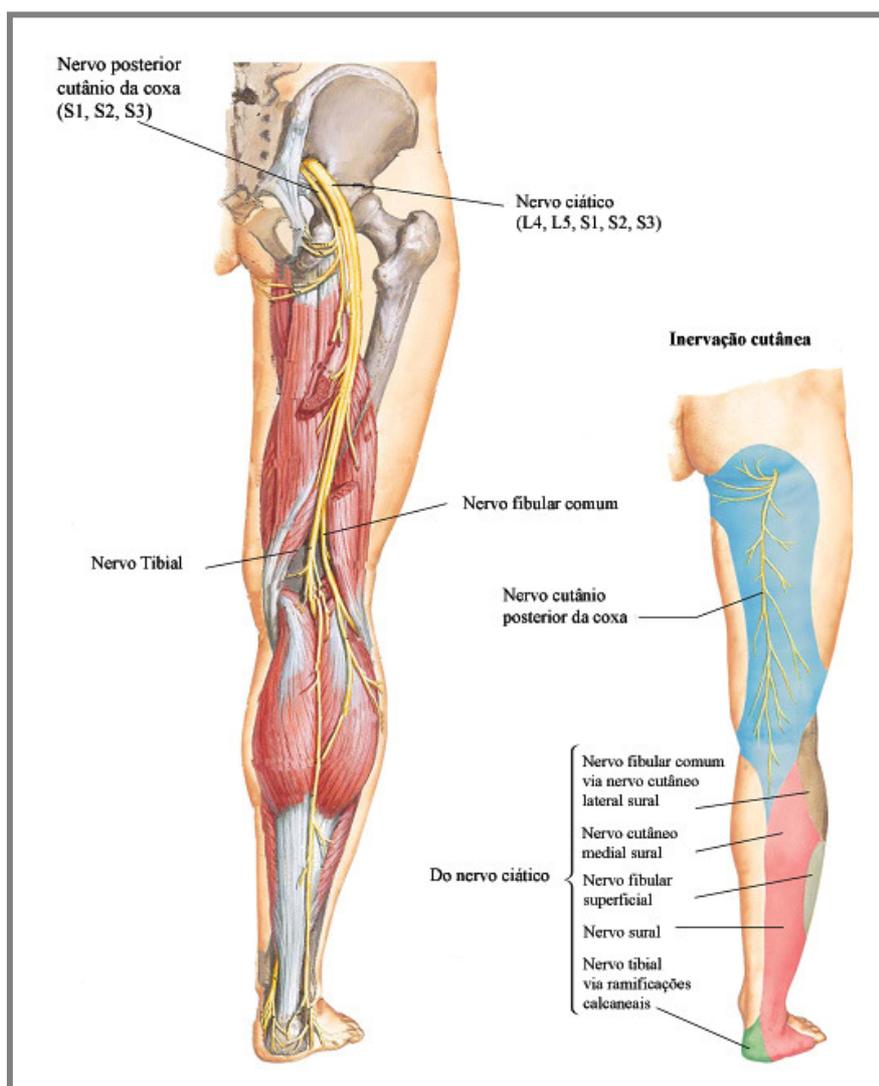


FIGURA 4. Inervação do nervo ciático. Desenho ilustrativo mostrando a inervação do nervo ciático. Adaptado de: Netter *et al.*, 2002. Atlas of Neuroanatomy and Neurophysiology.

Os nervos tibial e fibular comum representam duas divisões no interior do nervo ciático que estão manifestadas na origem do nervo, em estágios precoces do

desenvolvimento embrionário. Estes segmentos conservam sua identidade em toda a sua extensão, embora reunidas em um nervo comum por uma bainha de tecido conjuntivo. Mandiola *et al.* (1986) estudaram fetos humanos a termo e evidenciaram que o nervo ciático se constitui como tronco único, no plexo, em 48% dos casos, porém na porcentagem restante observou-se a existência individualizada dos nervos tibial e fibular comum no plexo sacral. Em 2007, Vicente *et al.* estudaram a relação anatômica da região glútea em cadáveres adultos. Pôde-se observar que as porções fibular comum e tibial mantiveram-se desunidas desde esta região superior, em duas espécimes (**Figura 5**) e, assim, continuaram em seu trajeto descendente.

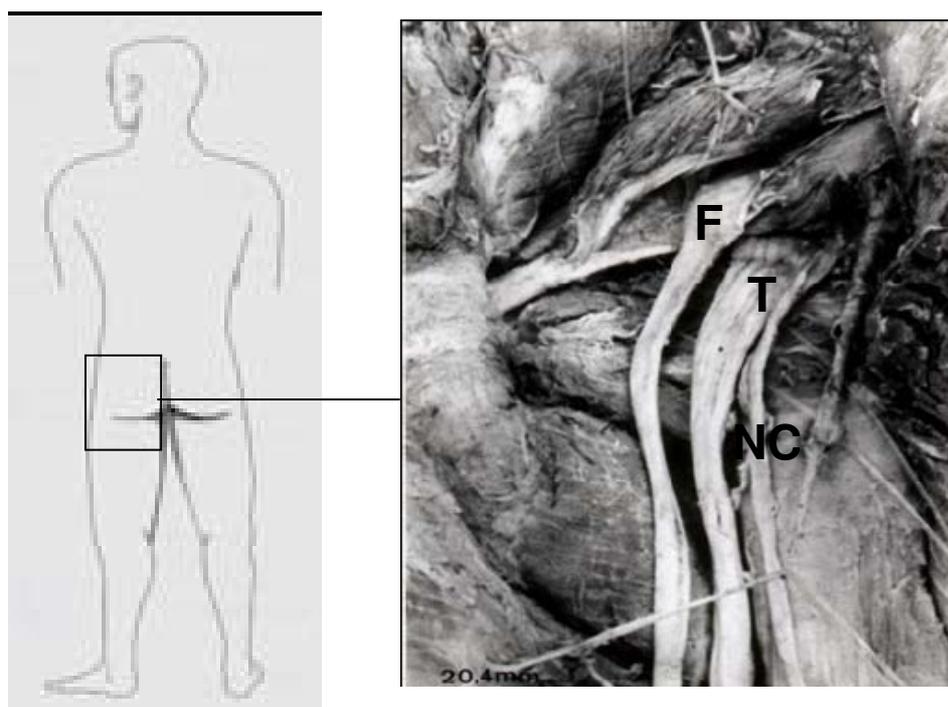


FIGURA 5. Relação anatômica da divisão do nervo ciático na região glútea, evidenciando o F = nervo fibular, o T = nervo tibial e o NC = nervo cutâneo posterior da coxa. (Adaptado de: Vicente *et al.*, 2007).

Como em humanos, o nervo ciático em ratos origina-se no plexo sacral e também bifurca-se em dois principais ramos: tibial e fibular. No estudo de Asato e colaboradores (2000), evidenciou-se que o nervo ciático de ratos (Sprague-Dawley)

é formado pelas raízes de L3 a L6, tendo as raízes de L4 e L5 maior contribuição para sua formação (**Figura 6**). Essas raízes inervam vários músculos envolvidos na flexão e extensão do joelho e tornozelo, assim como inervam a pele da região lateral da panturrilha e quinto dedo (IJKEMA-PAASEN, 2005).

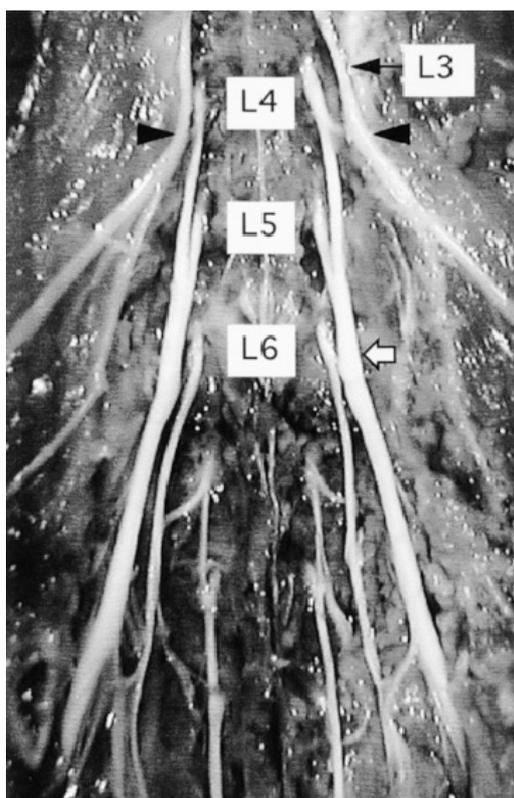


Figura 6. Vista frontal do nervo ciático, com o osso pélvico parcialmente removido. As raízes dos nervos espinais de L4 e L5 se uniram e formaram o nervo ciático. O nervo espinal de L6 envia uma fina ramificação nervosa para o nervo ciático (seta branca). As setas pretas indicam a pequena conexão entre as raízes nervosas L3 e L4. (FONTE: ASATO *et al.*, 2000).

A lesão completa do nervo ciático gera prejuízo no padrão da marcha, mas não a impede (HAGIWARA *et al.*, 2003). A inervação do ciático atinge os músculos bíceps femoral; semi-tendinoso; semi-membranoso; tibial anterior; flexor e extensor longo do hálux e dedos; fibular anterior; flexor e extensor curto dos dedos; fibular longo e curto; plantar; gastrocnêmio; poplíteo; sóleo; tibial posterior; abductor do hálux; lumbricais; abductor; flexor e oponente do dedo mínimo; quadrado plantar; e interósseos plantares e dorsais, acometendo dessa forma os movimentos de flexão do joelho e todos os movimentos do tornozelo e pé. No entanto, uma série de músculos importantes na deambulação mantêm-se preservados, como por exemplo,

os extensores de joelho e quadril, adutores, abdutores e rotadores de quadril, que são inervados principalmente pelos nervos femoral e obturador (KENDALL *et al.*, 1995).

De acordo com o estudo de caso clínico realizado por Hagiwara *et al.* (2003), a força muscular de uma pessoa que sofreu lesão completa do nervo ciático pode ser grau dois (há movimento, mas não vence a gravidade), para os flexores de joelho; grau 5 (força muscular normal), para os extensores de joelho; e grau 0 (plegia ou ausência de tônus muscular), para os flexores e extensores do tornozelo e dedos.

Como em situações clínicas os nervos mistos são freqüentemente afetados, a lesão experimental do nervo ciático constitui-se em um modelo favorável para o estudo da regeneração (IJKEMA-PAASEN, 2004). A escolha de camundongos como modelo animal para pesquisa em regeneração nervosa periférica tem sido freqüente. Isso se deve à similaridade do processo biológico regenerativo com o que ocorre em humanos, e também à facilidade na manipulação (BAPTISTA AF *et al.*, 2007).

1.2 Lesão nervosa periférica

O trauma de nervos periféricos é relativamente comum. Um grande número de lesões acomete as extremidades do corpo devido, principalmente, a acidentes de trabalho, esportivos e de trânsito, a traumas penetrantes e a lesões no nascimento, decorrentes de tração nervosa excessiva (IJKEMA-PAASSEN *et al.*, 2004). Também são freqüentes situações clínicas onde o crescimento de tumores pode levar ao esmagamento de nervos periféricos.

Lesões na região glútea são freqüentemente causadas por injeções, e lesões na região do quadril possuem quatro causas principais: perfuração por arma de fogo, fratura do fêmur, laceração ou contusão (KLINE *et al.*, 1998).

1.2.1 Classificação e quadro clínico

A classificação de trauma do nervo baseia-se no dano sofrido pelos componentes nervosos, na funcionalidade nervosa e na capacidade de recuperação espontânea (GRANT, 1999; GREENFIELD, 1997; RISTIC, 2000). Seddon (1943) publicou sua classificação de lesões nervosas, e Sunderland (1951) expandiu este sistema de graduação (RISTIC, 2000).

As lesões são classificadas em três graus de acordo com Seddon. O grau mais leve, ou primeiro grau de lesão, é denominado *neuropraxia*. A estrutura do nervo permanece intacta, porém a condução axonal está interrompida. Há uma perda temporária da função motora do nervo, com disfunção da propriocepção e dos estímulos vibratórios, do tato, da dor e da sudorese. Não há degeneração Walleriana.

No segundo grau de lesão, a *axonotmese*, ocorre a interrupção do axônio, mas as bainhas conjuntivas permanecem intactas. Surge a degeneração Walleriana, causando paralisia motora, sensitiva e autonômica. Porém a regeneração e recuperação funcional geralmente ocorrem com tempo variável, de acordo com o nível da lesão. A regeneração axonal, nesse caso, é facilitada pela preservação da continuidade entre a bainha endoneural e a lâmina basal da célula de Schwann.

A *neurotmese* é a complicação mais grave, sendo caracterizada por perda total da continuidade do nervo, com lesão de todas as suas estruturas. Como não há integridade do epineuro, a reparação é sempre cirúrgica. Em decorrência disso, a regeneração e reinervação nunca é completa e, geralmente, os pacientes evoluem com deficiência residual quanto às funções motora e sensitiva (SEDDON, 1943 *apud* BURNETT *et al.*, 2004).

A extensão e o grau de lesão, bem como a resposta celular à lesão nervosa, definem o prognóstico do reparo nervoso e, conseqüentemente, da recuperação da função motora.

1.2.2 Fisiopatologia

Em contraste com o Sistema Nervoso Central (SNC), que usualmente não se regenera, as fibras nervosas periféricas são capazes de se regenerar espontaneamente após lesão. Isso se deve, principalmente, a um ambiente permissivo e à capacidade plástica intrínseca dos neurônios periféricos. A regeneração requer um novo crescimento e remielinização dos axônios, havendo uma recuperação variável e muitas vezes incompleta da função perdida (BRECKNELL & FAWCETT, 1996; THANOS *et al.*, 1998; PREVITALI, 2001, CHEN *et al.*, 2007).

1.2.2.1 Degeneração e regeneração do Sistema Nervoso Periférico

A axotomia, ou secção do axônio, modifica plenamente o funcionamento dos neurônios sensitivos, motores e autonômicos, logo suas funções são interrompidas e um programa celular de crescimento axonal é ativado. A restauração das funções sensoriais e motoras é um processo complexo, e baseia-se principalmente em alterações morfológicas e bioquímicas, devido à perda de função (SNIDER *et al.*, 2002; LUNDBORG & ROSÉN, 2007).

Os sinais moleculares e fisiológicos exatos que atuam como sensores da lesão axonal e iniciam o processo regenerativo têm sido alvo freqüente de discussões. Três grandes mudanças ocorrem após lesão de axônios periféricos. Primeiramente, a lesão axonal interfere no fluxo retrógrado de sinais provenientes da

região inervada. Secundariamente, a extremidade do axônio lesionado entra em contato com a matriz extracelular, que é rica em moléculas secretadas pelas populações celulares vizinhas. Em seguida, esses axônios são expostos ao ambiente extracelular no qual o processo inflamatório foi desencadeado. E, por último, isso leva a um influxo alterado de íons como o cálcio e o sódio, resultando em despolarização e uma seqüência de potenciais de ação induzidos pela lesão (MAKWANA & RAIVICH, 2005).

Logo após uma secção de um nervo periférico, o axônio será separado em duas porções, sendo um segmento proximal (coto proximal), que continuará em contato com o corpo celular, e um segmento distal (coto distal), que perde o contato com o corpo celular. A interrupção do nervo periférico causa degeneração do segmento distal, que é conhecida como degeneração Walleriana (WD), em honra a Augustus Waller (BRECKNELL & FAWCETT, 1996; SNIDER *et al.*, 2002).

Na sua importante contribuição para a Sociedade Royal de Londres em 1850, Augustus Waller descreveu a desintegração dos nervos hipoglosso e glossofaríngeo do sapo após axotomia. Ele observou que os axônios tornavam-se desorganizados e as alterações dos tubos neurais, após o quinto e sexto dia da lesão, ficavam mais evidenciadas por algum tipo de desintegração da mielina em partículas separadas de vários tamanhos. No décimo dia após a lesão, Waller descreveu massas fusiformes em intervalos, provavelmente referindo-se à mielina em degeneração, e verificou que a substância branca de Schwann não era vista. Ainda, que após doze a quinze dias, muitos tubos neurais não eram visíveis, por terem sido removidos pela absorção tecidual. A descrição é hoje reconhecida e aplicada a todas as lesões neurais que atingem a integridade do axoplasma. Esse processo pode ser causado

por lesões axonais inflamatórias, auto-imunes, isquêmicas ou traumáticas, como esmagamento ou secção (STOLL *et al.*, 2002).

Meio século depois, Ramon y Cajal confirmou as observações básicas de Waller e fez uma descrição histológica detalhada da degeneração axonal. Com base nas descrições de Waller e Ramon y Cajal e nos estudos ultra-estruturais e moleculares mais recentes, o termo degeneração Walleriana (WD) refere-se a uma seqüência de eventos no coto distal do nervo axotomizado. Inicia-se com a desintegração e degeneração do axoplasma e axolema, que se completa em 24h nas fibras nervosas finas, e em 48h nas fibras nervosas grossas (STOLL *et al.*, 2002). Essa desintegração do citoesqueleto ocorre quando várias proteínas, incluindo os neurofilamentos, sofrem proteólise e são convertidos em material amorfo e granuloso. O colapso axonal é mediado pelo influxo de cálcio via ativação das calpaínas. Estas, presentes no SN e ativadas pelo cálcio, parecem ser responsáveis pela clivagem de proteínas essenciais do citoesqueleto axonal (MARTINEZ & RIBEIRO, 1998; STOLL *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2003). Utilizando-se um inibidor da calpaína, pôde-se demonstrar seu papel neuroprotetor numa degeneração axonal, produzida pela lesão por esmagamento do nervo óptico. (COUTO *et al.*, 2004).

Em resposta à perda axonal, as células de Schwann desdiferenciam, diminuem a síntese de mielina, seqüestram pequenas partículas de debris de mielina e fragmentam sua própria bainha de mielina em corpos ovóides. Após essa fragmentação, as SCs sem contato transitório com o axônio proliferam e se alinham no interior do tubo constituído pela lâmina basal, originando uma coluna de células denominadas bandas de Büngner (**Figura 7**).

A superfície da célula de Schwann é envolta pela lâmina basal, que consiste numa matriz extracelular especializada, e confere um isolamento dos tecidos circunjacentes. Sendo assim, a banda ou coluna formada pelas SCs representa um substrato morfológico permissivo para a regeneração do SNP, com a função principal de guiar as fibras nervosas em direção ao tecido alvo. Um grande número de genes é regulado durante estágios distintos da WD. Esses genes levam a expressão de proteínas, tais como fatores neurotróficos, citocinas e moléculas de adesão. Essas moléculas são expressas de maneira coordenada (THANOS *et al.*, 1998; STOLL *et al.*, 2002; VOGELAAR *et al.*, 2003; GLASS, 2004; KOEPPEN, 2004).

Lubinska em 1977, *apud* Koeppen, 2004, estimou a velocidade da degeneração Walleriana, através de um estudo com fibras lesadas de nervos frênicos seccionados. Dependendo da espessura da fibra, ela calculou 45.6 mm por dia para as fibras mais espessas, e 252 mm por dia para as fibras mais finas. Nessa pesquisa foi demonstrado que em 48h o nervo havia sido completamente degenerado. A degeneração do axônio está diretamente relacionada com a perda da capacidade de gerar e conduzir um potencial de ação (GRIFFIN & HOFFMAN, 1993).

Paralelamente, no coto proximal ocorre o processo de cromatólise, havendo desintegração da substância de Nissl e dispersão dos ribossomas. O neurônio torna-se mais claro e seu citoplasma é preenchido por vacúolos. O núcleo aumenta de volume, indicando resposta anabólica, aumento de transcrição com conseqüente aumento na síntese de proteínas, e desloca-se para a periferia do corpo celular. Os axônios se retraem e diminuem o seu calibre (FAWCETT & KEYNES, 1990; STOLL & MÜLLER, 1999; VOGELAAR *et al.*, 2003) (**Figura 7**).

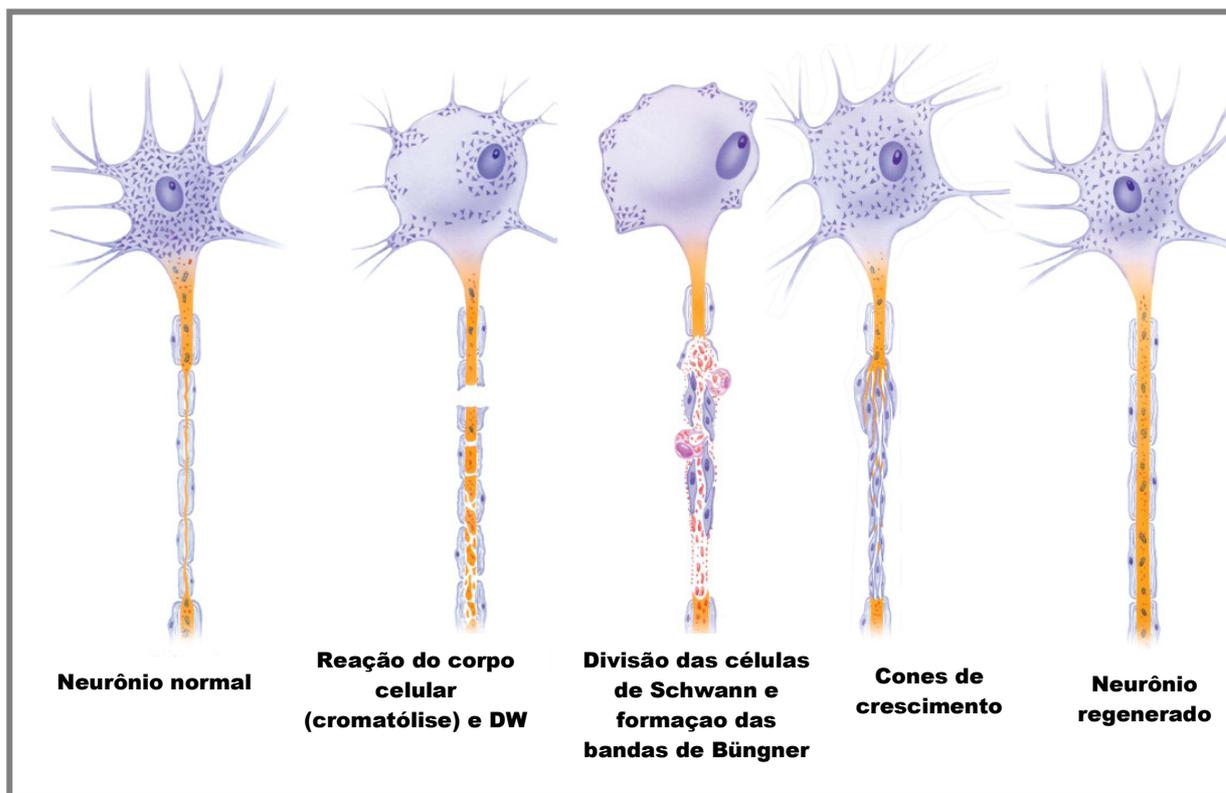


Figura 7. Processo de degeneração e regeneração de uma fibra nervosa após uma lesão. A ilustração demonstra o processo de cromatólise, a divisão das células de Schwann, a formação das Bandas Büngner e a progressão do cone de crescimento do axônio. (Adaptado de MATTAR J & AZZE ,).

Vários tipos celulares são recrutados para o local da lesão. Dentre eles, os macrófagos, por volta de dois a três dias após a lesão, migram para o segmento distal, sendo orientados por sinais químicos liberados pelo axônio degenerado. Uma vez recrutados, os macrófagos desempenham um importante papel no processo degenerativo, e atuam como a principal via da fagocitose e remoção de restos do nervo degenerado, parecendo coordenar o processo da WD. Os macrófagos também secretam fatores mitogênicos para as SCs, incluindo fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante tipo β (TGF- β) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Ocorre ainda a liberação de interleucina-1, que ativa o aumento da transcrição dos genes que levam ao aumento da

expressão do fator de crescimento do nervo (NGF) nas SCs (BRECKNELL & FAWCETT, 1996, LUNDBORG & ROSÉN, 2007).

Enquanto o coto distal sofre a degeneração, o coto proximal inicia a regeneração. A interrupção do fluxo retrógrado de sinais produzida pela lesão, associada ao influxo de cálcio e à exposição do axônio lesado ao ambiente inflamatório e degenerativo parece ativar de maneira sinérgica a regeneração no coto proximal (MAKWANA & RAIVICH, 2005). Em poucas horas após a lesão, o coto proximal do nervo forma uma intumescência, em função do aumento da proliferação celular e do acúmulo de organelas citoplasmáticas. A partir do último nodo de Ranvier, partem então os cones de crescimento. Essas estruturas são, por definição, a unidade químico-sensoria que orienta o axônio, para que cresça seguindo as pistas químicas corretas. Esse crescimento durante a regeneração do nervo ocorre na direção do coto distal, na estreita faixa delimitada pela lâmina basal das SCs de um lado, e a membrana das SCs, do outro. Dessa maneira, os axônios danificados crescem em direção ao seu tecido-alvo.

Nos casos em que há secção do nervo na lesão, o axônio deve deixar o endoneuro do coto proximal e crescer para o coto distal. Os axônios em regeneração, sob certas circunstâncias, alcançam o segmento distal apenas se a fenda for cirurgicamente reduzida até 35 mm. Assim, existe uma distância máxima para que as células viáveis do coto distal de um nervo seccionado possam exercer atividade neurotrófica e efeito quimiotático capazes de promover a regeneração dos axônios (BRECKNELL & FAWCETT, 1996, THANOS *et al.*, 1998).

