

VICTOR TÚLIO RIBEIRO DE RESENDE

“Evidências da Atividade Trófica de Células  
Derivadas da Medula Óssea na Regeneração do  
Sistema Nervoso Periférico”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO  
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Rio de Janeiro  
2007

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Ribeiro-Resende, Victor T.  
Evidências da Atividade Trófica de Células Derivadas da Medula Óssea na Regeneração  
do Sistema Nervoso Periférico/  
Victor Túlio Ribeiro de Resende – Rio de Janeiro:  
UFRJ/IBCCF, 2007  
XII, 98 f.: il.; 31cm

Orientadora: Rosalia Mendez Otero  
Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa de  
Bioengenharia e Biotecnologia Animal, 2007  
Referências Bibliográficas: f. 88-99

1.Regeneração 2. Nervo Ciático 3. Células Derivadas da Medula Óssea 4. Gânglio da Raiz  
Dorsal 5. Medula Espinhal 6. Fatores Neurotróficos 7. Neurociências – Tese  
I- Mendez-Otero, Rosalia. II- Universidade Federal do Rio de Janeiro, IBCCF, Programa  
de Bioengenharia e Biotecnologia Animal. III- Título

O presente trabalho foi realizado no **Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular** do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, sob orientação da **Dra. Rosalia Mendez Otero** e na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Conselho de Ensino para Graduados da UFRJ (CEPG/UFRJ), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Ministério de Saúde.

## **Agradecimentos**

---

- À professora Rosalia Mendez Otero por me acolher em seu laboratório ao longo desses oito anos, desde a iniciação científica;
- Aos componentes da banca, ao revisor e aos suplentes por aceitarem o convite e dedicarem seu tempo na leitura e discussão dos dados contidos nesta tese;
- Ao professor e amigo Marcelo Felipe Santiago por todo o aprendizado no laboratório, principalmente sobre microscopia óptica;
- À querida Professora Cecília Hedin Pereira por permitir a minha entrada no Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular (NCM) em setembro de 1999;
- Aos queridos alunos de iniciação científica do NCM (os periféricos), Pedro Moreno Pimentel Coelho (hoje doutorando do NCM), Raquel de Moura Brito Mendez, João Paulo Cordeiro de Lima e Louise Mesentier Louro. Muito obrigado pelo interesse, dedicação e contribuição para esse trabalho;
- Aos professores e amigos, Ricardo Augusto de Mello Reis e Cristiano Coutinho, pelo incentivo e conselhos;
- Ao amigo e técnico do NCM Felipe Marins;
- Ao nosso bioterista Sr. José Tibúrcio;
- A todos os ratos e camundongos que cederam as suas vidas para que esse trabalho pudesse ser realizado;
- Aos amigos da UFRJ, João Pedro Saar Werneck de Castro, Emerson Lopez Olivares, Maurício Castro, Brian Njaine, Ricardo Henrique, Danilo Furtado, Eduardo Both, Léo Morita, Anderson dos Santos e Ricardo Azevedo (o Mostro) por todos os conselhos e conversas científico-culturais. “Valeu rapaziada!”
- À minha querida Roberta Figueiredo, pelo incentivo, amor e companheirismo.
- À querida amiga Ana Cristina Machado Leão, grande companheira nos bons e maus momentos;
- As queridas amigas Virgínia Duarte (Aparícia!) e Ísis Cristina pela amizade e companheirismo;
- Aos demais companheiros de laboratório, muito obrigado a todos;
- Aos mestres Maurão, Gabriel, Mario Moura e Celso Alvim e aos amigos batuqueiros, Rodrigo Cupim, Mariana, Giordano e Mannuela. M.o.n.o.b.l.o.c.o, que beleza...
- Aos meus pais e heróis, Themis Ponzio de Rezende e Marilene Marinho Ribeiro, pelo amor, educação e liberdade de escolha que vocês me deram. Amo vocês do fundo do meu coração!