A capacidade de crescimento intrínseca do neurônio periférico é ativada após a lesão axonal (**Figura 8**), ocorrendo aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) intracelular. Esta, por sua vez, ativa a proteína cinase A (PKA) que,

mediante inativação da proteína Rho, promove a reorganização do citoesqueleto, processo crucial para o crescimento axonal. A PKA também ativa a expressão de genes através da proteína CREB, resultando no aumento da expressão de fatores de transcrição relacionados à regeneração, tal como a Arginase I. Assim, participa da síntese de poliaminas, que podem regular diretamente a organização do citoesqueleto, e induzir a expressão genética necessária à regeneração. Os níveis elevados de cAMP também aumentam a interleucina 6 (IL-6), a qual, através do sinal transdutor e ativador da transcrição 3 (STAT3), ativa genes relacionados à regeneração, como GAP-43. A deleção do STAT3 aumenta a morte celular após lesão, sendo, portanto, considerado um fator de promoção na sobrevivência intracelular (MAKWANA & RAIVICH, 2005; CHEN *et al.*, 2007).

Os efeitos dos fatores de transcrição sobre a regeneração nervosa são bem caracterizados, como no caso da c-jun. Um estudo usando o modelo de axotomia do nervo facial mostrou que a deleção de c-jun interfere na expressão de genes e proteínas relacionadas à regeneração, além de reduzir de forma significativa a velocidade de reinervação do alvo e a recuperação funcional. Ocorre ainda, o bloqueio da fase de brotamento a partir do coto proximal. Ainda, c-jun é ativada nas lesões periféricas, aumentando os níveis de integrina $\alpha 7\beta 1$, CD44 e galanina, moléculas estas, envolvidas no processo regeneração (RAIVICH *et al.*, 2004; MAKWANA & RAIVICH, 2005; CHEN *et al.*, 2007).

Observa-se ainda que as SCs desempenham papel central na regeneração nervosa. Essas células sintetizam moléculas de adesão da família das imunoglobulinas na superfície celular (CAMs) e caderinas, e formam a base das membranas para o suporte e guia dos brotamentos axonais. Além disso, durante esse processo, essas células diminuem a expressão de proteínas inibitórias ao

crescimento axonal presentes na mielina, tais como a proteína básica da mielina (MBP), glicoproteína associada à mielina (MAG), proteína zero (P0) e proteína periférica da mielina-22 (PMP22). Dessa forma, as SCs alteram o seu fenótipo, e secretam fatores de crescimento como o NGF, fator de crescimento neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), fator neurotrófico ciliar (CNTF) e fator neurotrófico derivado de glia (GDNF), que asseguram a sobrevivência e regeneração dos neurônios (THANOS *et al.*, 1998; STOLL & MÜLLER, 1999; PFISTER *et al.*, 2007).

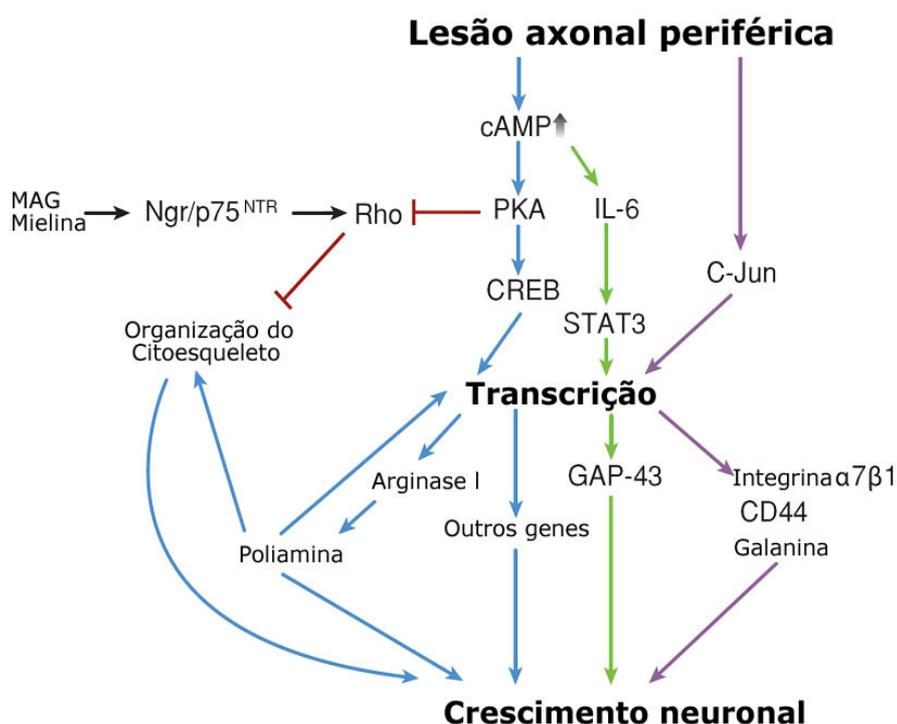


Figura 8. Esquema representando a ativação da capacidade de crescimento intrínseca pela lesão nervosa periférica. (Adaptado de: CHEN *et al.*, 2007).

A ativação da capacidade intrínseca de crescimento, portanto, permite que os neurônios sobreponham os efeitos inibitórios de moléculas associadas à mielina no axônio em regeneração, aumentando o seu potencial regenerativo. Porém, o

sucesso da regeneração depende de um ambiente permissivo e de pistas para guiar os axônios, levando-os para alvos corretos. Este último aspecto, depende de moléculas da matriz extracelular (MEC) e das moléculas de superfície celular expressas pelas populações celulares presentes no nervo periférico (CHEN *et al.*, 2007).

A laminina, uma proteína da MEC, é expressa em grande quantidade, tanto nos nervos lesados como nos nervos íntegros. Ela desempenha um papel importante no crescimento do neurito *in vitro*, por fornecer um substrato adequado para adesão, migração e extensão de projeções sobre uma lamínula. Entre as várias isoformas de lamininas conhecidas, a laminina 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$) e a laminina 8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$) são expressas no endoneuro de nervos periféricos (PATTON *et al.*, 1997). Após lesão periférica, há aumento da expressão destas lamininas e seus receptores, incluindo as integrinas e a distroglicana (MAKWANA & RAIVICH, 2005; CHEN *et al.*, 2007).

Agius e Cochard (1998) demonstraram que utilizando um anticorpo neutralizante específico contra a cadeia da laminina- $\alpha 2$, houve redução do crescimento axonal de nervos ciáticos seccionados. Em 2003, Chen & Strickland, em modelos de esmagamento do nervo ciático, observando SCs, verificaram que após a deleção o gene responsável pela expressão da cadeia $\gamma 1$ da laminina, houve um comprometimento severo da regeneração. As lamininas, dessa forma, podem promover extensão axonal diretamente, servindo como substrato da regeneração e/ou indiretamente.

A síntese da laminina pelas SCs é também essencial para remielinização. Na ausência de laminina, as SCs podem migrar ao longo dos axônios, espalhar-se no

nervo periférico, e proliferar normalmente, mas não podem se diferenciar em um fenótipo mielinizante (CHEN & STRICKLAND, 2003; CHEN *et al.*, 2007).

A laminina e outras proteínas da MEC podem ainda ter função como guias no crescimento axonal. A laminina se liga aos receptores integrinas no cone de crescimento, e ativa a cinase fosfatidil-inositol-3 (PI3K), resultando em acúmulo de AKT ativo nos locais de contato axônio/laminina. AKT ativo, então, fosforila e inibe a atividade da glicogênio sintase quinase 3 β (GSK-3 β), e ativa proteínas ligadas ao citoesqueleto, responsáveis pelo crescimento axonal (**Figura 9**) (MAKWANA & RAIVICH, 2005; CHEN *et al.*, 2007).

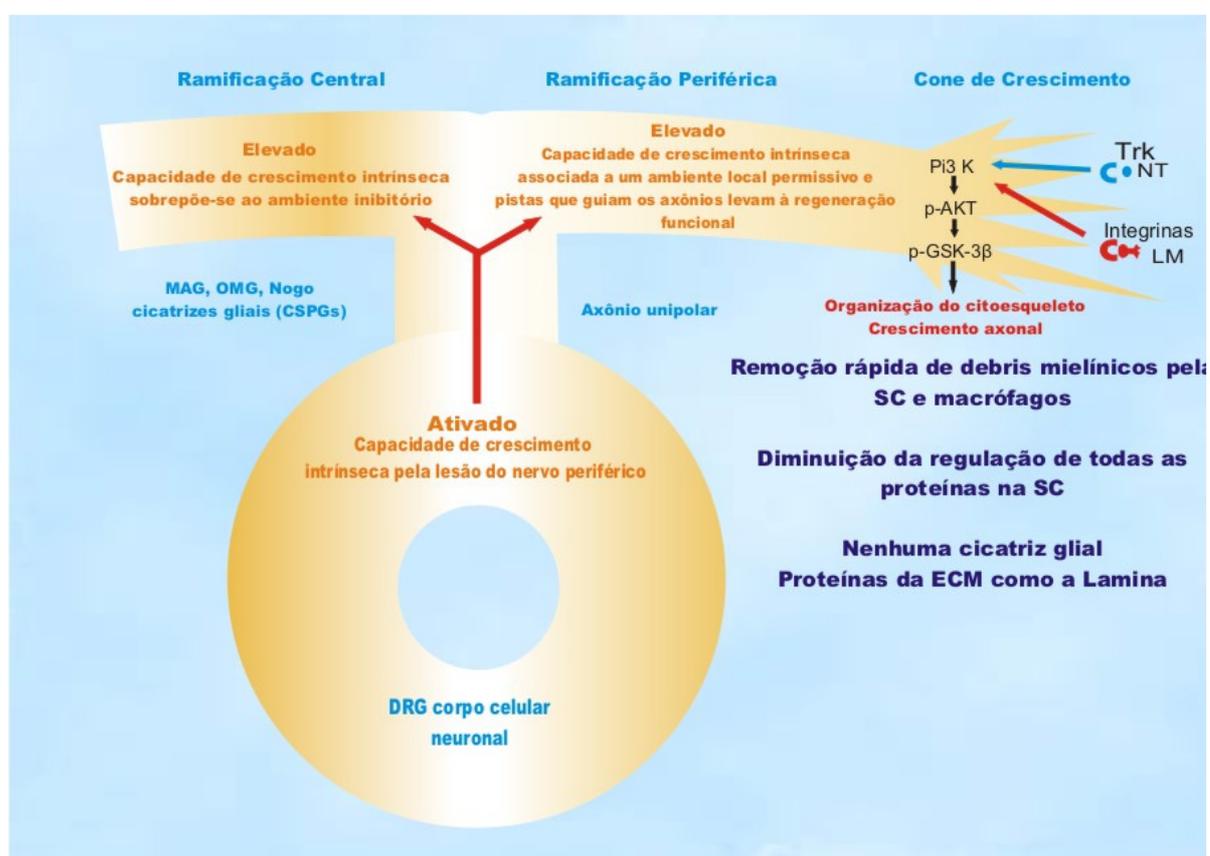


Figura 9. Esquema mostrando os eventos do processo de regeneração axonal periférica. (Adaptado de: CHEN *et al.*, 2007).

A regeneração nervosa requer uma integração complexa entre as células, matriz extracelular, fatores de crescimento e citocinas. A presença local de fatores de crescimento desempenha um importante papel no controle da sobrevivência,

migração, proliferação e diferenciação de vários tipos de células envolvidas neste processo (PFISTER *et al.*, 2007).

1.2.3 Estratégias de tratamento da lesão nervosa periférica

Sabe-se que, após a transecção, um grande número de neurônios morre por apoptose, podendo haver uma perda em torno de 20-50% de neurônios no DGR (LISS *et al.*, 1996). Muitos fatores podem influenciar a perda neuronal no DGR e a qualidade da regeneração, tais como: idade – crianças com menos de dez anos alcançam resultados funcionais superiores aos de adultos (LUNDBORG & ROSÉN, 2001); tempo da lesão ao reparo – o reparo imediato pode reduzir a morte celular pós-traumática (MA *et al.*, 2003); tipo de nervo lesionado – nervos puramente motores ou sensitivos têm menores riscos de mau alinhamento entre axônios motores e sensoriais, otimizando a re-inervação (MADISON *et al.*, 2007); nível da lesão – o crescimento nervoso em humanos tem sido sugerido numa taxa de 1-2 mm/dia (BUCHTHAL & KÜHL, 1979 *apud* LUNDBORG & ROSÉN, 2007), evidenciando que, quanto mais distante for a lesão do órgão efector, maior tempo de regeneração será requerido, finalmente o tipo de lesão – a lesão por esmagamento apresenta melhor resultado funcional do que a lesão por transecção (LUNDBORG & ROSÉN, 2007).

A necessidade de se desenvolver técnicas mais eficazes para reparação de nervos que sofreram transecção é reconhecida há vários anos. Muitos esforços têm sido realizados para induzir a regeneração nervosa no local da lesão do nervo, incluindo desde procedimentos cirúrgicos à utilização de biomateriais, terapias celulares e reabilitação. A associação de estratégias de tratamento parece ser a

alternativa mais viável para prover melhor qualidade ao nervo regenerado e, conseqüente, melhora da recuperação funcional.

1.2.3.1 Reparo cirúrgico

O tipo de reparo a ser realizado está relacionado com o tamanho do intervalo entre os cotos proximal e distal. Em pequenas lesões, é possível aproximar e suturar as duas extremidades através da colocação de suturas na camada mais externa do nervo (epineuro) (**Figura 10**) ou nas camadas mais profundas do perineuro, para adaptar os fascículos separadamente. Também é possível a sutura de fascículos separados individualmente, no entanto não se pode unir os tubos das SCs ou axônios individualmente (LUNDBORG, 2004).

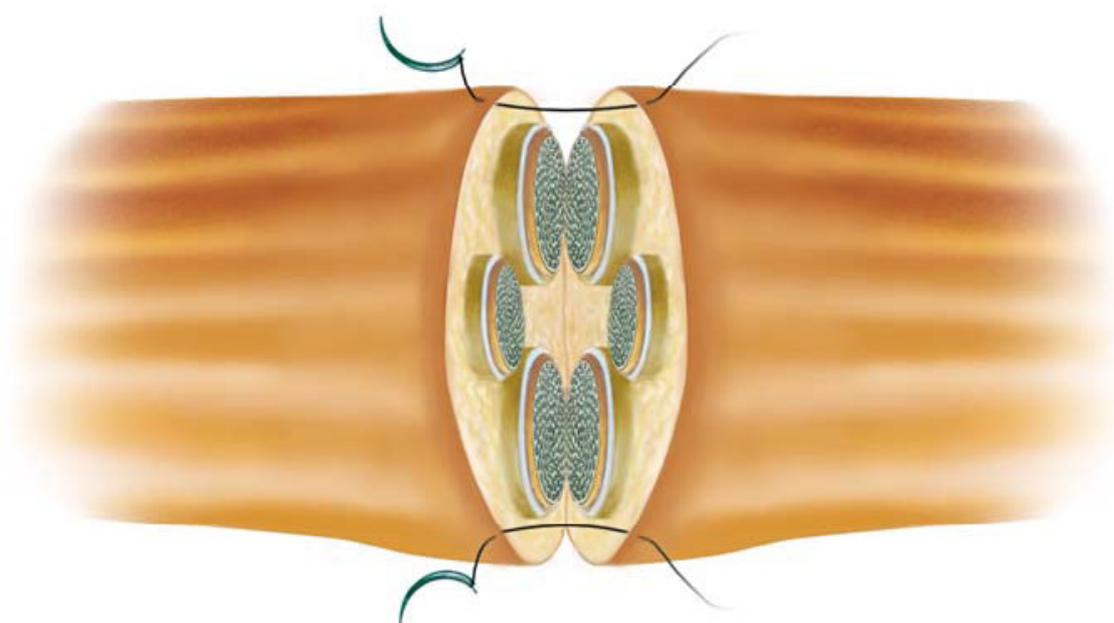


Figura 10. Esquema da sutura epineural externa. (Adaptado de: TORRES *et al*, 2003).

No caso de perda importante do tecido neural (acima de 20 mm), tem sido uma rotina freqüente a utilização de enxertos, utilizando-se mais comumente nervos sensoriais obtidos do próprio paciente, denominados enxertos autólogos. No entanto, esse procedimento apresenta considerável morbidade, perda da função do

local doador e formação potencial de neuroma doloroso na área doadora, além de freqüentes falhas nos resultados funcionais (SCHMIDT & LEACH, 2003).

1.2.3.2 Tubulização

De acordo com Fu & Gordon (2007), nos casos onde existe perda consistente de tecido nervoso – maior que 3 cm em humanos e entre 2 a 3 cm em ratos –, uma alternativa interessante para unir os cotos nervosos é a inserção de um condute. Este condute é definido como uma estrutura tubular projetada para preencher a fenda (“*gap*”) de um nervo seccionado.

A tubulização, portanto, é a introdução das extremidades proximais e distais de um nervo seccionado nessa estrutura tubular. Esse procedimento tem como vantagens proteger o nervo do tecido circunvizinho ou formação cicatricial; guiar a regeneração axonal para o coto distal do nervo; orientar a vascularização, o tecido cicatricial e bainha epineural de forma longitudinal; oferecer confinamento de fatores tróficos e fatores de crescimento, e prevenir o deslocamento ou rotação dos cotos neuronais. Quando as extremidades dos nervos seccionados não estão bem aproximadas, os axônios em regeneração crescem ao acaso no tecido cicatricial na extremidade do coto proximal, formando uma tumefação dolorosa conhecida como neuroma (FIELDS *et al.*, 1989; VOGEL *et al.*, 2002 *apud DELISTOIANOV, 2006*).

Além disso, a tubulização serve como modelo experimental *in vivo* para estudo dos aspectos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos da regeneração nervosa. Desde que Lundborg *et al.* (1982) demonstraram alcançar a regeneração nervosa através da colocação de tubo de silicone, este método vem sendo largamente utilizado (THANOS *et al.*, 1998)

Atualmente, é senso comum que o conduto ou tubo para o reparo do nervo seja confeccionado com material biodegradável, como poliéster ou poliuretano, colágeno, entre outros (**TABELA 1**) (PFISTER *et al.*, 2007). O tubo de silicone foi amplamente utilizado, porém suas desvantagens por não ser biodegradável e ter relativa rigidez têm causado complicações a longo prazo, o que levou a seu desuso. Além disso, o tubo de silicone resulta em formação de cicatriz e estenose na bainha neuronal. De acordo com Lundborg *et al.* (2004), 25-50% dos pacientes que usaram clinicamente tubos de silicone tiveram que retirá-lo, devido ao desconforto. Frequentemente, uma segunda cirurgia para sua retirada é necessária para eliminar diversos problemas, entre eles a resposta tecidual crônica e a compressão nervosa causada pela presença de um tubo rígido no corpo (MERLE *et al.*, 1989, *apud* AHMED, 2004).

Vários tipos de tubos têm sido utilizados para reparo primário e secundário de nervos em humanos e em estudos com animais experimentais. Durante o processo de reparo no tubo, um pequeno espaço por volta de 5 mm de comprimento pode ser deixado entre as terminações nervosas dentro do tubo. A fenda é rapidamente preenchida por fibrina, microvasos, fibroblastos, SCs e axônios (LUNDBORG, 2004).

O polihidroxibutirato (PHB) é um polihidroxiálcanoato (PHA), polímero pertencente à classe dos poliésteres, o qual foi isolado primeiramente e caracterizado em 1925 pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne. O poli(3-hidroxibutirato) ou P3HB, é um poliéster alifático natural obtido por fermentação bacteriana, utilizando-se fontes de carbono renováveis. A sacarose da cana de açúcar tem sido utilizada como fonte de carbono para a fermentação aeróbica por bactérias *Alcaligenes eutrophus*, para a obtenção do polímero pela indústria nacional, o que torna o seu uso vantajoso (ANDERSON & DAWE, 1990).

Tabela 1. Materiais mais estudados para o condute e suas propriedades. (FONTE: PFISTER *et. al.*, 2007).

MATERIAL DO CONDUITE NEURAL (CN)	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIAS
Silicone: poli(dimetilsiloxano)	Não biodegradável; bioinerte; impermeável, hidrofóbico.	Lundborg et al. (1982a); Braga-Silva (199)
Colágeno: proteína estrutural	Proteína com ligações cruzadas enzimaticamente; degradável; boas interações celulares.	Archibald et al. (1991;1995); Li et al. (1992); Krarup et al. (2002)
PGA: poli(glicolido)	Poliéster alifático, biodegradável por hidrólise.	Weber et al. (2000); Battiston et al. (2005)
PHB: poli(3-hidroxi butirato)	Poliéster alifático, biodegradável por hidrólise.	Young et al. (2002); Mosahebi et al. (2003)
PLLA: poli(L-lactideo)	Poliéster alifático, muito lentamente biodegradável por hidrólise.	Widmer et al. (1998); Evans et al. (2000)
Quitosano: <i>b</i> -(1-4)-associado a D-glucosamino	Polysaccharide, enzymatically degradable, positively charged, good cell interactions	Itoh et al. (2003); Yamaguchi et al. (2003)
Poliester uretano	Elastomeric polymer, biodegradable	Borkenhagen et al. (1998)
PHEMA-MMA: poli (2-hidroxiethylmethacrilateco-methylmethacrilato)	Polímero formando hidrogel, não-biodegradável, rígido.	Dalton et al. (2002); Belkas et al. (2005)

A biossíntese de PHB inicia-se com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA obtendo-se a acetoacetil-CoA a qual é, em seguida, reduzida a hidroxibutiril-CoA. Este último composto é então utilizado como um monômero para polimerizar o PHB. O poli-3-hidroxi butirato (P3HB) é provavelmente o tipo mais comum de polihidroxi alkanoato, mas muitos outros polímeros desta classe são produzidos por uma variedade de organismos: estes incluem o poli-4- hidroxi butirato (P4HB), polihidroxi valerato (PHV), polihidroxi hexanoato (PHH), polihidroxi octanoato (PHO) e seus copolímeros (ANDERSON & DAWE, 1990).

O polihidroxi butirato tem atraído muito interesse comercial devido às suas propriedades físicas e aparência similar aos polipropilenos (PP), mesmo tendo

diferentes estruturas químicas. O PHB é rígido e frágil (quebradiço), possui alto grau de cristalinidade, alto ponto de fusão (por volta de 180°C), e, ao contrário do PP, ele é biodegradável. O polipropileno, por sua vez, é muito mais duro e resistente, apesar de ser um material comercial muito mais comum.

As características do PHB ainda incluem atoxicidade; boa permeabilidade ao oxigênio; boa resistência ao ultra-violeta, mas pobre resistência a ácidos e bases; solubilidade em clorofórmio; biocompatibilidade, sendo, portanto adequado para aplicações médicas; força tênsil de 40Mpa, próxima ao do PP e capacidade de absorção de água (enquanto o PP flutua), facilitando sua biodegradação anaeróbica em sedimentos. Por todas as suas características, apresenta grandes perspectivas em aplicações na bioengenharia tecidual (MOHANNA *et al.*, 2003; REDDY *et al.*, 2003).

1.2.3.3 Transplante celular

O transplante celular é outra estratégia experimental e clínica, na tentativa de prover um ambiente favorável à regeneração de nervos periféricos. A habilidade em induzir a regeneração com materiais não biológicos parece ser insuficiente, e o desenvolvimento de nervos artificiais pela combinação de células com esses materiais é freqüentemente utilizado atualmente.

As células ideais para transplante deveriam ser facilmente acessíveis, capazes de rápida expansão em cultura, inertes imunologicamente, capazes de sobreviver por um longo período e ter boa integração com o tecido do hospedeiro (TOHILL *et al.*, 2004). Algumas opções de terapia celulares na regeneração de nervos periféricos incluem:

a) As **células de Schwann**, que são conhecidas pela sua importância no SNP, sendo essenciais no processo de mielinização e construção do microambiente permissivo ao crescimento axonal. Em lesões no SNP, essas células contribuem para degradação da mielina, para a produção de fatores de crescimento e para a remielinização dos axônios lesados (TAKAMI *et al.*, 2002). Assim, o transplante de SCs autólogas é outra estratégia para criar um ambiente favorável na regeneração nervosa.

O principal fator limitante, no entanto, é o tempo de pelo menos três semanas requerido para proliferação e expansão dessas células em cultura, de forma a viabilizar um transplante efetivo. O longo tempo requerido para a proliferação pode representar uma redução dos benefícios terapêuticos em situações onde o reparo imediato é possível e essencial. Além disso, essa proliferação possui comparativamente alto custo e há risco inerente de contaminação. Apesar de tudo, o transplante com SCs no interior de conduites tem sido amplamente utilizado nos últimos anos, com vantagens comprovadas na melhora da regeneração de nervos (MOSAHEBI *et al.*, 2001; PFISTER *et al.*, 2007).

b) As **células-tronco** são consideradas responsáveis pela produção e manutenção da maioria das linhagens celulares do organismo adulto. Associada à sua capacidade extensa de auto-renovação, as células-tronco possuem grande potencial para originar diversos progenitores diferenciados (DEANS & MOSELEY, 2000; MINGUELL *et al.*, 2001).

As células-tronco *totipotentes* são capazes de formar o embrião (o oócito fertilizado e os descendentes das primeiras duas divisões para a formação do blastocisto). Durante o desenvolvimento embrionário, as células crescem em número

e sofrem diferenciação para células-tronco *pluripotentes* (ALISON *et al.*, 2002). Em teoria, as células pluripotentes podem gerar todos os tipos celulares e possuem alta capacidade de proliferação em um estado indiferenciado por um período prolongado em cultura. Desta forma, são derivadas preferencialmente de tecidos embrionários, especialmente da massa interna do blastocisto (DONOVAN & GEARHART, 2001). No entanto, já foram evidenciadas em adultos na medula óssea (MO) (REYES *et al.*, 2001) e também no sangue do cordão umbilical (KUCIA *et al.*, 2007).

As células pluripotentes são especializadas em originar as estruturas resultantes da diferenciação de cada uma das três camadas germinativas: o ectoderma, o endoderma e o mesoderma. A partir destas camadas germinativas, os tecidos se desenvolvem contendo células-tronco adultas multipotentes, com a função primária de promover reparo tecidual localizado (ALISON *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, tem havido grande interesse na possibilidade das células-tronco adultas sofrerem transdiferenciação e adquirirem um fenótipo diferente do seu tecido de origem. Os estudos têm mostrado que um determinado tipo de célula-tronco, além de originar uma população de células específicas do tecido em que reside, pode também produzir um conjunto de progenitores de outros tecidos. Essa característica foi denominada de plasticidade (KRAUSE *et al.*, 2001; MINGUELL *et al.*, 2001; HERZOG *et al.*, 2003).

Assim, as células-tronco hematopoiéticas, além de produzirem as células sangüíneas, podem ainda originar, por exemplo, as células hepáticas ovais. As **células-tronco mesenquimais** (MSCs, do inglês *mesenchymal stem cells*), também denominadas células estromais da medula óssea, além de originarem uma grande variedade de fenótipos mesenquimais (osso, cartilagem, gordura e células musculares), têm apresentado plasticidade para se trans-diferenciarem em linhagens

não mesenquimais, incluindo astrócitos, miocárdio e células mielinizadas do SNP e medula espinhal (WOODBURY *et al.*, 2000; MINGUELL *et al.*, 2001; HERMANN *et al.*, 2004; TOHILL *et al.*, 2004).

O estudo de Sanchez-Ramos *et al.* (2000) demonstrou que as MSCs *in vitro* diferenciam-se em células que expressam marcadores neuronais quando expostas ao BDNF e ao NGF. Essa plasticidade demonstra que o estado diferenciado da célula é reversível, e as células adultas requerem contínua regulação fisiológica para manter o equilíbrio dos fatores presentes em cada momento. Assim, as células-tronco multipotentes dispõem de uma “pluripotencialidade”, com a habilidade de transdiferenciação em outras linhagens celulares (GAGE *et al.*, 1998; VESCOVI & SNYDER, 1999).

Devido à habilidade das células-tronco multipotentes de originar um grande repertório de células diferenciadas, elas podem ser úteis em protocolos de terapias celulares (DONOVAN & GEARHART, 2001). No estudo de Murakami *et al.* (2003), utilizou-se um tubo de silicone com células progenitoras neurais, para verificar a sua efetividade no reparo de um defeito de 15 mm no nervo ciático do rato. Observou-se uma regeneração significativamente maior nos grupos que receberam as células, quando comparados com os animais controle que receberam apenas veículo. Essa observação foi feita em quatro dos nove tubos após 6 semanas de cirurgia, e em sete tubos 10 semanas após a cirurgia no grupo enxertado com células progenitoras neurais.

Tohill *et al.* (2004) examinaram o efeito do Fator de Crescimento Glial (GGF) na morfologia e expressão do fenótipo de células estromais da medula de ratos adultos *in vitro* e o efeito do transplante de células estromais da medula diferenciadas e indiferenciadas num modelo de lesão de nervo. Os transplantes de

células diferenciadas e indiferenciadas conferiram benefícios na regeneração axonal, em comparação com o controle. Os resultados mostraram que as células estromais da medula expressam marcadores de células gliais através da exposição de GGF *in vitro*. Além disso, quando transplantadas num modelo de regeneração periférica, há efeito benéfico na regeneração dos axônios e das SCs.

Zhang *et al.* (2005), investigaram o efeito das MSCs em um tubo conectando um intervalo de 5 mm do nervo ciático do rato. A recuperação funcional em termos de velocidade de condução e índice funcional do ciático foi significativamente melhor quando comparado ao controle, sem MSC. Em 2006, Pereira Lopes *et al.* realizaram a transecção do nervo ciático de camundongos com tubulização e MSCs da medula óssea injetadas no interior desse tubo. Após 6 semanas da transecção, verificaram que o número de fibras mielinizadas e a área da mielina foram maiores quando comparadas ao grupo controle.

Em humanos, o transplante autólogo de células mono-nucleares derivadas da medula óssea associado a próteses de silicone foi testado nos nervos ulnar e mediano. Os resultados mostraram maior recuperação da função motora e sensorial (BRAGA-SILVA *et al.*, 2008).

Devido a problemas éticos associados com o uso de células-tronco embrionárias ou de tecido fetal e ao potencial oncogênico e de rejeição pelo hospedeiro, outras fontes para o uso de terapias celulares têm sido pesquisadas (WANG *et al.*, 2000; KOKAI *et al.*, 2005).

c) **Células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs).** O tecido adiposo subcutâneo, assim como a medula óssea, é derivado do mesoderma embrionário, e contém uma população de células progenitoras mesodermiais

multipotentes, também chamadas de **células mesenquimais adiposas** (ZUK *et al.*, 2001) ou ADSCs (FRASER *et al.*, 2006).

Atualmente, é aceito que a linhagem adiposa surge de uma população de células-tronco multipotentes originadas do mesoderma, que reside no estroma vascular do tecido adiposo (BAPTISTA *et al.*, 2007). Essas células foram previamente denominadas de pré-adipócitos, devido à sua habilidade natural em se diferenciar em adipócitos e têm sido estudadas por décadas como substitutos potenciais de tecidos moles (DARDICK *et al.*, 1976 *apud* KOKAI *et al.*, 2005).

Os estudos têm comparado as células mesenquimais adiposas com as MSCs da medula óssea. Utilizando citometria de fluxo e imunohistoquímica, foi demonstrado que elas possuem um fenótipo de expressão de proteínas que é comparável às MSCs (GRONTHOS *et al.*, 2001; GIMBLE & GUILAK, 2003). Outra semelhança refere-se à capacidade de se diferenciarem em condrócitos, osteoblastos e miócitos. Embora muitos estudiosos defendam a similaridade entre estas células progenitoras (ZUK *et al.*, 2001; WAGNER *et al.*, 2005; IZADPANAHI *et al.*, 2006, KERN *et al.*, 2006), outros pesquisadores acreditam nas suas propriedades únicas, principalmente em relação ao seu potencial adipogênico (CASTEILLA *et al.*, 2004; BAPTISTA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007).

Trabalhos recentes têm demonstrado a diferenciação das células mesenquimais adiposas em células neuronais, tanto *in vivo*, como *in vitro* (ZUK *et al.*, 2002; KANG *et al.*, 2003a; SAAFORD *et al.*, 2004). O estudo de Kang *et al.* (2003) indicou que células-tronco do tecido adiposo do tecido estromal adulto têm a capacidade de se diferenciarem em linhagens mesenquimais e não mesenquimais, da mesma forma que as MSCs da MO. Além disso, houve melhora das funções neurológicas em ratos com isquemia cerebral, após o transplante das ADSCs.

O fato dessa população de células estar presente em praticamente todos os órgãos do organismo adulto, associado à simplicidade do procedimento cirúrgico necessário para sua obtenção, à baixa complexidade dos procedimentos de isolamento e ao seu grande potencial de diferenciação, fazem esta fonte de MSCs mais atrativa para pesquisadores e clínicos (CASTEILLA *et al.*, 2004).

1.2.4 Avaliação Funcional do nervo ciático após lesão

A deficiência funcional provocada pelas lesões nervosas periféricas freqüentemente persiste, mesmo que os axônios sensitivos e motores se regenerem. Isso parece estar relacionado a fatores como a morte de neurônios sensitivos e motores, ao fato de algumas fibras regeneradas permanecerem diferentes das fibras normais, e principalmente à falta de especificidade na regeneração. A regeneração de axônios com terminações na pele, por exemplo, pode alcançar o músculo ou vice-versa (LUNDBORG & ROSÉN, 2007).

Parte dos axônios em regeneração não consegue atingir as bandas de Büngner e penetrar no compartimento de tecido conjuntivo. Uma vez que os axônios regenerados alcancem a superfície das SCs e a camada interna da lâmina basal, estas irão agir como substrato necessário à regeneração. Os axônios motores em crescimento são incapazes de identificar seus músculos originais e re-inervam de forma aleatória os músculos denervados pela transecção. Esses músculos são re-inervados parcialmente, portanto, parcialmente por uma população de células estranhas e por outras células originais. Isso pode contribuir para ativação de padrões musculares alterados, tais como co-contrações de flexores e extensores durante a locomoção, com conseqüente alteração desta função (IJKEMA-PAASEN

et al., 2004; MEEK *et al.*, 2007). No entanto, com o reaprendizado do movimento associado a plasticidade cortical esses efeitos podem ser reduzidos.

A avaliação funcional de humanos é relativamente fácil, mas de animais é praticamente impossível com os mesmos métodos. Isso motivou a busca por meios específicos em modelos experimentais. Gutmann & Gutmann (1942) *apud* Raso *et al.* (2006) demonstraram que a perda da capacidade de espalhar os dedos da pata traseira é um parâmetro confiável para avaliar o grau de lesão, bem como para seguir sua recuperação. No entanto, esse método foi considerado rudimentar, e não permitia quantificar nenhum dos parâmetros supracitados. DeMedinaceli *et al.* (1982) desenvolveram um método quantitativo confiável e reproduzível da condição funcional do nervo ciático de ratos. Com esse método foi possível a avaliação do grau de lesão e da recuperação. O teste foi denominado Índice Funcional do Ciático (SFI), e foi posteriormente modificado por outros autores (CARLTON & GOLDBERG, 1986; BAIN *et al.*, 1989).

O SFI é um método bastante utilizado para avaliação funcional. Ele analisa parâmetros das pegadas das patas impressas (“*footprints*”) do lado normal e do lado lesionado, e através de uma fórmula matemática, provê informações sobre a recuperação das conexões sensório-motoras relacionadas ao ato de caminhar (DeMEDINACELI, *et al.*, 1982). No entanto, as contraturas desenvolvidas no pé após a lesão, a autotomia e variações na velocidade do ato de caminhar foram considerados fatores negativos para avaliação durante a aplicação deste teste (DELLON & MACKINNON, 1989; VAREJÃO *et al.*, 2004).

Outra forma de avaliar a recuperação funcional do nervo ciático em modelos animais é através do Índice Estático do Ciático (SSI). Este índice foi introduzido por Bervar (2000) e utiliza basicamente as pegadas das patas adquiridas com o animal

na posição estática. Desta forma minimiza os erros causados pelo SFI e consiste num método de medidas de maior acurácia e repetibilidade quando comparado ao SFI, além de oferecer considerável diminuição do estresse ao animal (BAPTISTA AF *et al.*, 2006).

Ambos os testes, SFI e SSI foram inicialmente desenvolvidos para serem aplicados em ratos. Em 1998, Inerra *et al.* adaptaram o SFI para uso em camundongos. Baptista AF *et al.*, em 2007, desenvolveram a fórmula do SSI para aplicação em camundongos. Eles constataram alta correlação entre o SFI e o SSI em camundongos e dessa forma validaram o uso do SSI para avaliação da disfunção neuronal do ciático de camundongos, após lesão.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Verificar a contribuição das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano no processo de regeneração nervosa periférica, após secção total do nervo ciático de camundongos seguida de tubulização com prótese biodegradáveis de polihidroxibutirato (P3HB).

2.2 Objetivos Específicos:

- Comparar a arquitetura tecidual após a regeneração entre animais tratados e animais controle;
- Avaliar a presença de células de Schwann na região da lesão;
- Avaliar o crescimento axonal inicial do nervo ciático no interior do tubo de PHB;
- Analisar a recuperação funcional dos animais submetidos à lesão e tratamento com as células mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano.

3. METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados 15 camundongos machos adultos da linhagem *Balb-C*, pesando entre 27-32g, com dois meses de idades, mantidos sob os cuidados e regras aprovados pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH) americano e pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico que consistiu em transecção total e tubulização do nervo ciático.

3.2 Procedimento cirúrgico

A cirurgia foi realizada na pata traseira esquerda de todos os animais. Os animais foram anestesiados com um coquetel composto de Ketamina 100mg/ml, Xylazina 20mg/ml e Acepromazina 10mg/ml, injetados por via intra-muscular, numa dose de 0,5 a 0,7cc/Kg. Quando houve necessidade, foi adicionada apenas ketamina via intra-muscular, numa dose de 22mg/Kg. Foi aplicado sobre os olhos Lacrilube Oftalmic, em gel (*Allergen Pharmaceuticals, Irvine, CA*), para evitar o ressecamento.

Após a anestesia, realizou-se a tricotomia (**Figura 11 A**) e limpeza da região posterior da perna com álcool 70%, seguida por incisão no terço superior da coxa posterior esquerda, para exposição do nervo ciático (**Figura 11 B**). O nervo foi então seccionado (**Figura 11 C**) e um tubo biodegradável de Polihidroxibutirato (P3HB) medindo 6 mm de comprimento e 1 mm de largura (diâmetro interno) foi colocado na região e suturado com fio mononylon ethilon 10-0 (Ethicon) aos cotos proximal e distal do nervo, ocorrendo desta forma a tubulização (**Figura 11 D**). Os cotos foram

inseridos no interior do tubo, aproximadamente 1,5 mm de cada lado, para que desta forma houvesse uma fenda (*gap*) de 3 mm no tubo (**Figura 12**). Não foi retirado um fragmento do nervo, apenas fez-se uma transecção total seguida da técnica de tubulização.

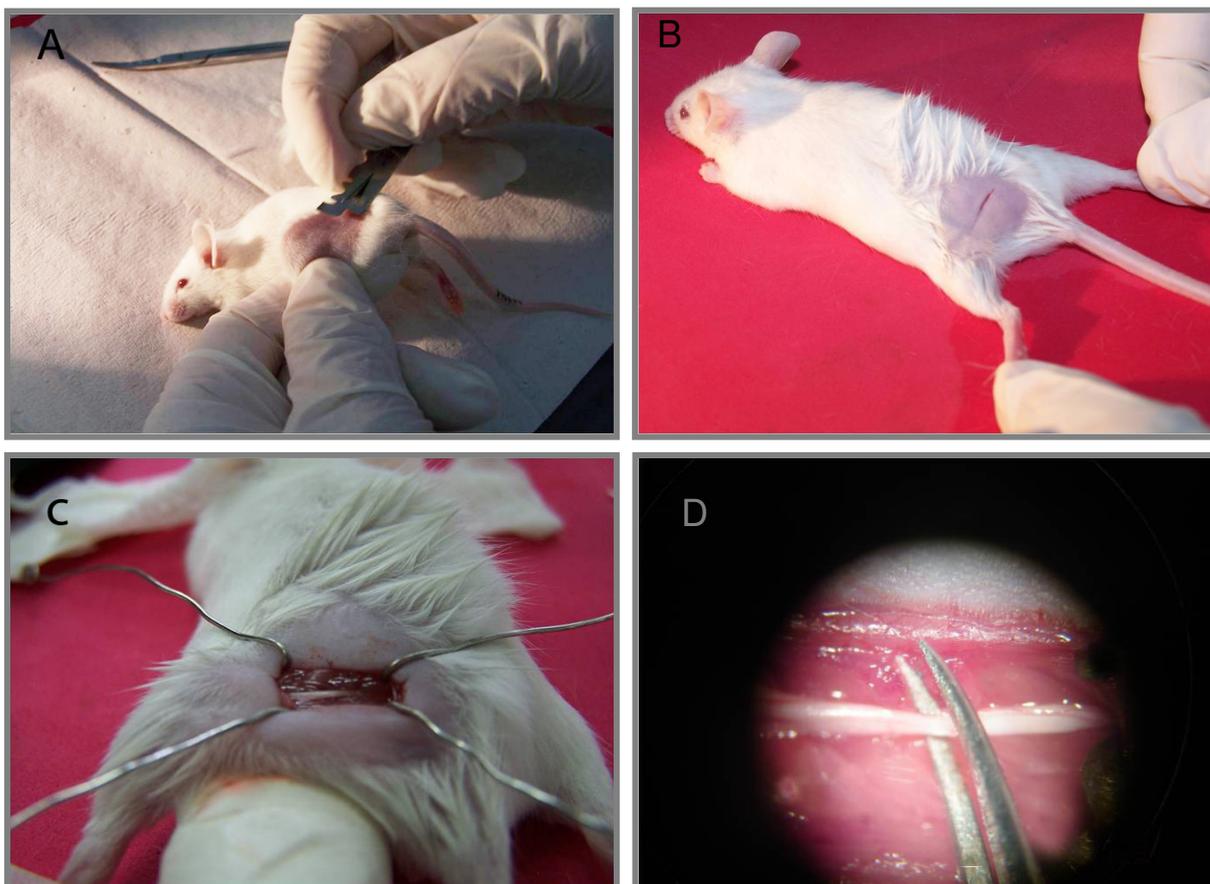


Figura 11. Seqüência do Procedimento de tubulização do nervo ciático do camundongo. (A) Tricotomia, (B) Incisão cirúrgica, (C) Exposição do nervo ciático, (D) Transecção total do nervo ciático.

A região foi fechada em uma única camada (pele) com fio absorvível oásis 4/0. Após a cirurgia, os animais foram colocados sobre uma manta para mantê-los aquecidos.

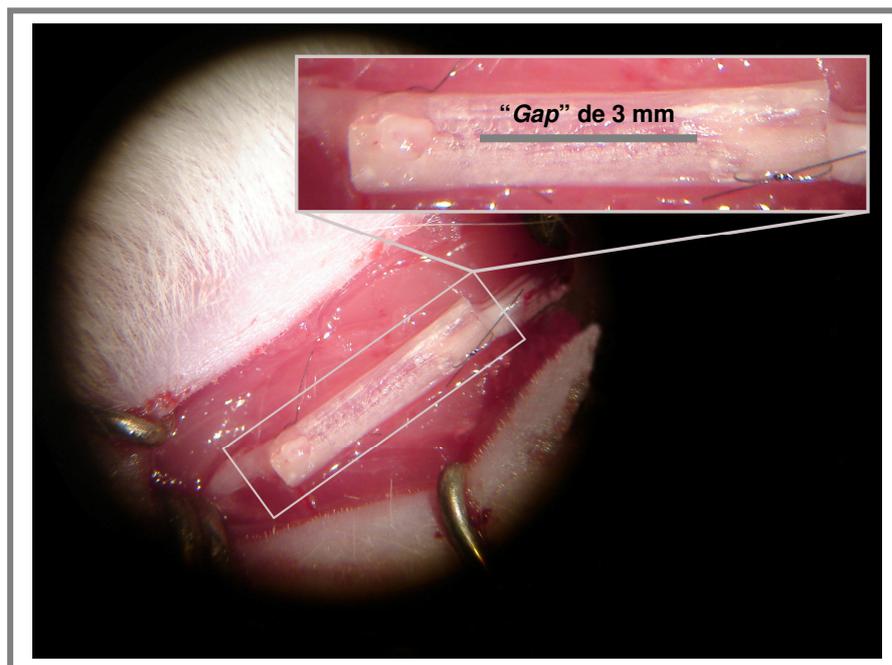


Figura 12. Procedimento de tubulização do nervo ciático do camundongo após transecção. Em maior aumento é possível visualizar o tubo P3HB de 6 mm de comprimento e as suturas dos cotos proximais e distais, deixando um espaço de 3 mm.

3.3 Tubo de Polihidroxibutirato – P(3HB)

Este tubo foi feito em colaboração com o Prof. Leonardo Andrade, do departamento da Histologia/UFRJ. O pó de P3HB é da PHB Industrial S/A (São Paulo), adquirido pela Dr^a. Rossana Thire, do departamento de metalurgia da COPPE/UFRJ. PM inicial: 524.000 DA.

A solução inicial foi preparada utilizando-se o pó a 8% em clorofórmio (PA MERCK) agitando-se por 2h a 65°C. Para fazer os tubos, utilizou-se esta solução. Moldamos uma pipeta Pasteur de vidro para que ficasse com diâmetro interno de 1 mm. Desta forma, a pipeta foi imersa na solução por 3 vezes sem secar e, após a terceira submersão, foi permitida a secagem completa. O plástico ficou aderido ao vidro. O tubo foi então removido da pipeta e as regiões do tubo mais homogêneas foram cortadas nas dimensões utilizadas (6 mm) com lâmina e ajuda de microscópio estereoscópio (lupa) (**Figura 13**).

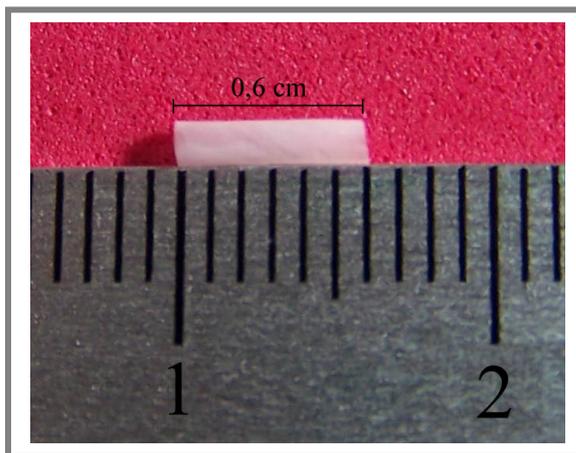


Figura 13. Fotografia em baixo aumento do tubo P3HB, demonstrando o tamanho de 6 mm do tubo utilizado para o processo de tubulização.

MICROSCOPIA DE VARREDURA DO TUBO:

Os tubos foram diretamente depositados sobre uma fita condutora de carbono dupla face sobre suportes-pino de alumínio, metalizados com fina camada de ouro de aproximadamente 30 nm em aparelho "gold-sputtering" (balzers scs-040) e observados no microscópio eletrônico de varredura JEOL 5310, operado em 20 kv. As imagens digitais foram obtidas através do software *semafore* na resolução de 1024 x 768 pixels.

3.4 Desenho experimental

Neste trabalho realizou-se o experimento de três grupos, de forma pareada e controlada. No primeiro grupo (n=5) foram colocadas células mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano dentro do tubo, utilizando-se uma pequena seringa bivelada. Este grupo foi denominado grupo de células mesenquimais adiposas ou **MA**. No segundo grupo (n=5) foi injetado apenas meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), por isso foi chamado de grupo

DMEM. No terceiro e último grupo (n=5) o tubo foi deixado vazio e foi atribuída a este grupo a nomenclatura de **TP**, referente ao tubo puro.

As células mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano foram isoladas conforme a descrição abaixo, sendo o implante diluído em meio de cultura (DMEM), na concentração de 2×10^4 , em um volume final de 6 μ l.

3.5 Isolamento das células mesenquimais do tecido adiposo humano

As células utilizadas nesta tese foram preparadas sob a orientação da Prof^a. Maria Isabel Dória Rossi (ICB/UFRJ) e seu grupo de pesquisa. Amostras de tecido adiposo subcutâneo lipoaspirado da parede abdominal foram obtidas de pacientes submetidos à cirurgia estética no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) deste hospital – portaria: 088/04.

Pequenos fragmentos de tecido adiposo foram obtidos após a retirada de vasos sangüíneos. Estes fragmentos ou o material obtido da lipoaspiração foram submetidos à digestão enzimática com 1mg/mL de colagenase IA (Sigma Chemical Co.) por vinte minutos a 37°C. A suspensão obtida foi filtrada em malha de nylon com poro de 150 μ m, centrifugada por 10 minutos e lavada duas vezes com PBS. As células foram ressuspensas em DMEM com 10% de soro fetal bovino (BSA) e antibiótico e 5mL de suspensão com 10^5 células/cm² foram distribuídas em garrafas de cultura de 25cm², que foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 16 horas as células não aderentes foram retiradas e a fração aderente foi lavada com PBS, sendo mantida com 5% de CO₂ para expansão. Seu potencial de diferenciação para as diversas linhagens mesenquimais (adipogênica, osteogênica,

condrogênica e muscular) e endotélio foi testado *in vitro* em modelos bi- e tridimensionais, na presença de meio de cultura indutor. Amostras da suspensão pós-dissociação e da monocamada pré-indução foram retiradas para caracterização fenotípica, por citometria de fluxo, da população celular (BATISTA *et al.*, 2007).

As células mesenquimais do tecido adiposo expandidas *in vitro* adquirem morfologia fibroblastóide (**Figura 14**). Foi observada expansão destas células após indução de diferenciação em linhagens mesodérmicas, osso, tecido adiposo e cartilagem (**Figura 15**). A indução para cartilagem foi realizada em um sistema de cultura tridimensional, do tipo esferóide. Após a formação dos esferóides, estes foram incubados em meio indutor contendo TGF- β , por até quatro semanas. A análise histológica destes esferóides mostrou deposição de matriz extracelular, revelada pelo corante alcian blue (pH ácido) que possui afinidade por glicosaminoglicanos e proteoglicanos ácidos (**Figura 15 A**). Após quatro semanas de indução para a via osteogênica, verificaram-se depósitos de cálcio, evidenciados pela coloração de Von Kossa (**Figura 15 B**). As células induzidas para a via adipogênica adquiriram uma morfologia mais robusta. Foi possível observar após quatro semanas de indução a presença de células contendo vacúolo único com afinidade pelo corante Oil red (**Figura 15 C**) (dados cedidos pelo grupo da Prof^a M^a Isabel Rossi).