“ Vocês que estão no palácio, venham ouvir meu pobre pinho. Não tem o cheiro do vinho, das uvas frescas do Lácio. Mas tem a cor de Inácio, da serra da catingueira. Um cantador de primeira que nunca foi a uma escola. Pois meu verso é feito à foice, do cassaco cortar cana. Sendo de cima pra baixo, tanto corta como espana. Sendo de baixo pra cima, voa do cabo e se dana.”

Ivanildo Vilanova, fragmento de um improviso.

## Sumário

---

Lista de abreviaturas.....	8
Resumo em português.....	11
Resumo em inglês.....	12
<b>1.Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1- O desenvolvimento do sistema nervoso periférico (SNP).....</b>	<b>13</b>
<b>1.2- O nervo ciático como modelo de estudo do SNP.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3- A Célula de Schwann e a Bainha de Mielina.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4- O Gânglio da Raiz Dorsal (GRD).....</b>	<b>23</b>
<b>1.5- A Regeneração do SNP.....</b>	<b>25</b>
<b>1.6- Reparo de nervos periféricos utilizando próteses tubulares.....</b>	<b>38</b>
<b>1.7- A biologia das células derivadas da medula óssea e o seu potencial terapêutico em lesões do SNP.....</b>	<b>42</b>
<b>2.Objetivos.....</b>	<b>45</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1- Animais.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2- Obtenção de células da fração mononuclear da medula óssea.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3- Procedimentos cirúrgicos para estabelecimento do modelo experimental.....</b>	<b>49</b>
<b>3.4- Procedimentos cirúrgicos para aplicação de traçador axonal.....</b>	<b>52</b>
<b>3.5- Administração de Bromo-Deoxiuridina para quantificação da proliferação glial in vivo.....</b>	<b>53</b>
<b>3.6- Perfusão, Crioproteção, Medida de Crescimento e Densidade Axonal e Obtenção de Cortes Congelados.....</b>	<b>55</b>
<b>3.7- Técnicas Histoquímicas e Imunohistoquímicas.....</b>	<b>56</b>
3.7.1- Coloração Vermelho Neutro.....	56
3.7.2- Imunocitoquímica dos cortes de Nervo Ciático, GRD e Medula Espinhal..	57
<b>3.8- Cultura de Células derivadas da Medula Óssea e Obtenção do Meio Condicionado de Células da Medula Óssea.....</b>	<b>60</b>
<b>3.9- Cultura de Explantes de Gânglio da Raiz Dorsal e de Neurônios Simpáticos dissociados.....</b>	<b>60</b>
<b>3.10- Cultura de Explantes de Nervo Ciático de Ratos Adultos.....</b>	<b>62</b>
<b>3.11- Análise Microscópica, Quantificação e Análise Estatística.....</b>	<b>63</b>
<b>4.Resultados.....</b>	<b>65</b>