No dia do procedimento cirúrgico de tubulização do nervo ciático, as células mesenquimais adiposas expandidas foram lavadas com solução de PBS e tripsinizadas, seguida por centrifugação com DMEM. A quantificação das células foi realizada pelo método de azul de trypano, sendo separado 2×10^4 células, em um volume final de 6 μ l para cada camundongo.

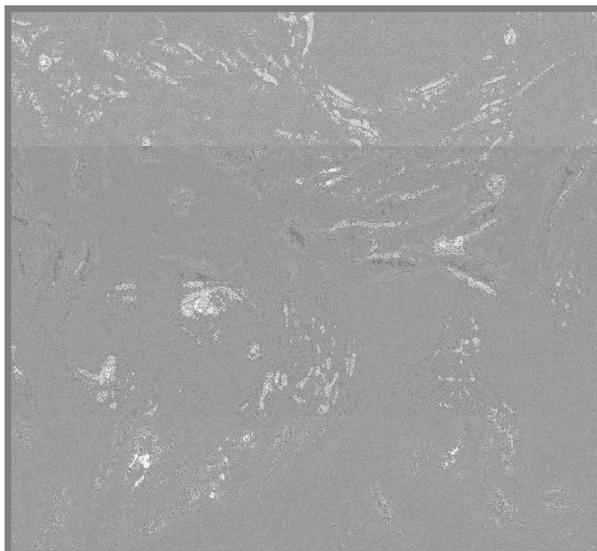


Figura 14. Cultura das células mesenquimais do tecido adiposo em expansão, com aspecto fibroblastoíde. Contraste negativo, 10X.

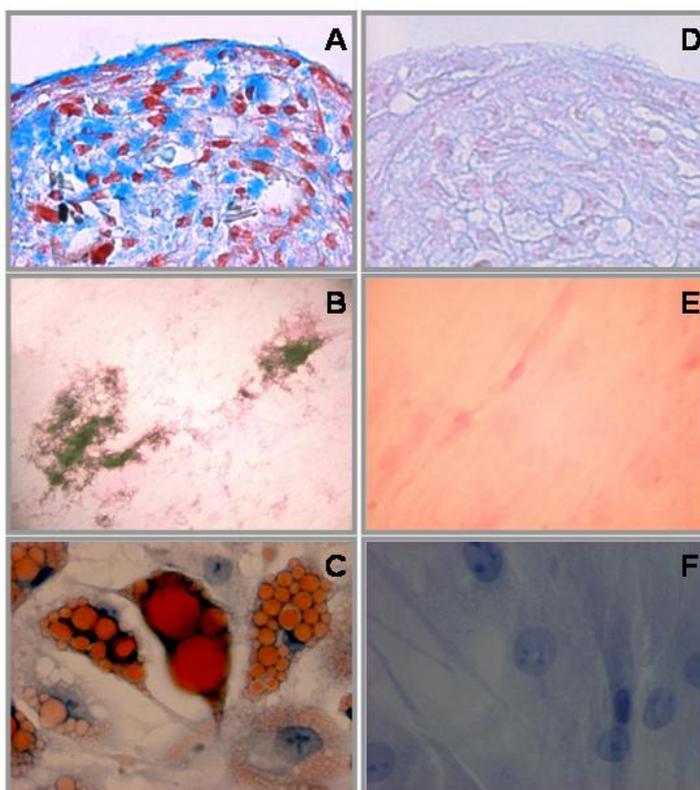


Figura 15. Potencial de diferenciação de MSCs de tecido adiposo. O potencial de diferenciação das MSCs foi verificado através de análise morfológica após o cultivo das células em meios indutores específicos de cada via de diferenciação. **(A)** Diferenciação condrogênica após 4 semanas de indução. *Alcian Blue*. **(B)** Diferenciação osteogênica após três semanas de indução. *Von Kossa*. **(C)** Diferenciação adipogênica após quatro semanas de indução. *Oil Red O*. **(D, E, F)** Controles pareados das induções indicadas em A, B e C, respectivamente. Objetiva 40X. (Dados cedidos pelo grupo da Prof^a M^a Isabel Rossi).

3.6 Perfusão e Fixação do tecido

Após *cinco semanas* do procedimento cirúrgico os camundongos foram submetidos à perfusão. Os animais foram anestesiados com o mesmo coquetel utilizado no procedimento cirúrgico e as quatro patas foram fixadas com agulhas. Em seguida houve dissecação até exposição do coração e foi realizada inserção da agulha do scalp no ventrículo esquerdo. Foi feita incisão com tesoura no átrio direito e injetado 150 a 200 ml de solução de PBS. Em seguida injetado paraformaldeído a 4% em torno de 150 ml até enrijecimento da cauda e cabeça. Estas observações garantem a fixação dos tecidos *“in situ”*.

Os animais foram então submetidos à excisão do local do nervo operado, incluindo o tubo e bordas. O coto proximal foi sempre deixado com tamanho maior para identificação. Em cada extremidade do nervo foi colocado alfinete para mantê-lo o mais retilíneo possível dentro da solução de formol tamponado. As amostras foram deixadas *overnight*, em temperatura ambiente.

3.7 Processamento do tecido

Para análise histológica, o tubo com comprimento de 6 mm foi dividido em três blocos, com auxílio de microscópio estereoscópio: bloco a, b e c.

- O bloco **“a”** foi referente à porção mais proximal do tubo (mais próximo à medula espinhal), com tamanho de 1,5 mm + borda proximal do nervo.
- O bloco **“b”** consistiu na parte central da lesão ou epicentro, referente ao *“gap”* que foi deixado durante o procedimento cirúrgico. Esta região teve tamanho de 3 mm.

- O bloco “c” foi referente à porção mais distal do tubo (mais distal em relação à medula espinhal), com tamanho de 1,5 mm + borda distal do nervo.

Os blocos foram processados em 2 banhos de álcool (70% e 100%) e 2 banhos de xilol (ambos a 100%). Em seguida foram inseridos em duas soluções de parafina subseqüentes, a 60°C. Em cada uma destas etapas foi deixado um tempo de 50 min. O processamento foi finalizado com o emblocamento do tubo e nervo em parafina. Este material foi processado no micrótomo (*Lupe*) em fatias de 5 µm de espessura. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro com poli-L-lisina e armazenados a temperatura ambiente.

Em cada grupo (n = 5), dois animais foram cortados longitudinalmente e três animais foram cortados transversalmente.

3.8 Colorações Histológicas

As colorações histológicas são técnicas clássicas utilizadas para identificação das células e tecidos que compõem uma amostra. Neste trabalho, as técnicas utilizadas para colorações foram a eosina e hematoxilina (HE) para visualização da citoarquitetura e o Sirius Red para visualização dos eosinófilos.

O primeiro passo, comum às duas colorações, foi a desparafinização dos cortes. Para isso, as lâminas foram colocadas por 24 horas a 60 °C e processadas em uma seqüência de 3 banhos de xilol (90, 100 e 100% - 10 minutos cada) e 3 de álcool (70, 90 e 100% - 5 minutos cada).

A. Hematoxilina & Eosina (HE)

A coloração de HE (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, EUA) permite a identificação dos corpos celulares (em cor escura, violeta) e dos componentes citoplasmáticos (cor variável de célula para célula) devido à afinidade de substâncias basófilas pela hematoxilina e acidófilos pela eosina.

Depois de desparafinizadas, as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos. Em seguida foram colocadas na solução de hematoxilina por 10 minutos. Foram então lavadas em água corrente (5 minutos) e colocadas rapidamente em uma solução de álcool ácido 1%, sendo lavadas novamente. Em seguida foram imersas em eosina por 1 minuto, passando rapidamente para uma solução de água contendo ácido acético a 1% (solução de água-acética). As lâminas foram lavadas em água destilada e submetidas a 3 banhos de álcool (90, 100 e 100%) por 5 minutos cada e 3 banhos de xilol (90, 100, 100%) por 10 minutos cada. Depois disso, foram montadas com entelan, cobertas com lamínulas de vidro e armazenadas a temperatura ambiente.

B. Picrosirius Red para Eosinófilos

Inicialmente realizou-se a desparafinização, seguida pela hidratação (Álcool 100%, Álcool 90%, Álcool 70% e Água destilada – 5 minutos cada). Em seguida os cortes histológicos foram corados com a Hematoxilina de Harris, por 8 min e imersos em solução de álcool contendo 0,5% de ácido clorídrico (solução álcool-clorídrica). As lâminas foram lavadas rapidamente em água corrente e destilada e corada com o Sirius red por 2 horas. Após este período foram lavadas em água corrente por 10 minutos, desidratadas (Álcool 95%, Álcool 100% e Álcool 100% – 5 minutos cada) e clarificadas (três banhos de xilol – 5 minutos cada). Feita

montagem com Entellan, seqüencialmente. O resultado evidencia o Eosinófilo em cor avermelhada/rosada e outras células em azul.

3.9 Imunohistoquímica

Para realização da imunohistoquímica, os cortes foram desparafinizados e hidratados. Para desparafinização foram deixados 24h em temperatura de 60°C seguidos por três banhos de xileno (15min cada) e três banhos de álcool (5min cada), ambos em soluções decrescentes (100%, 90% e 80%). Para hidratação foram submetidos a dois banhos de água destilada (5min cada). Como controle negativo das reações utilizou-se cortes histológicos que foram submetidos ao mesmo procedimento (descrito abaixo) exceto a incubação com o anticorpo primário. Este foi substituído pela solução PBS-BSA 3%, Triton X-100 0,5%.

A. S100 - *Rabitt Anti Cow* – *marcação das células de Schwann*

Seguida a desparafinização e hidratação realizou-se inibição de ligações inespecíficas com incubação na solução aquosa 5% de bórax, por 20min. Os cortes foram lavados com água destilada duas vezes e realizada inibição da peroxidase endógena, com a solução H₂O₂ 60% no metanol, por 15min no escuro. Em seguida os cortes foram lavados em água duas vezes e em solução fosfato salina tamponado 0,1mM, pH 7.4 (PBS) duas vezes (5min cada). O bloqueio das ligações inespecíficas das imunoglobulinas com o tecido foi realizado utilizando-se PBS-BSA 10%-Triton X-100 0,05% - Leite Mólico a 8% em água, numa proporção 1:1, por uma hora em temperatura ambiente. Foi feito ainda bloqueio da biotina endógena com avidina e biotina, 15 minutos cada (Kit Dako). Em seguida as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário S100 (rabitt) produzido pela Dako e diluídas numa concentração

de 1:200 (diluições previamente testadas) em PBS-BSA 3%, Triton X-100 0,5% overnight na geladeira em câmara úmida escura.

Posteriormente, após lavagens com PBS-Tween 0,25%, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit biotinilado (Sigma) (1:50) em PBS na temperatura ambiente, seguida de lavagem com PBS-Tween 0,25%, e incubação no complexo streptavidina-peroxidase (1:50) do kit LSAB2 por uma hora em câmara úmida. A revelação foi realizada com a diaminobenzidina do kit *liquid DAB* (DAKOCYTOMATION) seguindo-se de contra-coloração pela hematoxilina de Harris diluída (1:3), por 5 minutos. Após o azulamento das lâminas coradas, estas foram lavadas em água e diferenciadas em água ácida (0,5% HCL em água destilada), desidratadas (três banhos de álcool por 5min cada), clarificadas em xileno (três banhos por 10min cada) e montadas com ENTELLAN® (MERCK, Alemanha) para posterior visualização em microscópio ótico.

B. Griffonia – Lectina – Bandeiraea simplicifolia – L 2140

A lectina *griffonia simplicifora* (BS-I), que se liga especificamente a resíduos galactosi, cora o endotélio vascular de várias espécies animais (ALROY *et al.*, 1987), o que inclui o endotélio de camundongos. Após seguir protocolo de desparafinização e hidratação, os cortes foram lavados com PBS pH 7,4 (2x 5 minutos) e imersos em solução aquosa de bórax 5% (20 minutos). Foram novamente lavados com PBS (2x 5min) e imersos em Álcool comercial (1 minuto). Seguiu-se para a Inibição da peroxidase endógena, 60% em metanol (15 minutos) e imersão no Álcool comercial (1 minuto). Realizada lavagem com PBS (2x 5 minutos), seguido por dois bloqueios de ligações inespecíficas, utilizando-se extrato de fígado de camundongo (30 minutos) e PBS-BSA 10%-Triton X-100 0,05% - Leite Molico a 8% em água, numa proporção 1:1 (1 hora) em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS realizou-

se o bloqueio com avidina e biotina, 15 minutos cada (Kit Dako). Em seguida as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário *Griffonia simplicifolia* L2140, da Sigma, numa diluição de 1:100 em PBS-Triton 0,5% (diluições testadas preliminarmente) overnight na geladeira em câmara úmida escura.

Em seguida, após ambientação das lâminas em temperatura ambiente e lavagens com PBS-Tween 0,25%, estas foram incubadas com a extravidina peroxidase da Sigma 1:30 em PBS por uma hora (temperatura ambiente). A revelação da reação foi realizada da mesma forma que no protocolo S100, incluindo todas as etapas seqüenciais até a montagem.

C. Anti-F4 80 – marcação dos Macrófagos

Após a desparafinização e hidratação as laminas foram imersas em Cloreto de amônio 50mM em PBS (2X15) minutos; lavadas com PBS pH 7,4 (2X 5 minutos); realizada inibição peroxidase 70% em metanol (20 minutos). Seqüencialmente, colocou-se as lâminas em PBS pré-aquecido por mais 15 minutos. Nos últimos 5 minutos do banho, foi acrescentada a tripsina (0,2%) em cada uma das lâminas e deixado por 20 minutos na estufa. Seguiu-se com lavagem com PBS pH 7,4 (3X5 minutos) e bloqueio de ligações inespecíficas PBS-BSA10% - Leite mólico 8% (1:1) por 1 hora. Utilizou-se para marcação de macrófagos o anticorpo F4/80 (rat anti-mouse MCA497 Serotec), diluição 1:50 PBS/BSA 3% - Triton 0,1% - Tween 0,05%. Deixado overnight em câmara úmida escura na geladeira.

No dia seguinte, as lâminas foram ambientadas, lavadas com PBS (2X5 minutos) e incubadas com anticorpo anti-rat IgG (1:30 Vector) por 1 hora. Foram lavadas e incubadas com Extravidina-peroxidase (1:30) por 1 hora. Novamente lavadas com PBS-Tween 0,25% (1X5 minutos) e seguido o protocolo de revelação e montagem já descritos anteriormente.

3.10 Mensuração da zona de regeneração

Nos **cortes transversais** (n=9, sendo 3 do grupo de células mesenquimais adiposas (**MA**), 3 do grupo **DMEM** e 3 do grupo do Tubo Puro (**TP**)), foram realizadas mensurações da área da lâmina que corresponde ao início do processo de reparo, representada pelo **final do bloco “a”** (porção mais proximal do tubo) e **início do bloco “b”**. A divisão entre os blocos corresponde exatamente à interface entre o nervo íntegro e a área do início do processo de reparo do nervo, ou seja, a 1,5 mm de distância do início do tubo. O critério empregado para identificar o exato local do início do processo de regeneração foi a observação seriada dos cortes no **final do bloco “a”** e no **início do bloco “b”**. A área usada para os cálculos foi o primeiro corte em que se observou diminuição do diâmetro do nervo. Esse procedimento foi realizado para cada animal. Através do programa Image-Pro Plus foram medidas a área total, a área de tecido nervoso, diâmetro total e o diâmetro de tecido nervoso.

Para a análise dos **cortes longitudinais** (n=6, sendo 2 do grupo de células mesenquimais adiposas (**MA**), 2 do grupo **DMEM** e 2 do grupo do Tubo Puro (**TP**)), optamos por realizar todas as medidas na imagem da reconstrução do nervo inteiro, feita a partir da lâmina de número 7. Através do programa Image-Pro Plus, realizou-se as seguintes medidas: largura de tecido nervoso no início do tubo; largura de tecido nervoso encontrada a 1,5 mm de distância do início do tubo (zona de transição entre o final do bloco **a** e início do bloco **b**); e a menor largura encontrada no percurso do nervo.

Cada um destes dados foram transportados para o programa GraphPad Prism, para análise estatística.

Normalização dos dados obtidos a partir dos cortes transversais e longitudinais:

Para que fosse possível realizar uma análise estatística relevante dos parâmetros de medida dos nervos regenerados, seria necessário incluir no cálculo a média de todos os animais utilizados em nosso experimento. Como em cada grupo havia sempre 3 animais nos quais o nervo havia sido cortado transversalmente e 2 em que os cortes foram longitudinais, foi necessário selecionar algum parâmetro que pudesse ser comparado nos dois tipos de cortes. Concluimos que os seguintes parâmetros poderiam ser comparados:

- Medida do diâmetro do tecido nervoso obtida nos cortes transversais = **medida I**
- Medida da largura do tecido nervoso encontrado a 1,5 mm de distância do início do tudo nas reconstruções dos cortes longitudinais realizadas no centro ou lâmina 7 (parte mais larga) do nervo = **medida II**

Considerando que a manipulação dos cortes longitudinais é delicada, o que leva a uma perda errática dos cortes, não seria possível garantir que o corte reconstruído na lâmina 7 correspondia exatamente à região mais larga do nervo. Para corrigir este problema, aplicamos um fator de correção, definido para transformar a medida de largura obtida pela reconstrução de um corte longitudinal na lâmina 7 na medida correspondente à maior largura. Utilizamos a seguinte fórmula:

$$F_c = \frac{DTn}{LLn}$$

Onde F_c , o fator de correção, foi calculado dividindo-se o diâmetro do nervo normal (porção sem lesão) obtida no corte transversal (DTn) pela largura do nervo normal (sem lesão) obtida no corte longitudinal (LLn).

Em seguida o fator de correção foi multiplicado pela largura de tecido nervoso encontrado a 1,5 mm de distância do início do tudo, ou seja, pela medida II. Assim obtivemos duas medidas II corrigidas para cada grupo experimental e somamos com os três valores encontrados para as medidas I no mesmo grupo.

Com esta padronização pudemos ter os dados corrigidos e somar os 3 nervos transversais com os 2 nervos longitudinais, totalizando 5 nervos de cada grupo.

3.11 Teste Funcional do Ciático

Os camundongos foram avaliados 1, 3, 5 e 8 semanas após a transecção do nervo ciático esquerdo, obtendo-se os seguintes parâmetros da pegada das patas posteriores (direita e esquerda): a distância entre o primeiro e quinto dedos – espalhamento dos dedos (ED) e a distância entre a ponta do terceiro dedo e a parte mais posterior da pata em contato com o chão – comprimento da pegada (CP).

A avaliação foi realizada como descrita por Varejão *et al.* (2001) e Baptista AF *et al.* (2007). Os animais foram colocados em um corredor de acrílico (48 x 4,5cm) (**Figura 16**) com um espelho abaixo deste projetado em um ângulo de 45° (WESTERGA & GAMSBERG, 1990; VAREJÃO *et al.*, 2001). Inicialmente os animais foram deixados por cinco minutos dentro do corredor para ambientação. Quando eles paravam no final do corredor, eram adquiridas entre 5 a 6 fotos das patas, através do espelho, para posterior seleção de 3 fotos (câmera digital Sony,

Cybershot 7.2 megapixels DCS-W7). A câmera digital foi posicionada a 2,5cm de distância do espelho.

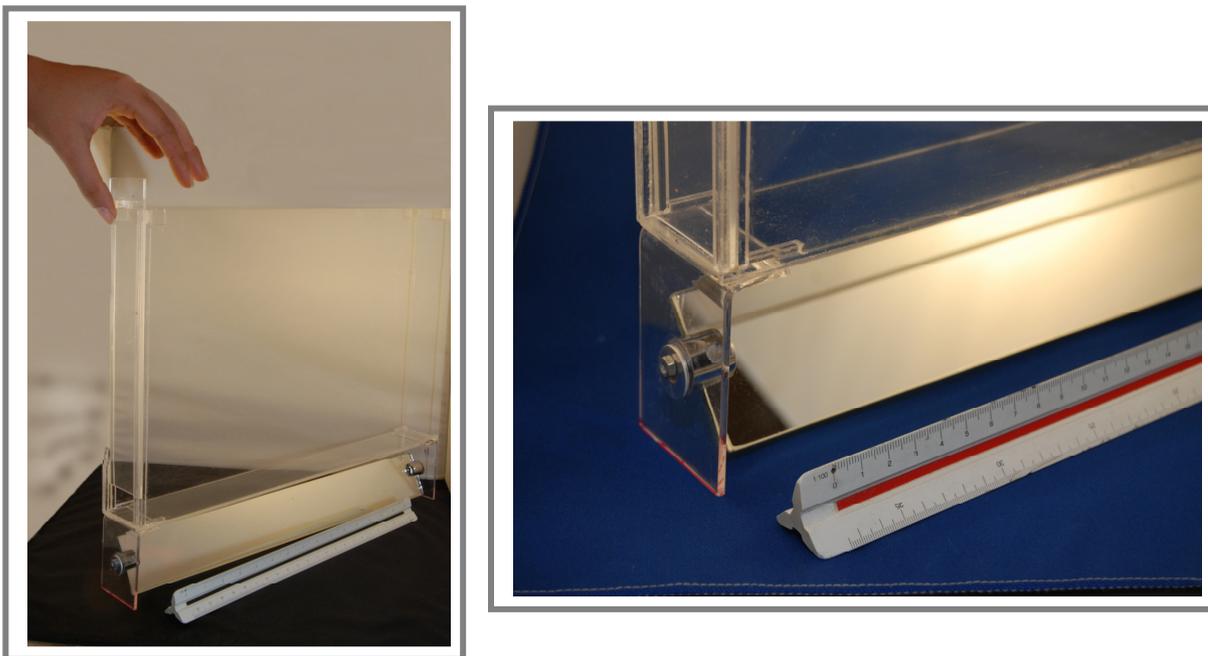


Figura 16. Aparato utilizado para o teste funcional. Corredor de acrílico (48 x 4,5cm) com espelho abaixo posicionado a 45°.

Através do programa Image J, National Institute of health, USA, as medidas de ED e CP foram calculadas, após calibração por um paquímetro escaneado (**Figura 17**). Os dados foram transportados para o programa Microsoft Office Excel, onde foi calculado o fator para cada parâmetro (ED e CP) através da seguinte fórmula: lesado - não lesado / não lesado. Desta forma o Fator ED = ED do lado lesado - ED do lado normal / ED normal e o Fator CP= CP do lado lesado - CP do lado normal / CP normal.

O Índice Estático do Ciático (SSI) dos camundongos foi calculado pela fórmula adaptada para camundongos (**101.3 x Fator ED - 54.03 x Fator CP- 9.5**), publicada por BAPTISTA AF *et al.*, 2007.

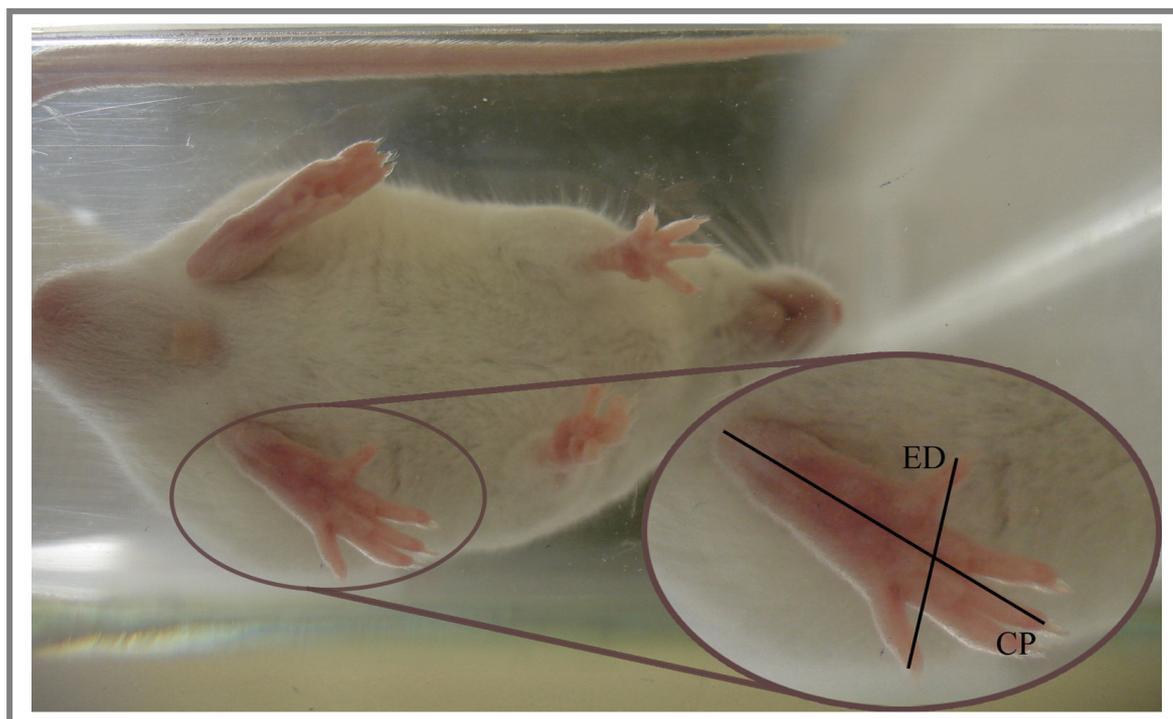


Figura 17. Fotografia das patas do camundongo obtida para realização das medidas do teste funcional. O detalhe evidencia as medidas de espalhamento dos dedos (ED) e o comprimento da pegada (CP).

O SSI foi analisado nos três grupos experimentais. Nos animais do grupo MA, a avaliação foi realizada com 1 semana (n=9), 3 semanas (n=9), 5 semanas (n=9) e 8 semanas (n=4) após o procedimento cirúrgico. Nos animais do grupo DMEM o teste funcional foi avaliado em 1 semana (n=8), 3 semanas (n=9), 5 semanas (n=9) e 8 semanas (n=4) após a transecção do ciático. E no grupo TP em 1 semana (n=5), 3 semanas (n=5) e 5 semanas (n=5) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Número de animais que participaram da avaliação funcional. MA = grupo com células mesenquimais adiposas; DMEM = grupo que recebeu DMEM; TP = grupo em que o tubo foi deixado puro; N= número de animais.

	GRUPO MA	GRUPO DMEM	GRUPO TP
1 SEMANA	N=9	N=8	N=5
3 SEMANAS	N=9	N=9	N=5
5 SEMANAS	N=9	N=9	N=5
8 SEMANAS	N=4	N=4	Não foram avaliados

3.12 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a análise estatística com auxílio do programa GraphPad Prism . Os dados primeiramente foram transportados para o Excel e depois exportados para o GraphPad Prism.

Os resultados das medidas dos nervos foram expressos sob a forma de média \pm desvio padrão. Os dados morfológicos foram analisados através de um teste One-Way ANOVA em conjunto com um Bonferroni Post-test para se verificar entre quais grupos existia a diferença significativa. Já os dados funcionais foram analisados por meio de um Two-Way ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Após as cirurgias, todos os animais evoluíram com rápida cicatrização da incisão cirúrgica. As feridas apresentaram-se com bordas bem coaptadas, sem sinais de infecção e/ou inflamação macroscópica. No dia seguinte ao procedimento cirúrgico, todos os animais apresentavam-se em bom estado geral, ativos e aceitando a dieta normalmente.

Não houve evidências de ulcerações no trajeto do nervo ciático até 5 semanas de sobrevida. Embora a avaliação sistemática relatada neste trabalho tenha se limitado ao tempo de cinco semanas após o procedimento cirúrgico, tivemos o acompanhamento de animais até cinco meses após lesão.

Após 8 semanas, ipsilateralmente à lesão, a maioria dos animais apresentou ulcerações cutâneas, ressecamento das unhas com aspecto amarelado e eventualmente autotomia dos dígitos. Com 11 semanas, foi possível observar que 3 de 6 animais (50%) do grupo experimental (células MA) apresentavam as ulcerações e todos os 6 (100%) do grupo controle (DMEM) possuíam tais características. Ficou evidente um maior número de animais com ulcerações no grupo controle (DMEM) quando comparados ao grupo que utilizou células mesenquimais de tecido adiposo. Após 5 meses nenhum animal do grupo MA apresentava estas alterações, enquanto que as mesmas persistiam no grupo controle DMEM.

Sob o ponto de vista macroscópico, foi possível observar, durante os procedimentos cirúrgicos e de excisão do nervo, a presença de segmentação (separação em fascículos) do nervo ciático do camundongo *BalbC*. Isso ocorreu desde a sua porção mais proximal e acentuou-se caudalmente (**Figura 18**). Muitas vezes a descrição da anatomia do nervo ciático demonstra que a divisão em fascículos ocorre na sua porção mais distal, quando se ramifica em nervo fibular e

tibial. Porém isso não foi observado no nervo ciático da maioria dos camundongos da linhagem *BalbC*. Microscopicamente, a divisão em fascículos é demonstrada na **figura 19**. Ela exhibe três fascículos do nervo na sua porção mais proximal, em corte transversal.



Figura 18. Macroscopia do nervo ciático do camundongo. Observam-se vários fascículos (diversas ramificações) do nervo desde a sua porção mais proximal à medula espinhal, até a parte mais distal.

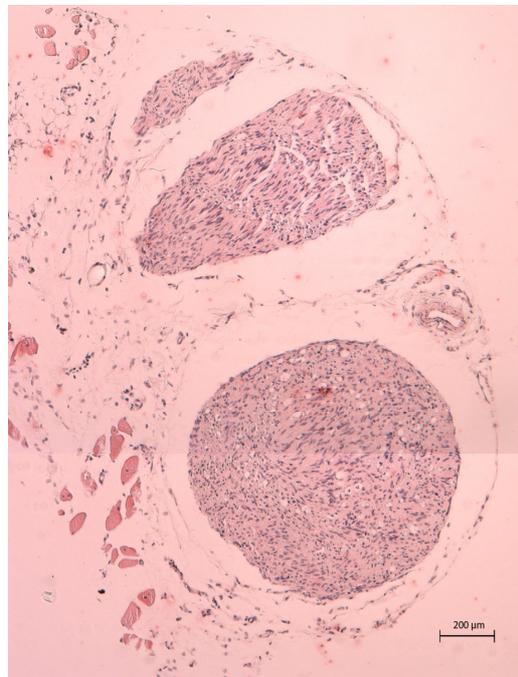


Figura 19. Corte transversal da porção proximal do nervo ciático do camundongo, evidenciando os três fascículos. Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). Barra: 200 µm.

4.1 Tubo de poli-3-hidroxibutirato (P3HB)

A aplicação de estruturas tridimensionais bio-reabsorvíveis como suporte temporário na engenharia de tecidos tem sido cada vez mais freqüente nos últimos anos. Neste trabalho foram utilizados tubos de P3HB para o procedimento de tubulização. Na análise por microscopia eletrônica de varredura, pôde-se observar a superfície externa com rugosidades acentuadas em toda a sua extensão, de forma homogênea. Como essa porção teve contato com o ar durante o processo de secagem, verificou-se um aspecto mais rugoso (**Figura 20**).

As **figuras 21A** e **21B** revelam a parte interna do tubo de P3HB. Essa região teve contato com o vidro do molde utilizado para confecção do tubo, e por isso apresenta-se com um aspecto menos anfractuoso que a superfície externa. Observaram-se também projeções que provavelmente se formaram durante a secagem da solução do bioplástico ou durante a remoção do tubo do vidro. A **figura 21C** mostra o tubo em corte transversal e a **figura 21 D** exibe um corte sagital do P3HB, observando-se a parte mais lisa acima, que corresponde à superfície interna, e a parte mais rugosa abaixo, referente à porção externa.

Após cinco semanas de sobrevida, os tubos de P3HB foram retirados do interior da perna do animal e facilmente manipulados, não sendo observado tecido fibrótico ao seu redor. Além disso, ficou evidenciado em experimentos preliminares que a biodegradação total não ocorreu até 5 meses após tubulização (dados não mostrados).

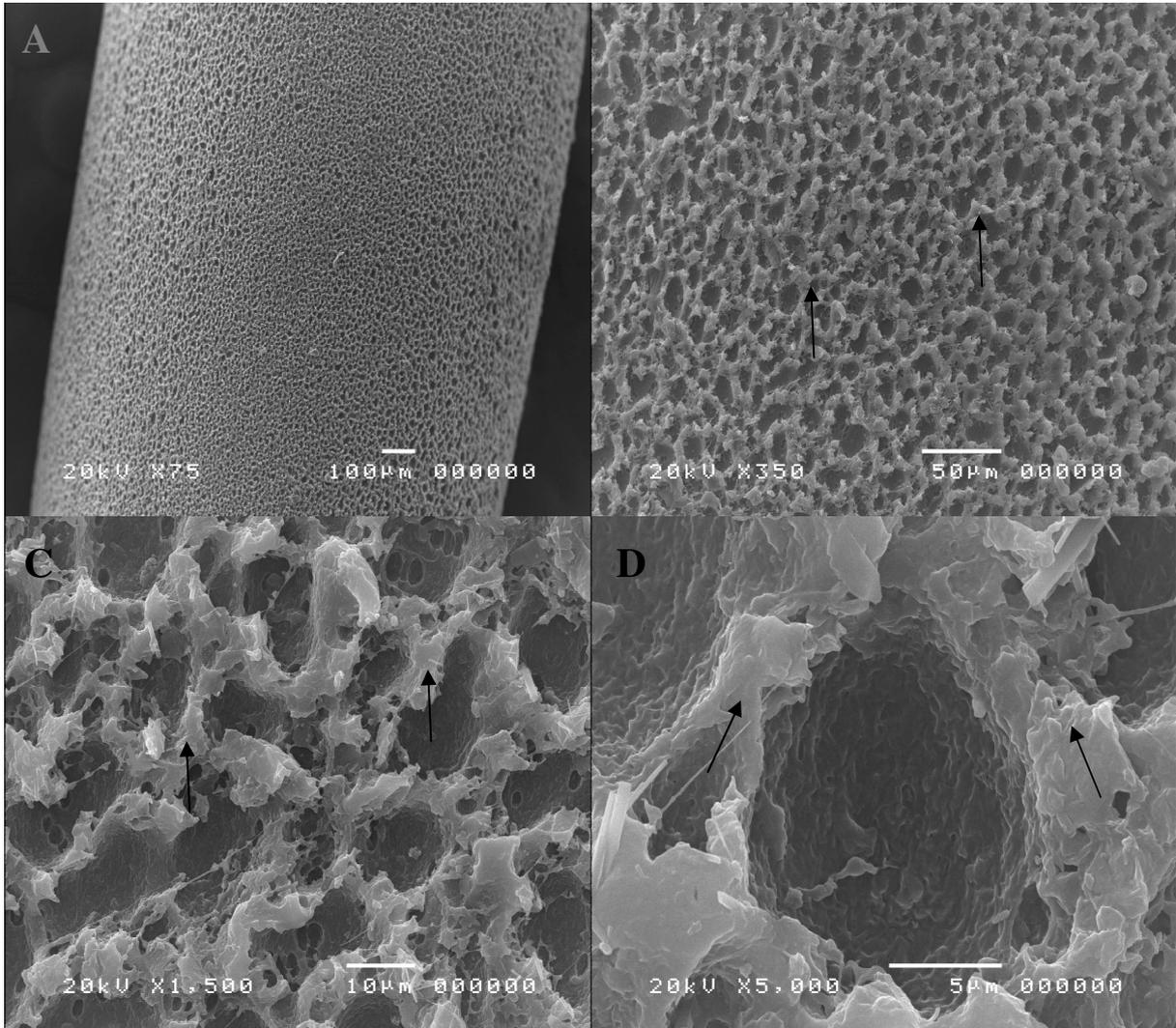


Figura 20. Micrografias eletrônicas de varredura da superfície externa do tubo de Polihidroxibutirato (P3HB), demonstrando o aspecto rugoso (setas). Barras: A=100 μm, B=50μm, C=10 μm, D=5 μm.

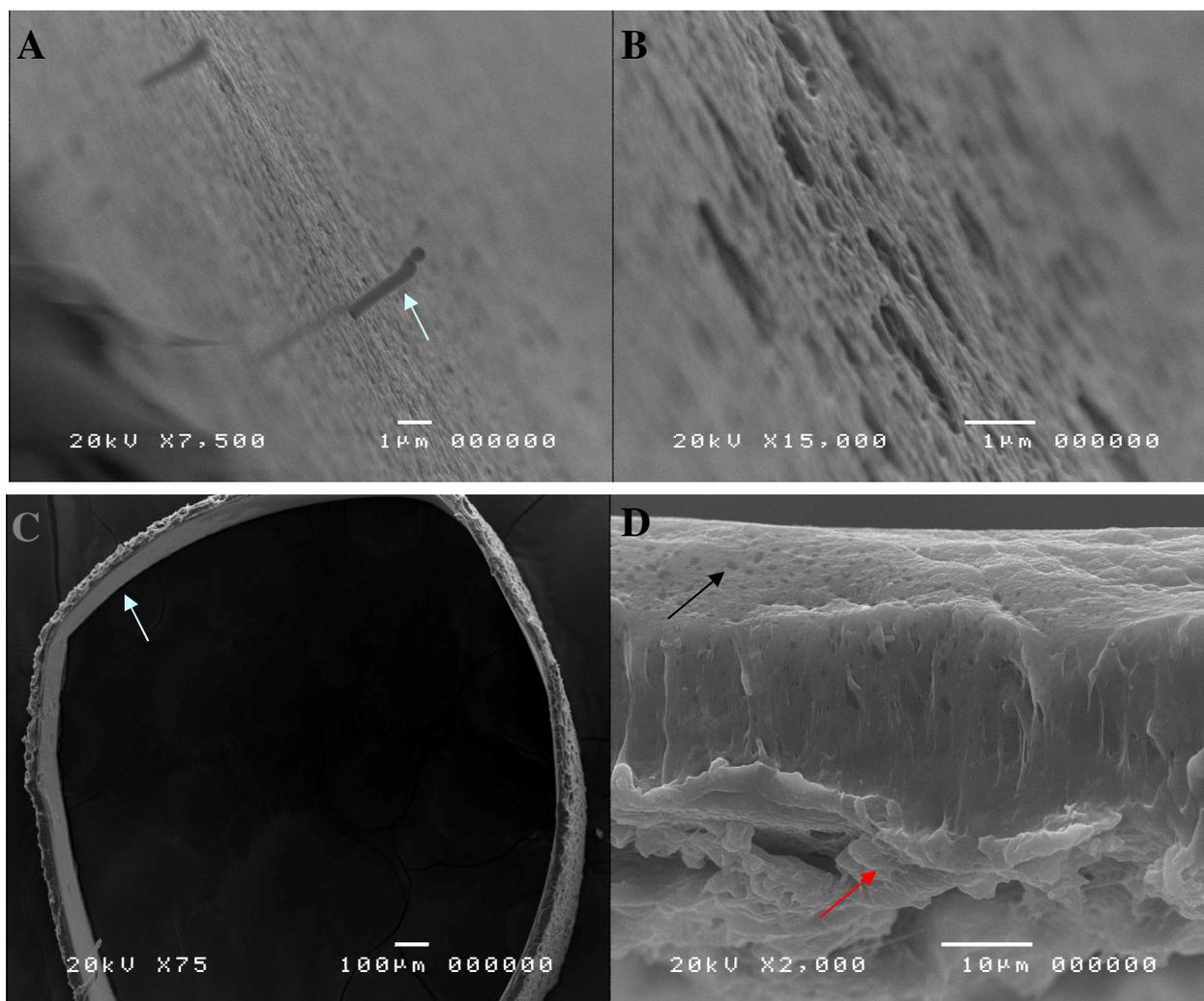


Figura 21. Micrografias eletrônicas de varredura do tubo de Polihidroxibutirato (P3HB), demonstrando a superfície interna do tubo em (A) e (B) com algumas projeções (seta). (C) mostra a vista transversal do tubo notando-se que a superfície interna é menos anfractuosa que a superfície externa (seta) e (D) demonstra a região interna mais superiormente (seta preta) e a região externa do tubo mais inferiormente (seta vermelha), em corte transversal. Barras: A e B=1 μm, C=100 μm, D=10 μm.

4.2 Testes Funcionais

Os resultados demonstraram que todos os animais pioraram a sua funcionalidade, no decorrer do tempo de 1, 3 e 5 semanas, indicados pelos valores mais negativos do SSI no gráfico. A condição normal é próxima ao zero. Nenhum dado mensurado mostrou diferença significativa na análise estatística ($p>0,05$) (**Figura 22**).

Considerando a avaliação do índice intra-grupo no decorrer das semanas de avaliação, o grupo MA apresentou piora progressiva até a quinta semana, mas da quinta para a oitava notou-se uma melhora do quadro, ao contrário, no grupo DMEM, no qual não foi observada melhora em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 22**).

Na análise inter-grupos, o MA apresentou melhor desempenho da atividade funcional na primeira semana, enquanto que o grupo TP alcançou os valores mais negativos do índice funcional em todas as semanas, indicando pior qualidade da função (**Figura 22**).

Recuperação Funcional durante 8 semanas

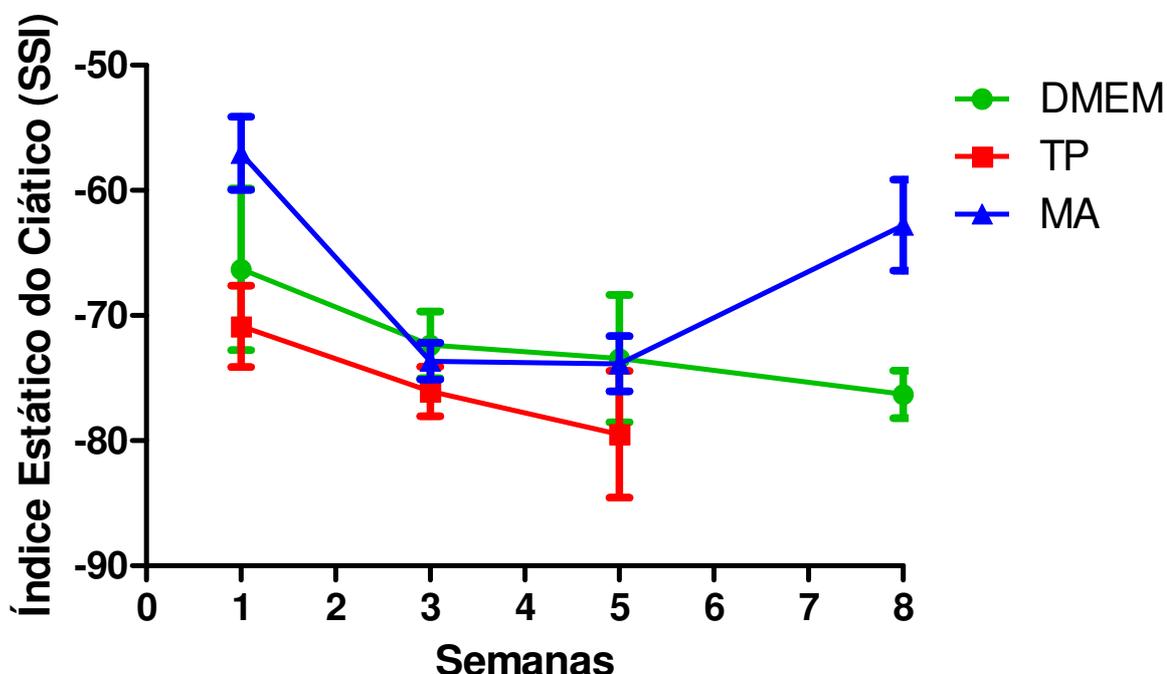


Figura 22. Gráfico do Índice Estático do nervo ciático (SSI) com desvio padrão ao longo de oito semanas. A medida do índice foi realizada conforme descrito na seção de metodologia. A análise quantitativa da recuperação da função em todos os grupos revelou a piora 1, 3 e 5 semanas após a transecção, representada pelos valores mais negativos. Na primeira semana o grupo MA possuía o melhor índice funcional e na oitava semana nota-se discreta melhora, enquanto que o DMEM continuou piorando. O grupo TP possuiu o pior índice funcional em todas as semanas. Na oitava semana houve melhora aparente do índice no grupo MA quando comparado com o DMEM. Não houve diferença estatística significativa em nenhum dos grupos ($p > 0,05$).

4.3 Observação morfológica

Após o trauma, inicia-se uma seqüência de eventos que ocorrem durante o processo de regeneração do nervo dentro do tubo, que podem ser organizadas em cinco principais fases: resposta pós-traumática; migração de células e processo celular dentro do tubo; diferenciação de elementos vasculares, gliais e neuronais, crescimento e mielinização axonal. Essas fases são interdependentes e sobrepõem-se cronologicamente.

Após cinco semanas da neurotmesa, observou-se, com auxílio do microscópio estereoscópio (lupa), que houve reparo do tecido neuronal com preenchimento total do espaço entre os dois cotos de todos os grupos (**Figura 23 A e 23 B**). A **figura 23 C** mostra cortes da região do epicentro da lesão (segmento “B”) nos três grupos experimentais.

A coloração HE permitiu visualizar o processo de degeneração neuronal causado pelo trauma, incluindo o processo inflamatório e degeneração dos axônios. Esses processos podem ser observados em todos os grupos, havendo alguma variação apenas em sua extensão. Após 5 semanas, observou-se que o processo inflamatório era principalmente marginal, mais próximo ao tubo ou próximo do ponto de sutura. Além de axônios maduros, notou-se a presença de macrófagos espumosos por entre o tecido regenerado, cuja identidade foi posteriormente confirmada pela marcação com F4 80 (ver adiante) (**Figura 24 A**). Observa-se ainda a presença de inflamação mononuclear (**Figura 24 A**) e com eosinófilos (**Figura 24 B**) e um intenso processo de neovascularização (**Figuras 24 C**).



Figura 23. Vista macroscópica e microscópica do nervo ciático do camundongo após 5 semanas da neurotome. (A e B) Fotografias do tubo contendo o nervo ciático conectado com os cotos proximais (à direita) e distais (à esquerda) e o tecido nervoso mais fino no interior do tubo (chave). O tecido esbranquiçado no interior do tubo sugere a regeneração de um coto ao outro. A seta indica local da sutura do coto proximal. **(A)** Grupo de células mesenquimais adiposas (MA) e **(B)** grupo do tubo puro (TP). **(C)** Micrografias de cortes transversais da região do epicentro da lesão (segmento “B”) com imunomarcacão contra S100. Da esquerda para direita: grupo MA, grupo DMEM e grupo TP. Barra 200 μm .

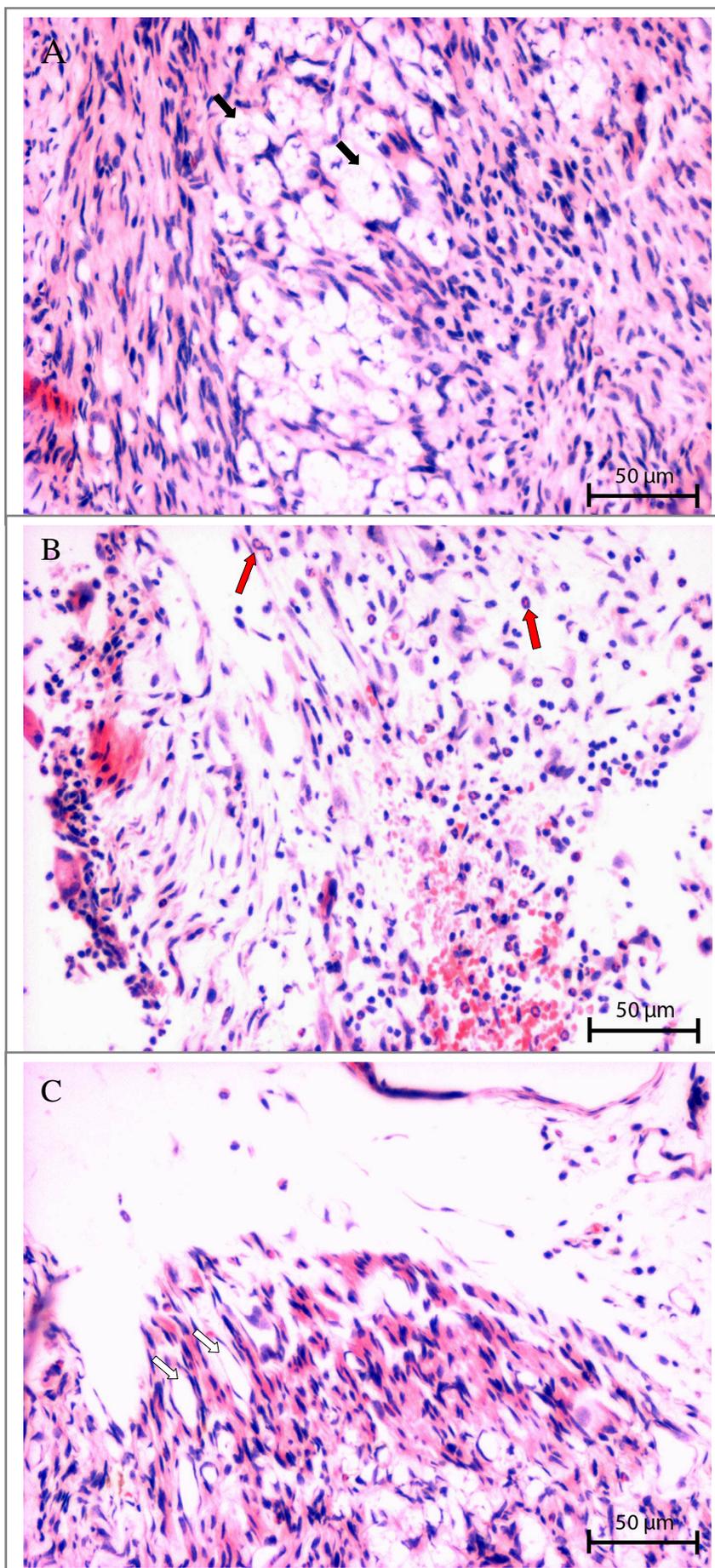
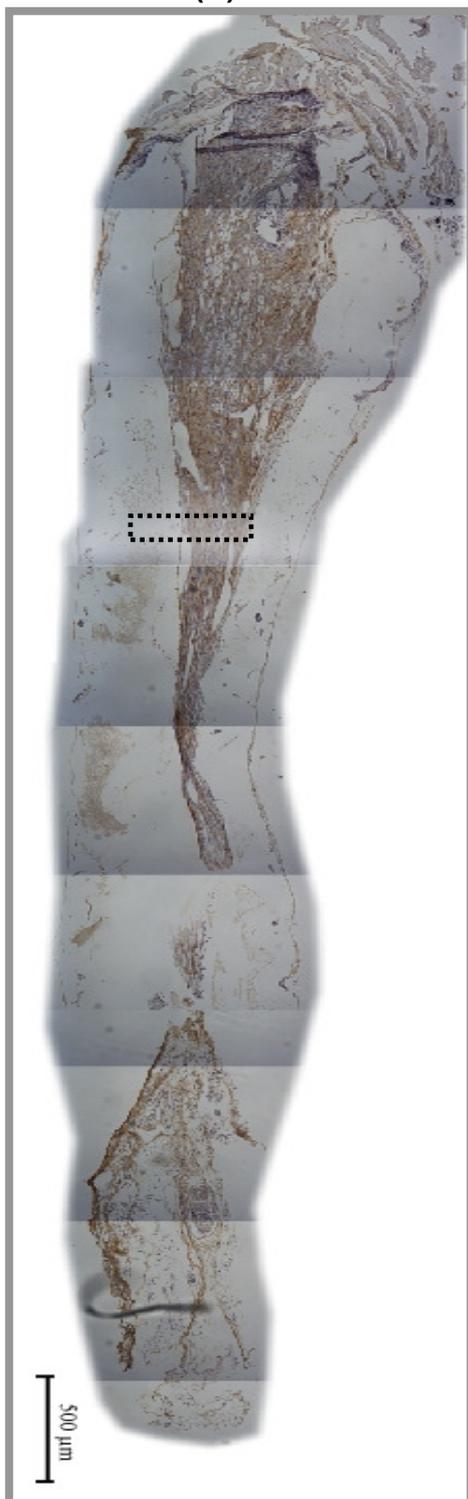


Figura 24. Resposta pós-traumática do nervo ciático, evidenciada pelo processo inflamatório e degenerativo. **(A)** amostra de um campo com uma região central caracterizada pela presença de células de Schwann e axônios (seta preta). No mesmo campo a direita observa-se um processo inflamatório enquanto que à esquerda algumas fibras nervosas associadas ao tecido conjuntivo; **(B)** presença de eosinófilos (seta vermelha) e processo hemorrágico; **(C)** neoformação de vasos (seta branca). Coloração HE, Barra: 50 µm.