<b>4.1-</b>	Crescimento Axonal no Interior do Tubo de Polietileno.....	65
<b>4.2-</b>	CDMO Aumenta a Sobrevivência de Neurônios do GRD após Lesão do Nervo Ciático.....	67
<b>4.3-</b>	CDMO Aumentam o Número de Axônios Sensitivos e Motores em Regeneração após Lesão do Nervo Ciático.....	70
<b>4.4-</b>	CDMO Apresentam Baixo Potencial de Diferenciação em Células de Schwann in vivo.....	73
<b>4.5-</b>	A Atividade Trófica de CDMO Aumenta a Sobrevivência e Neuritogênese de Neurônios Simpáticos.....	73
<b>4.6-</b>	A Atividade Trófica de CDMO Aumenta a Neuritogênese de Explantes de Gânglio de Raiz Dorsal.....	75
<b>4.7-</b>	Atividade Trófica de CDMO Aumenta a Migração e o Número de Células Gliais in Vitro a partir de Explantes de GRD.....	77
<b>4.8-</b>	A Atividade Trófica de CDMO Aumenta a Migração de Células de Schwann a partir de explantes de Nervo Ciático Adulto.....	79
<b>4.9-</b>	CDMO Aumentam a Proliferação de Células de Schwann in vivo após lesão do nervo ciático.....	81
<b>4.10-</b>	CDMO Aumentam a Proliferação de Células Satélite no GRD in vivo após Lesão do Nervo Ciático.....	81
<b>4.11-</b>	A Atividade trófica de CDMO aumenta a proliferação glial na medula espinhal após lesão do Nervo Ciático.....	84
<b>5.</b>	Conclusões.....	87
<b>6.</b>	Discussão.....	89
<b>6.1-</b>	Contribuições das CDMO para a regeneração do sistema nervoso periférico: Estariam essas células agindo como mini-bombas de liberação contínua?.....	89
<b>6.2-</b>	Atividade trófica de CDMO agindo em duas vias: Neurônios e Glia.....	92
<b>6.2.1-</b>	Proliferação de células de Schwann após lesão.....	92
<b>6.2.2-</b>	Proliferação das células satélite do GRD.....	94
<b>6.2.3-</b>	Proliferação de células gliais na medula espinhal.....	95
<b>6.3-</b>	Pespectivas e considerações finais sobre o uso de CDMO em teratipas celulares para regeneração do SNP.....	96
<b>7.</b>	Referências .....	98



## Lista de Abreviaturas

---

**AMPc** - Adenosina monofosfato cíclica

**ATP** - Trifosfato de adenosina

**BDNF** - Fator neurotrófico derivado do cérebro

**BrDU** – Bromodeoxi uridina

**BSA** - Soro de albumina bovina

**CC** - Canal Central da Medula espinhal

**CDMO** - Células derivadas da medula óssea

**CDMO<sup>GFP+</sup>** - Células derivadas da medula óssea positivas para a proteína fluorescente verde

**CNAPs** - Potenciais somatosensoriais evocados

**CNTF** - Fator neurotrófico ciliar

**Cy3** - Indocarbocianina

**DAPI** - 4', 6'-diamidino-2-phenilindol

**Dil** - 1,1'-dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

**DL** - Dorso-lateral

**DMEM** - Meio de eagle modificado por Dulbeco

**DMSO** - Dimetil-sulfóxido

**Erb B** - Receptor para neuregulinas tipo B

**FCS** - Soro fetal de novilho

**FGF** - Fator de crescimento de fibroblastos

**GAP-43** - Proteína associada ao crescimento com 43Kd de peso molecular

**GDNF** - Fator neurotrófico derivado da glia

**GFAP** - Proteína fibrilar acídica da glia

**GFP** - Proteína fluorescente verde

**GPI** - Glicosilfosfatidilinositol

**GRD** - Gânglio da raiz dorsal

**Hz** - Hertz

**LIF** - Fator inibitório de leucemia

**MAG** - Glicoproteína associada à mielina

**MAPK** - Proteína cinase ativada por mitógeno

**MBP** - Proteína básica de mielina

**MC-CDMO** - Meio condicionado das células derivadas da medula óssea

**MEPs** - Potenciais musculares evocados

**NC** - Nervo ciático

**N-CAM** - Molécula de adesão celular neural

**NF-200** - Neurofilamento com 200Kd de peso molecular

**NGF** - Fator de crescimento de nervos

**NGS** - Soro normal de cabra

**NRG-1** - Neuregulina-1

**NT-3** - Neurotrofina-3

**NT-4** - Neurotrofina-4

**OMgp** - Glicoproteína de mielina de oligodendrócitos

**p75** - Receptor de baixa afinidade para neurotrofinas

**PBS** - Salina tampão fosfato

**PEIP** - poli [(etilalanato)<sub>1,4</sub>(imidazolil)<sub>1,6</sub>fosfazeno]

**PF4%** - Paraformaldeído a 4%

**PGSC** - Proteoglicanos de sulfato de condroitina

**PI-3 K** - fosfatidil inositol 3 cinase

**PLC** - fosfolipase C

**PMP22** - Proteína básica de mielina periférica

**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucléico mensageiro

**RPM** - Rotações por minuto

**S100-β** - Subunidade β da proteína ligadora de Ca<sup>++</sup> associada ao citoesqueleto

**SNA** - Sistema nervoso autônomo

**SNC** - Sistema nervoso central

**SNE** - Sistema nervoso entérico

**SNP** - Sistema nervoso periférico

**TGF-β** - Fator de crescimento e transformação-β

**TNF-α** - Fator de necrose tumoral-α

**TrK (A, B, C)** - Receptor de alta afinidade de cinase relacionada a tropomiosina

**VEGF** - Fator de crescimento de vasos endoteliais

**VL** - ventro-lateral

**YFP** - Proteína fluorescente amarela

## Resumo

---

Os neurônios Sistema Nervoso Periférico (SNP) são capazes de regenerar seus axônios após sofrerem uma lesão, diferentemente do que ocorre no Sistema Nervoso Central (SNC). No entanto, em muitos casos, essa regeneração não é completa e, portanto não é capaz de promover uma melhora funcional. Após transecção total do nervo ciático ocorre no gânglio da raiz dorsal (GRD) uma perda de aproximadamente 40% de neurônios. Neste trabalho, Investigamos o possível papel das células tronco derivadas da medula óssea na regeneração do SNP. Como modelo experimental utilizamos a transecção do nervo ciático em ratos e camundongos. O nervo seccionado foi reconectado no interior do tubo de polietileno e em seguida o interior do tubo foi preenchido com células derivadas de medula óssea (CDMO) ou PBS. Observamos aumento da sobrevivência neuronal no GRD além da regeneração de axônios sensitivos e motores presentes no nervo ciático após 7, 21 e 42 dias da lesão e tratamento. A análise das CDMO injetadas no interior do tubo não mostrou potencial de diferenciação em células de Schwann. No entanto, as CDMO apresentaram atividade trófica capaz de promover sobrevivência neuronal e neuritogênese *in vitro*. Além disso, a atividade trófica de CDMO aumentou a migração e a proliferação de células gliais tanto no SNP quanto no SNC. Nossos resultados sugerem que a atividade trófica de CDMO aumenta a regeneração no SNP agindo em populações neuronais e em populações gliais.

## Abstract

---

Differently from the central nervous system (CNS), neurons from peripheral nervous system (PNS) are able to regenerate their axons after nerve lesion. However, very often this regeneration is not complete and does not represent any functional recovery. After sciatic nerve transection it is estimated that 40% of dorsal root ganglia (DRG) neurons die. In the present work, we investigated a possible role for bone marrow-derived stem cells in the PNS regeneration. After sciatic nerve total transection in adult rats both proximal and distal stumps were reconnected inside a polyethylene guide tube. After connection, the gap between both stumps (4mm) was filled with bone marrow derived cells (BMDC). We observed DRG neuronal survival and axonal regeneration of both sensory and motor axons seven, twenty and forty two days after the lesion and treatment. BMDC injected inside the guide tube does not showed any differentiation into Schwann cells *in vivo*. However, trophic factor released BMDC induced neuronal survival and neuritogenesis *in vitro*. Moreover, trophic activity derived from bone marrow cells increased migration and proliferation of glial cells in both PNS and CNS. Taken together, these results suggest that trophic activity derived from bone marrow cells improves PNS regeneration acting on both neuronal and glial population.