Numa análise de uma montagem dos cortes seriados longitudinais, pôde-se observar a espessura e comprimento do nervo ciático, após 5 semanas da transecção. Verificou-se que, em todos os três grupos estudados, o coto proximal alcançou o coto distal (**Figuras 25 A, B e C**). Comparando-se a regeneração do nervo nos diferentes grupos, sempre na mesma altura, notou-se que o grupo DMEM aparentemente exibia o nervo com calibre maior. Porém, nas análises microscópicas dos cortes histológicos corados pela HE, observou-se um tecido mais frouxo, sem aparente formação de estruturas características de tecido nervoso periférico, exibindo também células dispersas (**Figura 25 E**). No grupo MA, observou-se uma organização compatível com um processo de regeneração nervosa normal (**Figura 25 D**). No grupo TP, observou-se reconstituição aparente do nervo, porém com diâmetro menor (**Figura 25 F**). Histologicamente, notou-se que o tecido regenerado neste grupo formava estruturas nervosas distribuídas irregularmente, associadas a processo inflamatório e neoformação vascular (**Figura 25 F**).

Numa tentativa de descrever com maior detalhe os diferentes tipos celulares envolvidos na reação inflamatória, realizamos uma avaliação da ocorrência de eosinófilos, tendo em vista que sua presença foi notada em todos os grupos, já na coloração HE. Para tanto, foi realizada a coloração com o Sirius Red para eosinófilos, específica para identificação dessas células. Nossos resultados não mostraram diferenças entre os grupos (**Figuras 26 A, B, C**).

(A) MA



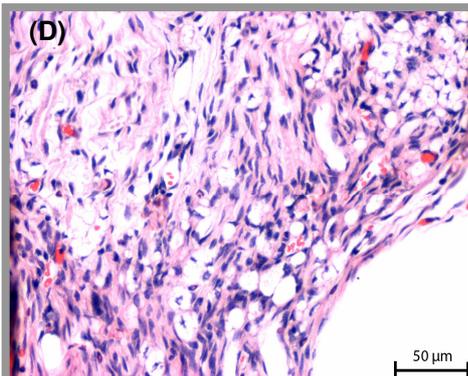
(B) DMEM



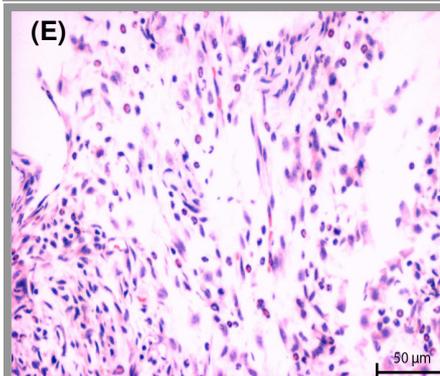
(C) TP



(D)



(E)



(F)

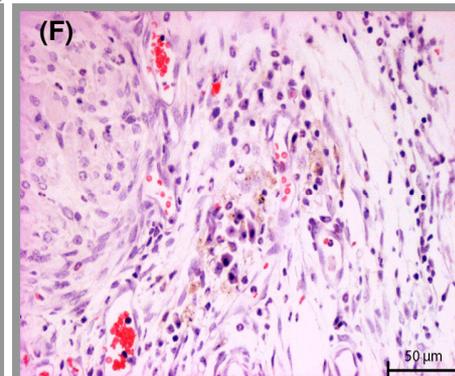


Figura 25. Fotomicrografias de cortes longitudinais do nervo ciático em HE. Reconstruções representativas dos nervos encontrados no grupo MA (A), grupo DMEM (B) e grupo TP (C). O espaço deixado no procedimento cirúrgico foi preenchido nos três grupos após 5 semanas. Abaixo, fotomicrografias em detalhe do tecido referente à área indicada, verificando-se um tecido menos compactado no grupo DMEM (E) se comparado aos grupos MA (D) e TP (F). Barras: 500 μm (montagens dos cortes longitudinais) e 50 μm .

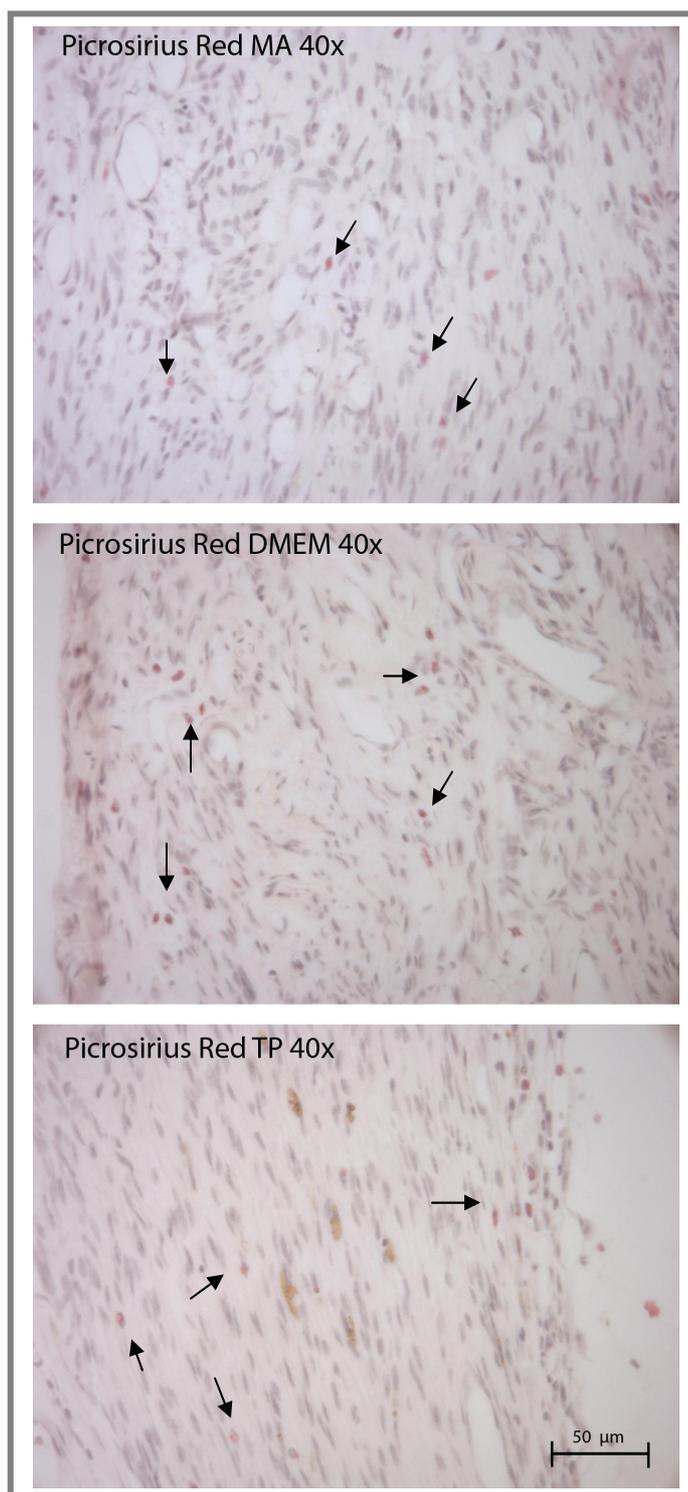


Figura 26. Coloração com Picrosirius Red para eosinófilos. As figuras mostram cortes longitudinais nos três grupos (MA, DMEM e TP) evidenciando poucos eosinófilos (setas pretas), com distribuição semelhante nos três grupos. Barra: 50μm.

4.4 Identificação de tipos celulares por imunohistoquímica

Para a identificação do endotélio capilar, utilizamos a lectina Griffonia, (*Bandeiraea simplicifolia*) tendo em vista sua já conhecida reatividade para o endotélio capilar de camundongos (ALROY *et al.*, 1987). O endotélio dos vasos capilares se mostrou reativo, demonstrando a neoangiogênese nestes tecidos em regeneração (**Figura 27 A e B, setas vermelhas**). Além do endotélio, a lectina evidenciou a presença de células espumosas (macrófagos), que exibiram reatividade na membrana (**Figura 27 A e B, setas pretas**).

Para identificar a presença de macrófagos ativados, utilizou-se o anticorpo F4/80. Observamos que a reatividade para F4/80 foi vista em macrófagos situados tanto na região perivascular como na periferia dos nervos em regeneração, assim como em algumas células espumosas (**Figuras 27 C e D**). Este padrão de marcação é mostrado em detalhe na Figura 27 para um animal do grupo MA, porém este padrão foi similar em todos os grupos (**Figura 28**).

Para identificar a presença das células de Schwann, nesse processo de regeneração, utilizou-se o anticorpo anti-S100. A imunoreatividade para S-100 evidenciou o retorno da estrutura normal do nervo periférico em regeneração, aspecto melhor visto no grupo MA, em comparação com os grupos DMEM e TP (**Figuras 29 A, B e C**). No grupo DMEM observou-se, na mesma região, a falta de regeneração/reorganização do tecido nervoso periférico (**Figura 29 B**). No grupo TP observou-se manutenção do processo inflamatório na extremidade distal do coto proximal (**Figura 27C**).

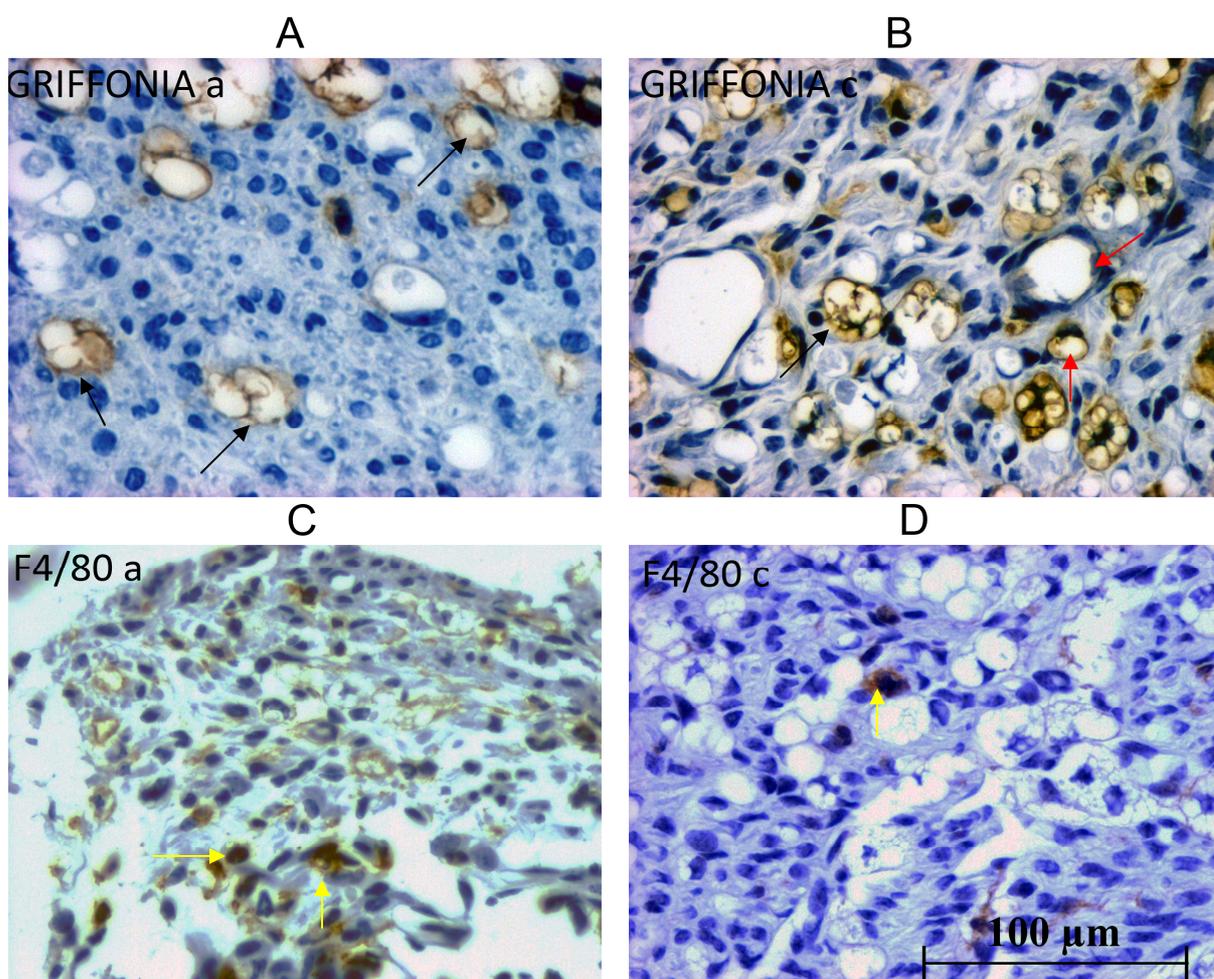


Figura 27. Imunomarcção com Griffonia e F4/80. Cortes transversais dos segmentos a (porção proximal à lesão) e c (porção distal à lesão). As figuras **A** e **B** (Griffonia) evidenciam marcação das células espumosas macrófagicas (setas pretas) e vasos (setas vermelhas). **C** e **D** marcações com o F4/80, revelando principalmente macrófagos ativados (setas amarelas).

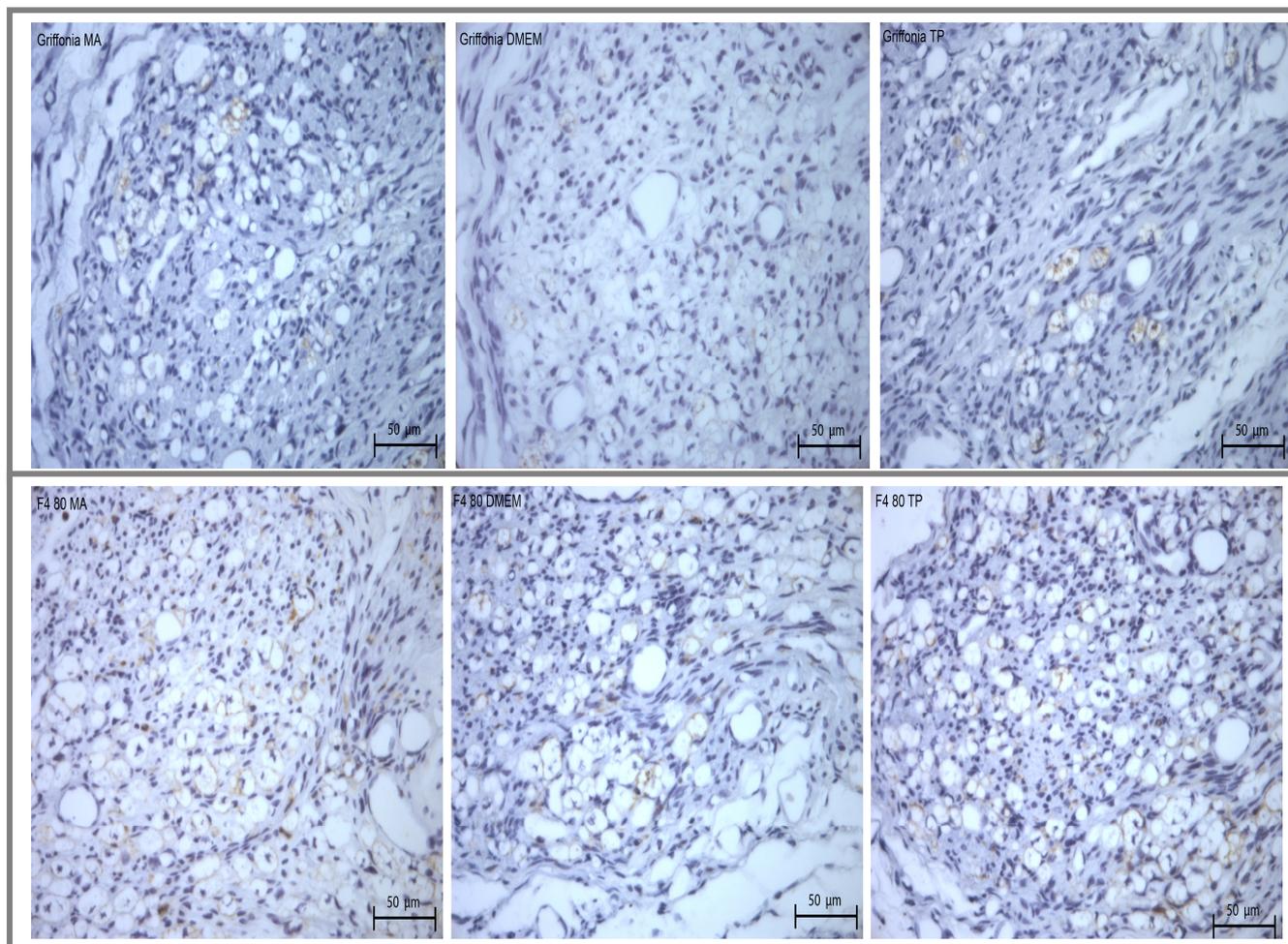


Figura 28. Imunomarcção com Griffonia e F4 80. Cortes transversais mostrando similaridade entre os grupos MA (esquerda), DMEM (meio) e TP (direita). Há marcação parecida entre os dois anticorpos utilizados neste tecido em processo de regeneração. Barra: 50 µm.

4.5 Quantificação da área, diâmetro e largura do nervo regenerado

As larguras dos nervos seccionados longitudinalmente foram mensuradas na região da menor largura do nervo na área regenerada e representados no histograma mostrado na **Figura 30**. O grupo TP apresentou as menores medidas, porém não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (**Figura 30**).

Nas medidas dos nervos em cortes transversais, o grupo MA apresentou nervo regenerado com maior área de tecido nervoso, enquanto que o grupo TP, a menor área. O grupo DMEM obteve uma área total maior que a área de tecido nervoso encontrado (**Figura 31**). Contudo, os dados não foram estatisticamente significativos, provavelmente em função do pequeno número de animais avaliados.

O diâmetro médio dos nervos dos animais nos diferentes grupos foi calculado e representado em gráfico, de forma individualizada (**Figura 32 A**). Os animais do grupo DMEM exibiram aumento do tecido não neural no segmento regenerado, o que não ocorreu nos demais grupos (**Figura 32 A**). Quando se comparou a média dos diâmetros dos diferentes grupos, verificou-se que o grupo MA apresentou tanto o diâmetro total do segmento quanto do tecido neural presente maior que o do grupo TP, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Houve também diferença entre DMEM e TP ($p < 0,01$), porém o diâmetro total ou do tecido neural presente no grupo MA não foi diferente que o visto nos animais do grupo DMEM ($p > 0,05$). (**Figura 32**).

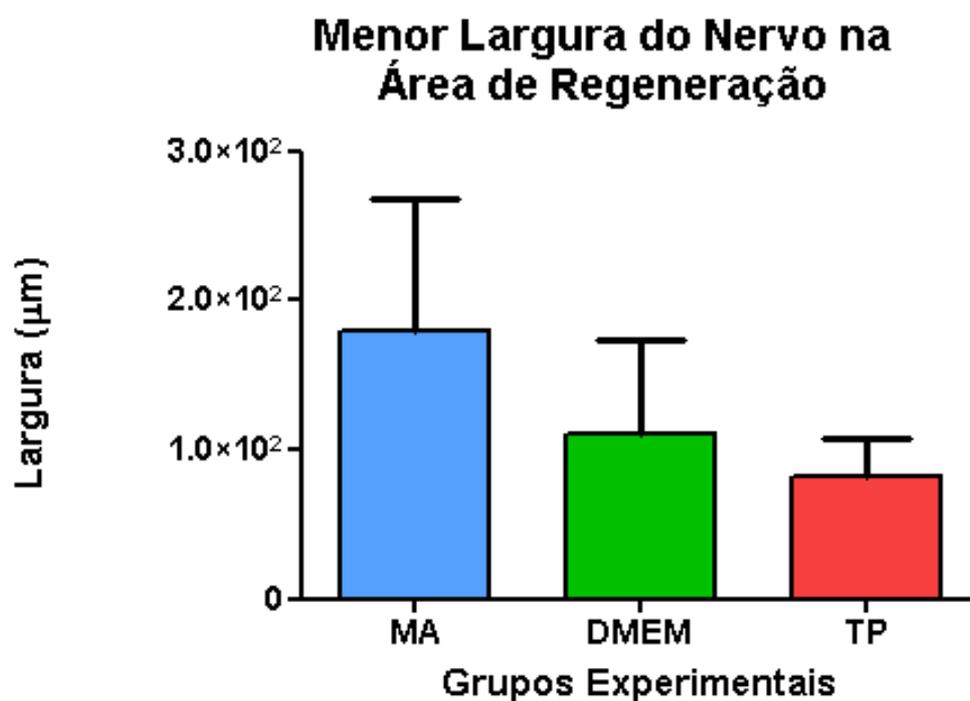


Figura 30. Medidas dos cortes longitudinais dos nervos em regeneração. Análise quantitativa das medidas das menores larguras dos nervos em corte longitudinal. As larguras foram medidas e dispostas sob a forma de média e desvio padrão ($p > 0,05$).

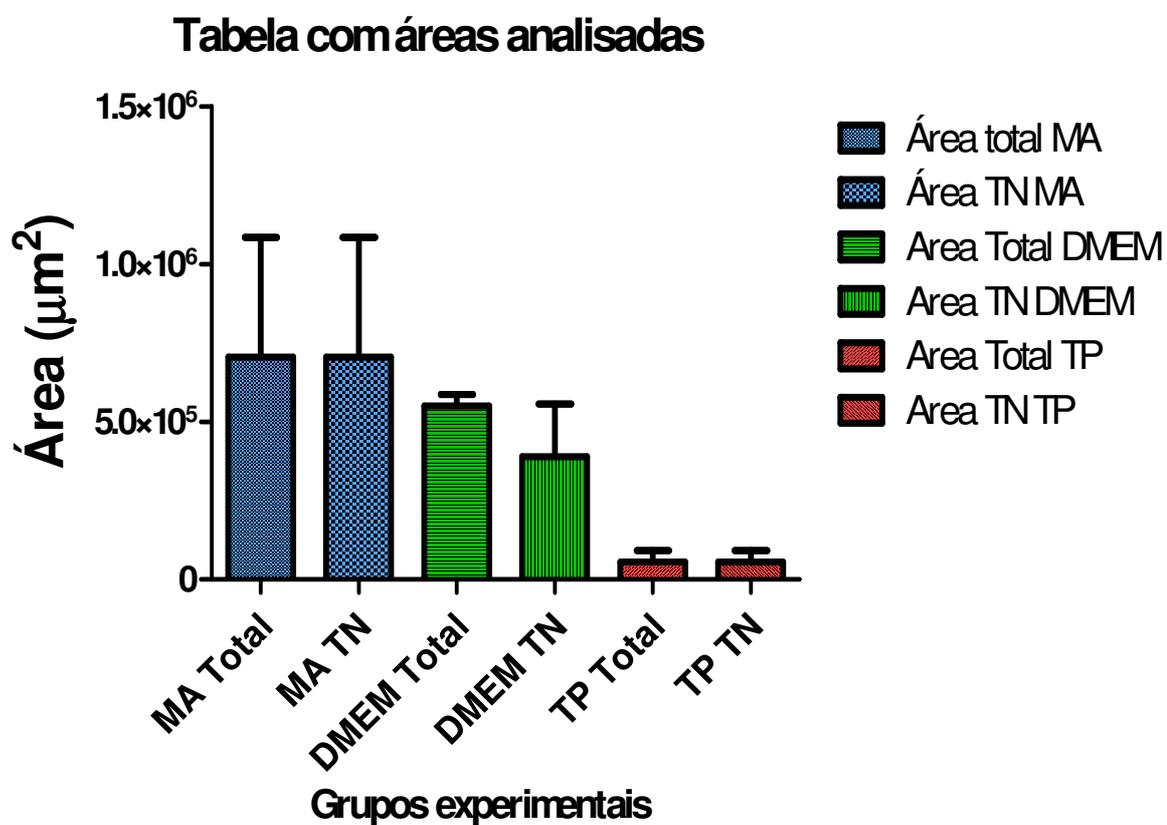


Figura 31. Medidas das áreas dos cortes transversais dos nervos em regeneração. Análise quantitativa onde o gráfico mostra as médias das áreas de tecido total e tecido nervoso (TN) nos três grupos, evidenciando menores áreas no grupo TP, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Análise dos diâmetros do nervo ciático

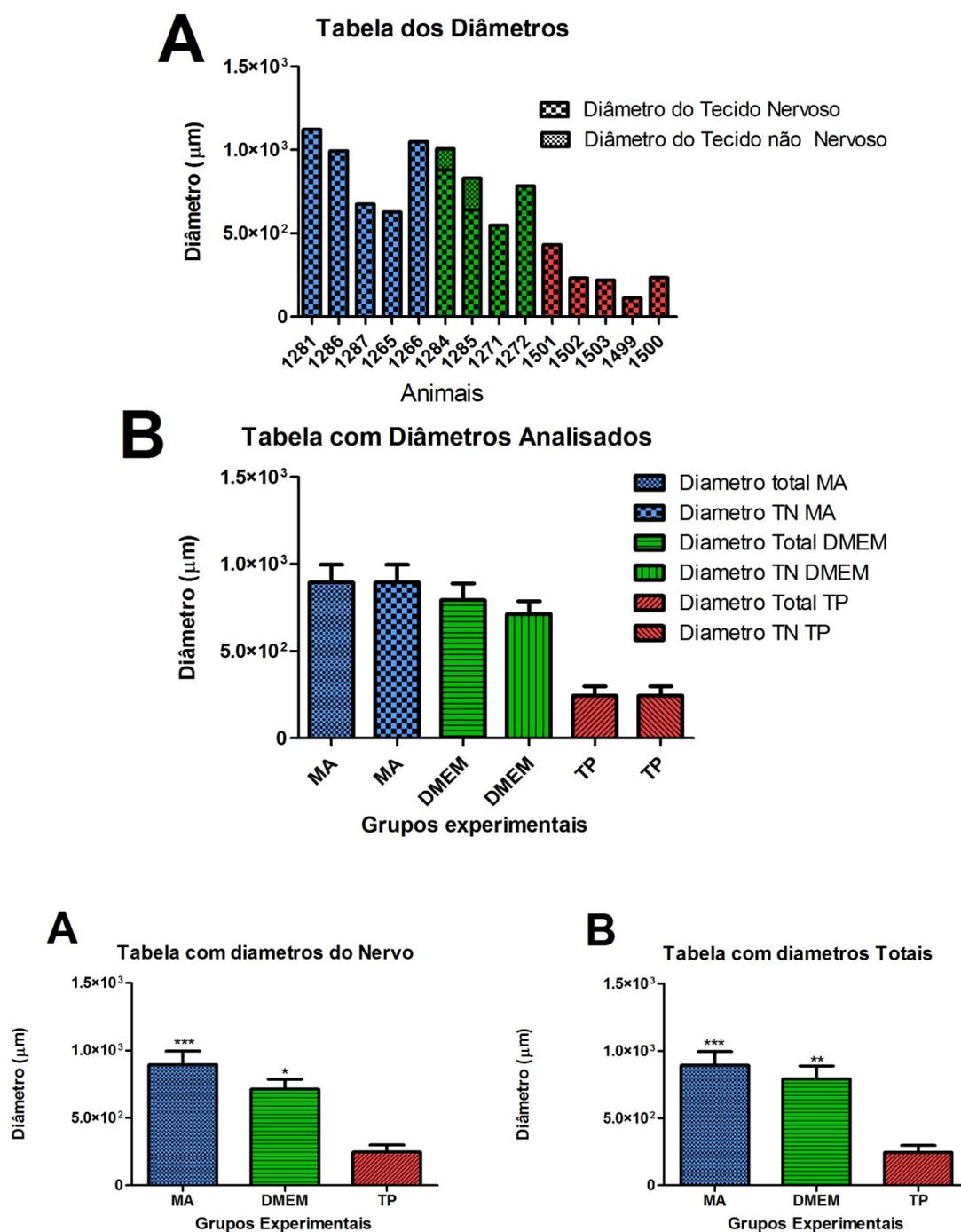


Figura 32. Diâmetros de tecido total e de tecido nervoso. Asteriscos representam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo TP. ***($P < 0,001$); **($P < 0,01$); *($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta dissertação primeiramente confirmam nossa expectativa inicial de que a regeneração do nervo ciático de camundongos após cinco semanas da secção completa e tubulização ocorreria espontaneamente. Nossos resultados sugerem que a utilização de próteses tubulares de P3HB, associada ao enxerto de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo, podem promover benefícios aditivos na regeneração.

Após a lesão, o crescimento axonal pode ocorrer pela capacidade de regeneração espontânea do SNP (BRECKNELL & FAWCETT, 1996; FU & Gordon, 1997). Porém, o brotamento nervoso pode ser deficiente nas transecções completas, quando a perda extensa de tecido está envolvida. Nesses casos, o procedimento cirúrgico é essencial para a recuperação, e as técnicas que utilizam uma prótese tubular têm sido amplamente utilizadas, pela sua capacidade de atuar como “guia” e facilitar a regeneração. Usando um conduto, pode-se evitar a necessidade de remoção de um segmento do nervo e a perda de função do local doador, que é o caso das técnicas de enxertos autólogos.

Uma variedade de materiais tem sido empregada para fabricação desses tubos (LANGONE *et al.*, 1995; BARAÚNA *et al.*, 2007; PFISTER *et al.*, 2007; PANSERI *et al.*, 2008). Verificou-se neste estudo que, com a utilização do tubo de poli-3-hidroxibutirato (P3HB), o tecido nervoso regenerado se mostrou íntegro, sem tecido fibrótico. Os tubos de P3HB foram explantados facilmente, não sendo evidenciadas aderências nos músculos subjacentes, parecendo realmente haver biocompatibilidade do biomaterial. De acordo com Hazari *et al.* (1999), o PHB apresenta baixa reação para macrófagos quando comparada aos enxertos autólogos de nervo. Observamos, contudo, que o processo inflamatório e a reação para

macrófagos foram mais evidentes na zona marginal, próximo à parede do tubo, e sempre mais pronunciados nos cortes superficiais.

Além disso, o tecido regenerado após cinco semanas da transecção apresentava-se, na sua maioria, alinhado ao eixo longitudinal do tubo. Da mesma forma, Mohanna *et al.* (2003), observaram que as fibras nervosas regeneradas do nervo fibular do rato ficaram alinhadas e paralelas ao longo do eixo de um conduto de PHB.

Os parâmetros sobre as propriedades da superfície, porosidade e biodegradação afetam a interação célula-substrato e/ou a comunicação com o meio externo ao conduto (AHMED *et al.*, 2004). A utilização de materiais biodegradáveis na tubulização é importante para evitar um segundo procedimento cirúrgico para a retirada do tubo e impedir forças constrictivas nas fases tardias da regeneração. O tubo de P3HB não foi totalmente degradado até cinco meses após a tubulização em nossos experimentos (dados não mostrados). Acredita-se que a degradação total desse biomaterial ocorra num período entre 18 a 24 meses (HAZARI *et al.*, 1999). A biodegradação completa ocorrerá após o processo de reparo ter-se completado, o que se constitui em um fator positivo para a utilização desse biomaterial na terapia de tubulização. De fato, a reabsorção completa do material não deve acontecer antes que se complete o processo de regeneração, porque isso é desfavorável para a regeneração e reorganização das fibras nervosas, podendo haver formação de tecido fibroso (ALDINE *et al.*, 1996). Porém, é desejável que o processo de biodegradação do tubo aconteça paralelamente ao de regeneração. De acordo com a revisão realizada por Fields *et al.* (1986) o completo processo de regeneração do nervo ciático do rato após transecção completa e tubulização só ocorre no período de um ano.

Outra característica do P3HB é a sua semi-permeabilidade, permitindo que haja trocas de nutrientes com o meio extracelular. As células não-neuronais do local da lesão podem reagir ao trauma pela liberação de nutrientes e fatores de crescimento na região, o que pode favorecer ao processo de regeneração (RODRIGUEZ *et al.*, 1999). Aebischer *et al.* (1988) mostraram que a regeneração ocorreu até 8 semanas com o uso de tubos permeáveis mesmo na ausência do coto distal, indicando que substâncias originadas não apenas do coto distal mas também do ambiente extra-neuronal poderiam ser benéficas na regeneração.

Após a transecção de nervos periféricos, a regeneração de uma lesão extensa ocorre de forma gradual, sendo a velocidade de reinervação do coto distal variável. No modelo de lesão de nervo ciático em camundongos, a reinervação pode ser observada já nas primeiras semanas, mas a reinervação total não se completa até seis semanas de sobrevivência (PEREIRA-LOPES *et al.*, 2006). Deve ser enfatizado, contudo, que a recuperação funcional de nervos periféricos requer não apenas a regeneração do tecido nervoso na área de lesão, mas também o crescimento dos axônios até o segmento distal e a chegada na sua terminação original (CHAMBERLAIN *et al.*, 2000 *apud* AHMED *et al.*, 2004).

Os testes funcionais são bastante utilizados para avaliar o processo de regeneração nervosa periférica (PEREIRA-LOPES *et al.*, 2006; MEEK *et al.*, 2007, PANSERI *et al.*, 2008), pois são capazes de avaliar diretamente a função locomotora. Neste trabalho, optamos por utilizar o Índice Estático do Ciático (SSI), que consiste na aquisição de fotos das patas do animal na posição estática e posterior mensurações do espalhamento dos dedos (ED) e do comprimento da pegada (CP). Este teste consiste num método simples e de baixo custo, além de possuir maior precisão das medidas obtidas quando comparadas ao Índice de

Função do Ciático (SFI) (BAPTISTA AF *et al.*, 2007). A alteração da relação entre comprimento e largura da pata ocorre principalmente nas lesões totais do nervo, onde, devido à denervação e conseqüente perda da atividade muscular, as patas dos animais sem ação da musculatura intrínseca do pé assumem uma posição de garra (MEEK *et al.*, 2007). Em conseqüência, há comprometimento da forma das pegadas no método de impressão das patas utilizado no SFI, especialmente nas primeiras semanas após a lesão. Além disso, a velocidade do ato de andar também pode interferir na impressão das pegadas (DeMEDINACELLI *et al.*, 1982; BERVAR, 2000).

O SSI foi recentemente adaptado para camundongos a partir da formulação original feita em ratos (BAPTISTA A.F *et al.*, 2007) e mostrou alta correlação com o SFI. A fórmula adaptada foi empregada para os cálculos neste trabalho. Os nossos resultados mostraram uma piora da função após uma, três e cinco semanas em todos os três grupos experimentais, sendo que o grupo TP apresentou os piores índices. Em 1996, Marques *et al.* examinaram a morfologia do músculo extensor longo dos dedos após transecção total e tubulização de camundongos. Observaram que, após duas semanas, este músculo apresentava-se totalmente denervado e que após a quarta semana iniciava-se o processo de reinervação. Somente após a décima segunda semana todas as junções neuromusculares estavam reinervadas. Já IJkema-Paassen *et al.* (2002) mostraram que a reinervação completa acontecia com 21 semanas nos músculos gastrocnêmio e sóleo. Isso pode justificar a piora que ocorre nas primeiras semanas após a neurotmesa.

Esses dados nos levam a inferir que nossa avaliação ainda ocorreu numa fase precoce da regeneração e remielinização. Experimentos com maior tempo de sobrevivência poderiam mostrar os ganhos funcionais adicionais obtidos. Melo *et al.*

(2001) também observaram que a função motora só começa a retornar a partir da oitava semana após a lesão. Os nossos resultados funcionais revelaram também que, na oitava semana após a lesão, o grupo MA apresentou melhora da função, diferente do grupo DMEM, que continuou piorando. Embora nossos dados não tenham valor estatístico significativo, necessitando de um maior número de animais, nossas avaliações morfológicas do nervo regenerado em estudos piloto de animais de sobrevivência longa dariam suporte a uma melhoria da função em tempos mais longos.

Na análise da morfologia da região regenerada, as colorações com HE permitiram identificar alterações concernentes ao processo de degeneração e regeneração. Em todos os grupos foi possível observar a presença de reação inflamatória localizada, degeneração axonal, vacuolização e neovascularização. Esse perfil histológico é compatível com as lesões induzidas por compressão e por transecção do nervo periférico (FIELDS *et al.*, 1987; LANGONE *et al.*, 1995; MURAKAMI *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005).

Para melhor caracterizar o processo inflamatório e de regeneração foi implementada a coloração com Picrosirius-Red e imunomarcações. O Sirius Red cora os eosinófilos, havendo claras identificações dessas células tanto em tecido do colo cervical do útero (WEHREND *et al.*, 2004) quanto no SNP (VIOTT *et al.*, 2007). Essas células são típicas das reações imunes mediadas por IgE e das infecções parasitárias, e o seu recrutamento envolve extravazamento do sangue e migração tecidual. O nosso estudo revelou a presença de eosinófilos esparsos no tecido em regeneração, com predominância nas áreas nas bordas do tecido, próximas ao tubo e no local da sutura do nervo ao tubo. Não foi verificada diferença entre os grupos estudados.

Para verificar o processo de formação de novos vasos após o período de 5 semanas do procedimento cirúrgico, utilizamos como marcador de células endoteliais a histoquímica para a lectina *Griffonia simplicifolia*, (BS-I) biotinizada. O endotélio vascular, apesar de ter uma morfologia semelhante nos diferentes tipos de vasos, é heterogêneo em relação à sua estrutura e também sob os pontos de vista fisiológico, metabólico e imunológico (KUMAR *et al.*, 1987).

A detecção de antígenos nos tecidos depende de vários fatores, como duração e tipo de fixação, métodos de processamento e inclusão, e da preservação do antígeno na superfície da célula (ISMAIL *et al.*, 2003). Uma vez que as células endoteliais apresentam um proeminente glicocálix, constituído principalmente por oligossacarídicos das glicoproteínas da membrana, lectinas específicas têm sido aplicadas para a identificação de células endoteliais de diversos órgãos animais (ALROY *et al.*, 1987; LAITINEN, 1987; LAWRENSON *et al.*, 2000). A lectina *Griffonia simplicifolia* (BS-I) identificou células endoteliais – porém não em todos os vasos –, bem como as células espumosas (“foamy cells”). Estas células já foram identificadas no fígado, baço, submucosa intestinal e nódulos linfáticos de ruminantes intoxicados (GOMAR *et al.*, 2005). Em todos os grupos estudados (MA, DMEM e TP), a lectina *Griffonia simplicifolia* mostrou uma marcação semelhante.

A evidenciação dos macrófagos também foi possível utilizando-se o anticorpo F4/80, o qual demonstra a presença de uma glicoproteína (F4/80). A expressão do antígeno é heterogênea e varia durante a maturação e ativação do macrófago. O F4/80 é expresso em grande quantidade em macrófagos de tecido maduro, incluindo células de Langerhans, microglia, macrófagos localizados na cavidade peritoneal, pulmão, timo, estroma da medula óssea e macrófagos da polpa do baço. Têm sido

reportado também numa sub-população de células dendríticas (<http://www.abcam.com/index.html?datasheet=60343>, em 12/07/2008).

Os macrófagos, além de produzirem e liberarem enzimas hidrolíticas importantes para a remoção dos debrís celulares, são também fontes de fatores de crescimento e citocinas, que por sua vez são úteis na promoção da sinalização celular, mitose e produção da matriz extracelular. Na resposta à lesão do SNP, Leskovar *et al.* (2000) encontraram acúmulo de macrófagos de forma mais expressiva no local do dano do que nas regiões onde ocorre a WD. No nosso estudo os macrófagos também foram vistos de forma mais intensa na área regenerada e, em menor extensão, nos cotos proximal e distal. Além disso, o F4/80 marcou áreas semelhantes à marcação da *griffonia*, evidenciando também as *foamy cells*. A falta de homogeneidade na marcação entre as células desse anticorpo poderia ser explicada devido à perda de antígenos de superfície da membrana durante o processo de diferenciação. De forma similar, os macrófagos ativados na zona de degeneração podem perder os resíduos de carboidrato detectados pela lectina.

As células de Schwann são participantes ativas nos estágios de degeneração e mielinização. No processo de remielinização essas células se infiltram nos brotamentos axonais de espessura mais largas (1µm de diâmetro), e alguns destes axônios são completamente circundados pelas SCs. Experimentos realizados no nervo ciático de ratos, utilizando o modelo de tubulização com espaço de 10 mm entre os cotos do nervo, mostram que entre 14-21 dias após a lesão estas células estão presentes nos primeiros 2 mm do “*gap*”. O estágio de regeneração alcança o ponto médio do tubo em aproximadamente 21-28 dias e cinco a seis semanas são requeridas para que este processo atinja o coto distal (FIELDS *et al.*, 1987; FAWCETT & KEYNES, 1990; CHEN *et al.*, 2007).

Anticorpos anti-S100 têm sido amplamente utilizados como marcadores das células de Schwann (GARAVITTO *et al.*, 2000). No nosso experimento, utilizamos o anticorpo anti-S100, o qual evidencia as proteínas S100 amplamente distribuídas em vários tecidos que, entre outras funções, têm sido descritas na promoção do crescimento do neurito e na proliferação das células gliais.

Garavito *et al.* (2000) estudando culturas de células do DRG de camundongos, observaram células de Schwann com intensa marcação e outras células de Schwann com marcação mais branda. Da mesma forma observamos estas diferenças nos nossos resultados. Scherer *et al.* (1994) mostraram que as células de Schwann pouco marcadas correspondem a uma população de células de Schwann não-mielinizantes. Portanto, Garavito *et al.* (2000) hipotetizaram que as células de Schwann, tanto *in vivo* como *in vitro*, quando pouco marcadas com S100, estão envolvendo axônios amielínicos.

Os dois tipos de marcações foram vistas predominantemente no grupo onde foram utilizadas as células mesenquimais adiposas (MA), e em menor extensão, nos grupos DMEM e TP. Nossos dados sugerem que a utilização dessas células na regeneração do nervo ciático poderia estar favorecendo o processo de mielinização.

Diante desses resultados, resolvemos medir a quantidade do tecido nervoso e da área total (área, largura e diâmetro) nos espécimes estudados. Adotamos a metodologia de medir exatamente a área, diâmetro e largura no início da lesão, ou seja, no final do bloco "A" ou início do bloco "B". Nos cortes longitudinais ainda medimos a menor largura encontrada na área regenerada.

Nossos resultados mostraram que o grupo tratado com células mesenquimais adiposas (MA) apresentou maior média na menor largura da área regenerada, maior

área e maior diâmetro de tecido nervoso, enquanto o grupo TP apresentou as menores medidas.

Observou-se também que a área e diâmetro do tecido total encontrada nos grupos MA e TP eram iguais às áreas e diâmetros do tecido nervoso, ou seja, o tecido nervoso ocupou toda a área regenerada. Já no grupo DMEM, a área e diâmetro do tecido total foi maior que a área e diâmetro do tecido nervoso, evidenciando que o grupo DMEM possuiu um tecido com características distintas e que poderia ser descrito como um tecido frouxo.

O tecido adiposo, como a medula óssea, é derivado do mesoderma embrionário e contém uma população de células estromais heterogênea. Os estudos mostram que as células mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) possuem capacidade de diferenciação em diversos tecidos mesodérmicos, incluindo osso, cartilagem músculo e gordura (ZUK *et al.*, 2001, BAPTISTA *et al.*, 2007). Associado a isto, da mesma forma que as células mesenquimais da medula óssea, estas células também se diferenciam em linhagem não-mesenquimal, como é o caso da diferenciação em células que expressam marcadores neuronais (SANCHEZ-RAMOS *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2003; SAFFORD *et al.*, 2004).

De acordo com Kokai *et al.* (2005) as população de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) podem ajudar no reparo do sistema nervoso. Portanto, devido à sua propriedade plástica e às suas características de fácil obtenção e manuseio, estas células representam uma alternativa muito interessante para terapias celulares.

Kang *et al.*, (2003) puderam observar que as ADSCs sobreviveram e migraram no cérebro de ratos submetidos à isquemia. Foi evidenciada melhora das funções neurológicas no grupo que recebeu o transplante celular. De acordo com

seus estudos, uma maior quantidade de ADSCs foi encontrada no cérebro de ratos que sofreram oclusão da artéria cerebral comparada ao grupo controle. Os fatores quimotáticos induzidos pela isquemia da lesão parecem facilitar a migração das ADSCs. Além disso, não foram observadas evidências de resposta inflamatória ou rejeição destas células.

Nossos estudos mostraram que o grupo MA apresentou resposta inflamatória em menor extensão comparada ao DMEM e TP, porém mais estudos são necessários para melhor caracterizar a resposta inflamatória neste modelo.

A lesão nervosa também é seguida de mudanças profundas na reorganização funcional do córtex somatosensorial, principalmente por causa do mau direcionamento dos axônios regenerados. A área de representação cortical que corresponde ao segmento danificado sofre um “silêncio”, e áreas adjacentes se expandem e ocupam a região primária envolvida na lesão. Inicialmente a zona comprometida não apresenta sensações e não há impulso sensorial na área. Assim, áreas da pele da mão, por exemplo, não serão re-inervadas pelos mesmos axônios originais, podendo ter a sua re-inervação de axônios de outras partes da mão. Isso resulta em mudanças significativas da organização na região do córtex que representa o local do dano (LUNDBORG & ROSÉN, 2007). Um componente importante, portanto, deve ser a reabilitação com foco no processo de reaprendizagem que é requerido para aprender a nova “linguagem” da região que sofreu lesão, através de programas de re-educação sensorial e motora.

As lesões nervosas periféricas permanecem ainda como um desafio para reconstrução cirúrgica. Essas lesões podem interferir severamente na capacidade funcional adequada do indivíduo, e a incapacitação adquirida é freqüentemente dramática, havendo diminuição da qualidade de vida, com impacto econômico e

emocional. Além do prejuízo motor, normalmente há dor, disestesia e intolerância ao frio. As pesquisas têm alcançado muito progresso no entendimento da neurobiologia relacionada à lesão nervosa, mas vale ressaltar que esse progresso ainda não corresponde necessariamente a uma melhora clínica após a lesão.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Ao final de nosso estudo, propomos que a associação entre tubulização e transplante de células mesenquimais adiposas constitui-se em uma nova opção para o desenvolvimento de tratamentos para lesões periféricas. Esta afirmação está baseada nas seguintes conclusões:

- A. O tratamento ajuda a manter o tecido íntegro e bem organizado;
- B. Em particular, o P3HB mostrou-se um material biocompatível, que inclusive reduz a fibrose;
- C. MA parece favorecer uma nova vascularização, promovendo uma melhor nutrição e dessa maneira facilitando a regeneração;
- D. MA também gera, aparentemente, um aumento do número de células de Schwann, podendo levar a uma melhor remielinização e maior produção de fatores tróficos.

Este conjunto de fatores indica que o tratamento associado entre células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e tubo de P3HB, de certa forma cria um ambiente permissivo para a regeneração.

REFERÊNCIAS

AEBISCHER P, GUENARD V, VALENTINI RF, WINN SR, GALETTI PM. Blind-ende semipermeable guidance channels support peripheral nerve regeneration in the absence of distal nerve stump. **Brain Research**. v.454, p.179-187, 1988.

AGIUS, E; COCHARD, P. Comparison of neurite outgrowth induced by intact and injured sciatic nerves: a confocal e functional analysis. **J Neurosci**. v.18, p. 328-338, 1998.

AHMED, M.R; VENKATESHWARLU, U.; JAYAKUMAR, R. Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair. **Biomaterials**, v.25, p.2585-2594, 2004.

AIRD WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 2003; 31: S221-S230.
Aldini NN, Perego G, Cella GD, Maltarello MC, Fini M, Rocca M, Giardino R. Effectiveness of bioresorbable conduit in the repair of peripheral nerves. **Biomaterials**. v.17, n.10, p.959-962, 1996.

ALROY J, GOYAL V, SKUTELSKY E. Lectin histochemistry of mammalian endothelium. **Histochemistry**. v.86, n.6, p.603-7, 1987.

ANDERSON, A.J; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v.54, n.4, p. 450-472, 1990.

ASATO, F., BUTLER, M., BLOMBERG, H., GORDH, T. Variation in rat sciatic nerve anatomy: Implications for a rat model of neuropathic pain. **Journal of the peripheral Nervous System**. v.5, p.19-21, 2000.

BAIN JR, MACKINNON SE, HUNTER DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. **Plast Reconstr Surg**. v.83, n.1, p.129-38, 1989.

BAPTISTA, A.F; GOMES, J.R.S; OLIVEIRA, J.T; SANTOS, S.M.G; VANNIER-SANTOS, M.A; MARTINEZ, A.M.B. A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse - Adaptation of the sciatic static index. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 161, n.2, p.259-64, 2007.

BAPTISTA, I.S; PEDROSA, C.G.S; SILVA, K.R; OTAZÚ, I.B; TAKYA, C.M; DUTRA, H.S; CLAUDIO-DA-SILVA; C; BOROJEVIC, R; ROSSI, M.I.D. Bone Marrow and

Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: How close are they? **Journal of Stem Cells**. v.2; n.2; p.73-89, 2007.

BARAÚNA, G.S; PIERUCCI, A.; OLIVEIRA, A.; DUARTE, M.A.T; DUEK, E.A.R. Estudo da degradação "*in vivo*" de poli(L-co-D,L-ácido láctico) aplicado como prótese para regeneração nervosa periférica. **Revista Matéria**, v. 12, n. 2, p. 298- 306, 2007.

BELLAMKONDA, R.V. Peripheral nerve regeneration: An opinion on channels, scaffolds and anisotropy. **Biomaterials**. v.27, p. 3515-3518, 2006.

BERVAR M. Video analysis of standing—an alternative footprint analysis to assess functional loss following injury to the rat sciatic nerve. **J Neurosci Meth**. v.102, n.2, p.109-16, 2000.

BRECKNELL, J.E.; FAWCETT, J.W. Axonal regeneration. **Biol. Rev**. v.71, p. 227-255, 1996.

BRAGA-SILVA, J. ; PADOIN, A.; MARTINS, P.; REZENDE, A. ; REZENDE, K. ; GRECHI, B. ; MACHADO, D. Sources of processed lipo-aspirate cells: influence of donor site on cell concentration. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 122, p. 614-618, 2008b.

BRAGA-SILVA, J. ; PADOIN, A.V.; GEHLEN, D.; MACHADO, D.; GARICOCHEA, B.; COSTA, J.C. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? **Journal of Hand Surgery** (British and European Volume), v. 33, p. 488-493, 2008a.

BRAGA-SILVA, J.; DUVAL, V.; COSTA, J.; MACHADO, D. Efeito das células tronco adultas de medula óssea e do plasma rico em plaquetas na regeneração e recuperação funcional nervosa em um modelo de defeito agudo em nervo periférico em rato. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 14, n. 5, p. 273-275, 2006.

CARLTON, J.M. & GOLDBERG, N.H. Quantitative integrated muscle function following reinnervation. **Plast Reconstr Surg** v.37, p.611-2, 1986.

CASTEILLA L.; CHARRIERE G.; LAHARRAGUE P.; COUSIN B.; PLANAT-BENARD V. ; PERICAUD L.; CHAVOIN J. P. Tissus adipeux, chirurgie plastique et reconstructrice : le retour aux sources. **Annales de chirurgie plastique et esthétique**. v. 49, n.5, p.409-418, 2004.

CHEN, Y.H; CHANG, J.Y; CHENG, C.Y; TSAI, F.J.; YAO, C.H; LIU, B.S. An in vivo evaluation of a biodegradable genin-cross-linked gelatin peripheral nerve guide conduit material. *Biomaterials*. v. 26; p. 3911-3918, 2005.

CHEN, Z.L. YU, W.M.; STRICKLAND, S. Peripheral Regeneration. **Annu. Rev. Neurosci.** v.30, p. 209-33, 2007.

CHEN, Z.L., STRICKLAND, S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. **J Cell Biol.** v.163, p. 889-899, 2003.

CHENG, H.; HUANG, Y-C.; CHANG, P-T.; HUANG, Y-Y. Laminin-incorporated nerve conduits made by plasma treatment for repairing spinal cord injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v.357, p. 938-944, 2007.

COUTO et al. Calpain Inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers. **Journal of Neuroscience Research.** v.77, p. 410-419, 2004.

CRISCI, A.R; FERREIRA, A.L. Low intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. **Ultrasound in Med & Bio.** v.28, p. 1335-1341, 2002.

DAVIS, A.A; TEMPLE, S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. **Nature.** v.372, p.263-266, November, 2002.

DEANS RJ, MOSELEY AB. Mesenchymal stem cells Biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology** , v.28, n.8,p. 875 – 884, August, 2000.

DELLON AL, MACKINNON SE. Sciatic nerve regeneration in the rat. Validity of walking track assessment in the presence of chronic contractures. *Microsurgery*

DeMEDINACELI, L; FREED, W.J; WYATT, R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Exp Neurol** v.77, n.3, p.634–43, 1982.

DEZAWA, M.; TAKAHASHI I, ESAKI M, TAKANO M, SAWADA H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. **Eur J Neurosci.** v.14, n.1, p.1771-6, 2001.

DEZAWA, M. Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. **Anatomic Science International**. v.77, p. 12-25, 2002.

DONOVAN P.J.; GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**. v.414, p.92-97, 2001.

FAWCETT, J.W., KEYNES, R.J. peripheral nerve regeneration. **Annu. Rev. Neurosci**. v.13, p. 43-60, 1990.

FIELDS *et al.* Nerve Regeneration Through Artificial Tubular Implants. **Progress in Neurobiology**. v.33, p. 87-134, 1989.

FLORES, L.P. Estudo epidemiológico das lesões traumáticas de plexo braquial em adultos. **Arq Neuropsiquiatr** v.64, n.1, p.88-94, 2006.

FONSECA, N.M, FERREIRA, F.X., RUZI, R.A., PEREIRA, G.C.S. Abordagem Simplificada do Nervo Ciático por Via Posterior, no Ponto Médio do Sulco Glúteo-Femoral, com Uso de Neuroestimulador. **Rev. Bras. Anestesiol**. v.52, n.6, p. 764-773, 2002.

FRASER JK, WULUR I, ALFONSO Z, HEDRICK MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends Biotechnol**. v.24 ,n.4, p.150-4, April, 2006.

FU SY, GORDON T. Cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. **Molecular Neurobiology**. v.14, n.1, p.67-116, 1997.

GAGE FH, KEMPERMANN G, PALMER TD, PETERSON DA, RAY J. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. **J Neurobiol**. v.36, n.2, p.249-66, August, 1998.

GARAVITO, V.Z.; MUÑETÓN, V.C.; SUTACHAN, J.J; HURTADO, H. Is S100 protein a suitable marker for adult Schwann cells? *In vitro* cell. **Biol - Animal**. v.36, p.281-283, 2000.

GIMBLE J, GUILAK F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**. v.5, n.5, p.362-9, 2003.

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

GOMAR, MS; DRIEMEIER, D; COLODEL, EM; GIMENO EJ. Lectin Histochemistry of Foam Cells in Tissues of Cattle Grazing *Brachiaria* spp. **Journal of Veterinary Medicine**, Series A, v.52, n. 1, p. 18-21, February, 2005.

GRANT, G.A.; GOODKIN, R.; KLIOT, M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. **Neurosurgery**, v.44, n.4, p. 825-40, 1999.

GREENFIELD, L.J. **Surgery. Scientific Principles and Practice**. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven; p. 2172-3, 1997.

GRIFFIN, J.W; HOFFMAN, P.N. Degeneration and Regeneration in the Peripheral Nervous System in Dick. **Peripheral Neuropathy**: W.B Saunders Company. v.1, p. 361-376, 1993.

GRONTHOS S, FRANKLIN DM, LEDDY HA, ROBEY PG, STORMS RW, GIMBLE JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **J Cell Physiol**. v.189, n.1, p.54-63, October, 2001.

GUYTON, A.C. **Neurociência Básica – Anatomia e Fisiologia**. 2^aed., Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 1993.

HAGIWARA, Y; HATORI, M.; KOKUBUN, S.; MIYASAKA, Y. Gait characteristics of sciatic nerve palsy –A report of four cases. **Upsala J Med Sci** v.108, p. 221–228, 2003.

HAZARI A, WIBERG M, JOHANSSON-RUDEN G, GREEN C, TERENCEHI G. A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in the nerve gap repair. **British Journal of Plastic Surgery**. v.52, p.653-657, 1999.

HERMANN, A.; GASTL, R.; LIEBAU, S.; POPA, MO; FIEDLER, J; BOEHM, BO.; MAISEL, M; LERCHE, H; SCHWARZ, J; BRENNER, R.; STORCH, A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. **Journal of Cell Science** v.117, p.4411-4422, 2004.

IJKEMA-PAASSEN J, JANSEN K, GRAMSBERGEN A, MEEK MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. **Biomaterials**. v. 25, n.9, p.1583-1592, 2004.

IJKEMA-PAASSEN J., MEEK MF., GRAMSBERGEN A. Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. **Muscle nerve**, v. 25, p. 891-897, 2002.

ISAACS KR, ANDERSON BJ, ALCANTARA AA, BLACK JE, GREENOUGH WT. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. **J Cereb Blood Flow Metab.** v.12, n.1, p.110-119 Jan, 1992.

ISMAIL JA, POPPAA V, KEMPERB LE, SCATENAB M, GIACHELLIB CM, COFFINC JD, CHARLES E. MURRYA CE. Immunohistologic labeling of murine endothelium. **Cardiovascular Pathology.** v.12: p.82-90, 2003.

IZADPANAH R, TRYGG C, PATEL B, KRIEDT C, DUFOUR J, GIMBLE JM, BUNNELL BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **J Cell Biochem.** v.99, n.5, p.1285-97, Dec, 2006.

JEROSCH-HEROD, C. Measuring outcome in median nerve injuries. **J Hand Surg.** v.18B, p. 624-628.

KANG *et al.* Interactions between human adipose stromal cells and mouse neural stem cells in vitro. **Developmental Brain Research.** v.145, p. 141-149, 2003a.

KANG *et al.* Improvement of neurologic deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. **Experimental Neurology.** v.183, p. 355-366, 2003b.

KENDALL, F.P; McCREARY, E.K; PROVANCE, P.G. **Músculos – Provas e Funções.** São Paulo: Manole, 4ª edição, 1995.

KERN S, EICHLER H, STOEVE J, KLÜTER H, BIEBACK K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells.** v.24, n.5, p.1294-301, May, 2006.

KLINE D-G, KIM D, MIDHA R, HARSH C, TIEL R Management and results of sciatic nerve injuries: a 24-year experience. **J Neurosurg.** v.89. p. 13-23, 1998.

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

KOKAI, L.E; RUBIN, J.P; MARRA, K.G. The Potencial of Adipose-Derived Adult Stem Cells as a Source of Neuronal Progenitor Cells. **Plastic Reconstr. Surg.** v.16, n.5, p. 1453-1460, 2005.

KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R, NEUTZEL S, SHARKIS SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell.** v. 105, n.3, p. 369-77, May, 2001.

KUCIA M, WYSOCZYNSKI M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. **Cell Tissue Res.** v.31, n.1, p.125-34, jan, 2008.

KUHN HG & SVENDSEN CN. Origins, functions, and potential of adult neural stem cells. **Bioessays.** v.21, n.8, p.625-30, August, 1999.

KUMAR S, WEST DC, AGER A. Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. **Differentiation.** v.36, p.57-70, 1987.

LAITINEN L. *Griffonia simplicifolia* lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. **Histochemical J.** v.19, p.225-234, 1987.

LANGONE *et al.* Peripheral nerve repair using a poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. **Biomaterials.** v.16, p. 347-353, 1995.

LAWRENSON JG, CASSELLA JP, HAYES AJ, FIRTH JA, G. ALLT G. Endothelial glycoconjugates: a comparative lectin study of the brain, retina and myocardium. **J. Anat.** v.196, p. 55-60, 2000.

LESKOVAR, A; MORIARTY, LJ.; TUREK, JJ; SCHOENLEIN, IA; BORGENS, RB. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. **Journal of Experimental Biology.** v. 203, n.12, p.1783-1795, 2000.

LISS, A.G. *et al.* Loss of neurons in the dorsal root ganglia after transection of a sensory peripheral nerve. An anatomical study in monkeys. **Scand J Plast Reconstr Hand Surg.** v.30, p. 1-6, 1996.

LIU, T.M; MARTINA, M.; HUTMACHER, D.W.; HUT, J.H.; LEE, E.H; LIM Bing. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow-and

adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. **Stem Cells**. v. 25, n.3,p.750-760, 2007.

LUNDBORG, G. **Nerve Injury and Repair. Regeneration, reconstruction and Cortical Re-modelling**, 2nd edn. Elsevier, Philadelphia, PA, 2004.

LUNDBORG, G., ROSÉN, B. Hand function after nerve repair. **Acta Physiol**. v.189, p. 207-217, 2007.

LUNDBORG, G., ROSÉN, B. Sensory relearning after nerve repair. **Lancet**.v.358, p. 809-810, 2001.

MA, J. *et al.* Early nerve repair after injury to the postganglionic plexus: an experimental study of sensory and motor neuronal survival in adult rats. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**. v.37, p. 1-9, 2003.

MACKINNON, M, DELLON, AL: Surgery of the Peripheral Nerve. New York: Thieme Medical Publishers, Inc, *in SMIT*, 2006.

MADISON, R.D.; ROBINSON, G.A.; CHADARAN, S.R. The specificity of motor neurone regeneration (preferential reinnervation). **Acta Physiol**, v.189, p. 201-206, 2007.

MAKWANA, M; RAIVICH, G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. **FEBS Journal**. v.272, n.11, p. 2628-2638, June 2005.

MANDIOLA, E.L.; HERNÁNDEZ, P.H.; HOFER, U.P.; CROVETTO, E.; ORTEGA, E. Variaciones anatomicas del origen del nervio isquiatico (en fetos humanos de término). **An Anat Norm**. v.4; p.40-43, 1986.

MARQUES *et al.* Participation of neurofilament proteins in axonal dark regeneration of rat's optic nerves. **Brain Res**. V.696, p. 1-13, 2003.

MARQUES, MJ; DA-SILVA, C.F; SANTO NETO, H. An ultrastructural study of the temporal progress of neuromuscular junction regeneration after sciatic nerve transection and tubulization repair. **Braz. j. morphol**. v.13, n.2, p.181-7,1996.

MARTINEZ, A.M.B., RIBEIRO, L.C.V. Ultrastructural localization of calcium in peripheral nerve fibers undergoing Wallerian degeneration: an oxalate-pyroantimonate and X-ray microanalysis study. **J Submicroscop Cythol Pathol.** v.30, n.3, p. 451-8, 1998.

MATAR JR, R.; AZZE, R.J **Lesões de nervos periféricos.** Publicação oficial do Instituto de Ortopedia e Traumatologia Dr. F.E de Godoy Moreira, Faculdade de Medicina USP, SP.

MEEK, M.F; IJKEMA-PAASEN, J; GRAMSBERGEN, A. Functional recovery after transaction of sciatic nerve at an early age: a pilot study in rats. **Developmental Medicine & Child Neurology.** v.49, p. 377-379, 2007.

MELO, LR; FELTRIN, Y; SELBACH, R; MACEDO JUNIOR, G; SPAUTZ, C; HAAS, LJ. Uso da celulose Liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** v.59, n2B, p.372-379, 2001.

MEZEY E, CHANDROSS KJ. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. **Eur J Pharmacol.** v.405, p.297-302, September, 2000.

MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; CONGET, P. **Mesenchymal Stem cells.** Society for Experimental Biology and Medicine, 2001.

MOHANNA, P.N.; YOUNG, R.C.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. A composite poly-hydroxybutyrate–glial growth factor conduit for long nerve gap repairs. **J. Anat.** v.203 p.553-565, 2003.

MOSAHEBI, A.; WOODWARD, B.; WIBERG, M.; MARTIN, R.; TERENCEHI, G. Retroviral labeling of Schwann cells: *In vitro* characterization and *in vivo* Transplantation to improve peripheral nerve regeneration. **Glia.** v. 34, n.1, p.8-17, 2001.

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

NETTER, H.F. *et al.*, **Atlas of Neuroanatomy and Neurophysiology.** Selections from the Netter Collection of Medical Illustrations, Copyright, Icon Custom Communications, 2002.

PANSERI, S.; CUNHA, C.; LOWERY, J.; DEL CARRO, U; TARABALLI, F.; AMADIO, S.; VESCOVI, A.; GELAIN, F. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. **BMC Biotechnology** . v.8, n.39, p. 1-12, 2008.

PATTON, B.L *et al.* Distribution and functions of laminins in the neuromuscular system of developing, adult and mutant mice. **J Cell Biol.** v.139, p. 1507-21, 1997.

PEREIRA LOPES, F.R.; CAMPOS, L.C.M.; CORREIA JR, J.D.; BALDUINO A.; LORA, S.; LANGONE, F.; BOROJEVIC, R.; MARTINEZ, A.M.B. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. **Experimental Neurology**. v.198, p.457-468, 2006.

PFISTER, LUKAS A.; PAPALOÏZOS, MICHAEL.; MERKLE, HANS P.; GANDER, BRUNO. Review: Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. **Journal of the Peripheral Nervous System**. v. 12, p.65–82, 2007.

POLA, R.; Aprahamian, T.R; Bosch-Marcé, M; Curry, C; Gaetani, E.; Flex, A; Smith, R.C; Isner, J.M; Losordo, D.W. Age-dependent VEGF expression and intraneural neovascularization during regeneration of peripheral nerves. **Neurobiology of Aging**. v. 25, p.1361-1368, 2004.

PREVITALI, S.C; FELTRI, M.L.; ARCHELOS, J.J.; QUATTRINI, A.; WRABETZ, L.; HARTUNG, H.P. Role of integrins in the peripheral nervous system. **Progress in Neurobiology**. v.64, p. 35-49, 2001.

PREWITT T-W, ALEXANDER H-R, SINDELAR W-F. Hemipelvectomy for soft tissue sarcoma: Clinical results in fifty-three patients. **Surg Oncol**. v.4, p. 261–269, 1995.

PRODANOV *et al.* Spatial clustering analysis in neuroanatomy: application of different approaches to motor nerve fiber distribution. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 160, p. 93-108, 2007.

RAIVICH, G. *et al.* The AP-1 transcription factor c-jun is required for efficient axonal regeneration. **Neuron**. v.43, p.57-67, 2004.

RASO, V.V.M; BARBIERI, C.H; MAZZER, N. Índice funcional do ciático nas lesões por esmagamento do nervo ciático de ratos. Avaliação da reprodutibilidade do método entre examinadores. **Acta Ortopédica Brasileira**. v.14, n.3, p. 133-136, 2006.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v.87, p.137, 2003.

RISTIC S, STRAUCH R.J, ROSENWASSER M.P. The assessment and treatment of nerve dysfunction after trauma around the elbow. **Clin Orthop**. v.370, p.138-53, 2000.

RODRIGUEZ FJ, GOMEZ N, PEREGO G, NAVARRO X. Highly permeable polylactide caprolactone nerve guides enhance peripheral nerve regeneration through long gaps. **Biomaterials**. v.20, p.1489-1500, 1999.

ROSÉN, B. **The sensational hand. Clinical assesment after nerve repair**. Thesis, Lund University, p. ISBN 91-628-4368-4360, 2000.

SADER, M.S.; FERREIRA, M.; DIAS, M. L. Preparação e caracterização de estruturas porosas de poli(3-hidroxibutirato). **Polímeros**. São Carlos, v.16, n.1, p. 12-18 Jan./Mar, 2006.

SAFFORD KM, SAFFORD SD, GIMBLE JM, SHETTY AK, RICE HE. **Exp Neurol**. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. v.187, n.2, p.319-28, Jun, 2004.

SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, HAZZI C, STEDEFORD T, WILLING A, FREEMAN TB, SAPORTA S, JANSSEN W, PATEL N, COOPER DR, SANBERG PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Exp Neurol**. v.164, n.2, p.247-56, August, 2000.

SCHMIDT, C.E.; LEACH, J.B.; Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. **Annu Rev Biomed Eng**. v.5, p.293–347, 2003.

SEDDON H.J. Three types of nerve injury. *Brain*. 1943; 66:237-88. *In*: BURNETT, M. G.; ZAGER, E. L. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. **Neurosurg Focus**, v. 16, n. 5, Article1, 2004.

SCHERER, S.S.; XU, Y.T.; ROLING, D.; WRABELTZ, L.; FELTRI, M.L.; KAMBOLZ, J. Expression of growth-associated protein-43 kD in Schwann cells is regulated by axon-Schwann cell interactions an cAMP. **J Neurosci Res**. v.38, p.575-589, 1994.

SMIT, X.. **STRUGGLE AT THE SITE OF NERVE INJURY: A rat sciatic nerve study on fundamental problems of peripheral nerve injury**. Rotterdam, The Netherlands, 2006.

SNIDER, W.D.; ZHOU, F.Q.; ZHONG, J.; MARKUS, A. Signaling the pathway to regeneration. **Neuron**. v.35, p. 13-16, 2002..

STOLL, G. *et al.* Degeneration e regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. **Journal of the Peripheral Nervous System**. v.7, p. 13-27, 2002.

STOLL, G., MÜLLER, H.W. Nerve injury axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. **Brain Pathol**. V.9, p. 313-325, 1999.

TAKAMI T, OUDEGA M, BATES ML, WOOD PM, KLEITMAN N, BUNGE MB. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. **J Neurosci**. v.22, p.6670-6681, 2002.

TEMPLE, S. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture **Nature**. v.340, p. 471-473, August, 1989.

THANOS, P.K; OKAJIMA, S.; TERZIS, J.K. Ultrastructure and Cellular Biology of Nerve Regeneration. **Journal of Reconstructive Microsurgery**. v.14, n.6, p. 423-436, 1998.

TOHILL *et al.* Rat bone mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. **Neuroscience Letters**. v. 362, p. 200-203, 2004.

TORRES, M.F.P.; GRAÇA, D.L.; FARIAS, E.L.P. Reparação microcirúrgica de nervo periférico por meio de sutura, cola de fibrina ou bainha de BioFill® em ratos Wistar. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.55 n.5 Belo Horizonte oct. 2003

TORTORA, G.J., GRABOWSKI, S.R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 9ªed. 2002.

TOWNSEND, P.L. **Microsurgical techniques in reconstructive surgery**. In: Keen G, Farndon JR, eds. *Operative Surgery and Management*. 3rd ed. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann; p.434-5, 1994.

VAREJÃO ASP, MELO-PINTO P, MEEKMF, FILIPE VM, BULAS-CRUZ J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. **Neurol Res.** v.26 ,n.2, p.186–94, 2004.

VARGAS, M.E; BARRES, B.A. Why Is Wallerian Degeneration in the CNS So Slow? **Annu. Rev. Neurosci.** v. 30, p.153–79, 2007.

VESCOVI AL, SNYDER EY. Establishment and properties of neural stem cell clones: plasticity in vitro and in vivo. **Brain Pathol.** v.9, n.3, p. 569-98, July, 1999.

VICENTE, E.J.D.; VIOTTO, M.J.S.; BARBOSA, C.A.A.; VICENTE, P.C. Estudo das Relações Anatômicas e suas variações entre o Nervo Ciático e o músculo piriforme. **Rev. Bras. Fisioter.**, São Carlos, v. 11, n. 3, p. 227-232, maio/jun. 2007

VIOTT, A.M; RAMOS, A.T.; INKELMANN, M.A.; KOMMERS, G.D.; GRAÇA, D.L. Aspectos histoquímicos e imunoistoquímicos nos neoplasmas do sistema nervoso periférico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, p.1145-1153, 2007

VOGELAAR, C.F *et al.* Homeobox gene expression in adult root ganglia during sciatic nerve regeneration: is regeneration a recapitulation of development? **European Journal of Phamacology.** v.480, p. 233-250, 2003.

WAGNER W, WEIN F, SECKINGER A, FRANKHAUSER M, WIRKNER U, KRAUSE U, BLAKE J, SCHWAGER C, ECKSTEIN V, ANSORGE W, HO AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Exp Hematol.** v.33, n.11, p.1402-16, Nov, 2005.

WANG JS, SHUM-TIM D, GALIPEAU J, CHEDRAWY E, ELIOPOULOS N, CHIU RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. **J Thorac Cardiovasc Surg.** v.120, p.999-1005, 2000.

WEHREND, A.; HETZEL, U.; HUCHZERMEYER, S.; KLEIN, C.; BOSTEDT, H. Sirius red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. **Anat Histol Embryol.** v.33, p. 180-182, 2004.

WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, BLACK IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J Neurosci Res.** v.61, n.4, p.364-70, August, 2000.

WOSNITZA M, HEMMRICH K, GROGER A, GRÄBER S, PALLUA N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. **Differentiation**. v.75, n.1, p.12-23, 2007.

ZHANG P, HE X, ZHAO F, ZHANG D, FU Z, JIANG B. Bridging small-gap peripheral nerve defects using biodegradable chitin conduits with cultured Schwann and bone marrow stromal cells in rats. **J Reconstr Microsurg**. v.21, n.8, p.565-71, 2005.

ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE DA, HUANG JI, MIZUNO H, ALFONSO ZC, FRASER JK, BENHAIM P, HEDRICK MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**. v.13, n.12, p.4279-95, Dec, 2002.

ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**. v.7, n2, p.:211-28, April, 2001.

<http://www.abcam.com/index.html?datasheet=60343> em 05/07/2008.

<http://www.medicalhistology.us/twiki/bin/view/Main/NervousTissueAtlas04>) em 05/04/2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)