## 1- Introdução

---

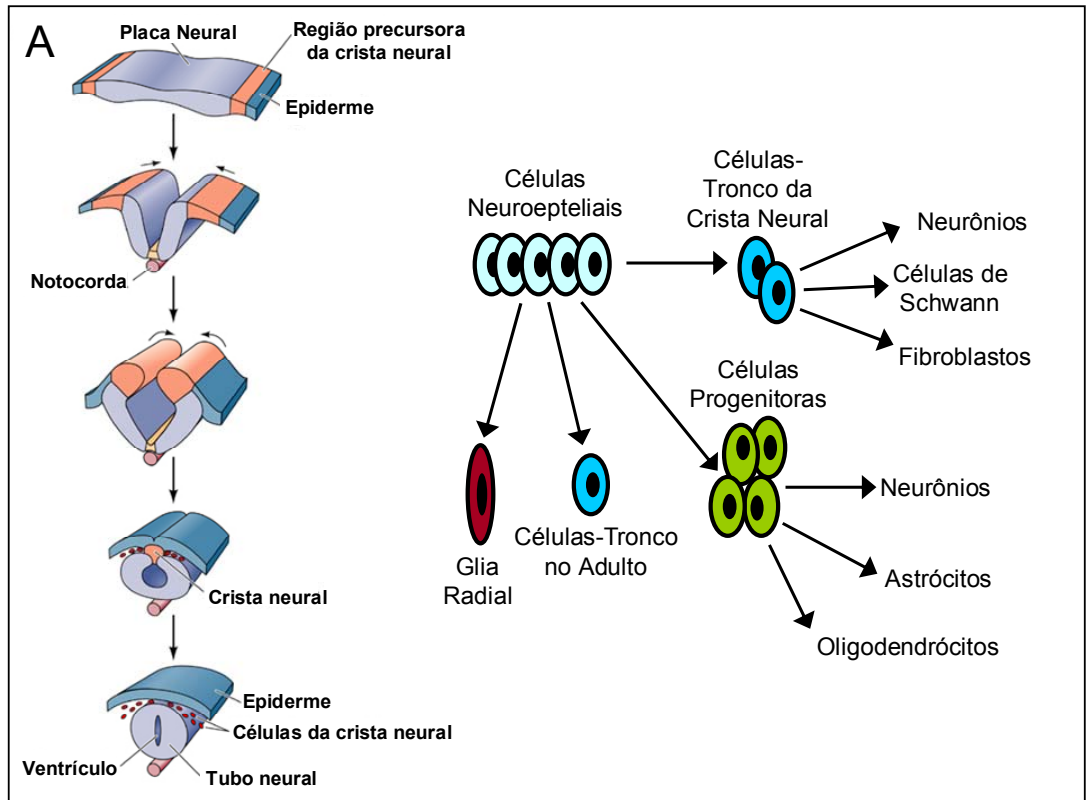
### *1.1- O Desenvolvimento do Sistema Nervoso Periférico*

O sistema nervoso periférico (SNP), assim como o sistema nervoso central (SNC), tem sua origem a partir do folheto embrionário ectodérmico. Logo após o dobramento da placa neural e formação do tubo neural, uma população de células proveniente das bordas da placa neural se separa do tubo neural formando a crista neural (Figura1A). As células da crista neural têm uma grande capacidade proliferativa e migratória dando origem aos neurônios e a glia do SNP além de diversas outras populações celulares como melanócitos e células epiteliais. Numa primeira etapa de migração, as células da crista neural após se distanciarem do tubo neural, aglomeram-se e diferenciam-se em células comprometidas com o fenótipo de neurônios e glia (LeDouarin et al., 2007). Após a diferenciação, os neurônios iniciam o processo de extensão axonal a partir dos aglomerados celulares denominados, a partir de agora, de gânglios. Duas projeções axonais são enviadas: uma em direção ao tubo neural, denominada de ramo central e outra em direção à periferia, o ramo periférico. Essas projeções axonais, ao encontrarem seus alvos, servem de guia para que células da crista neural, precursores neuronais ou gliais migrem para a região correta ao longo do nervo em desenvolvimento (Pietri et al., 2004). Essas células migratórias da segunda etapa tendem a formar no SNP em desenvolvimento, as células de Schwann e fibroblastos, que irão constituir a camada de tecido conjuntivo mais interna dos nervos, o endoneuro (Joseph et al., 2004).

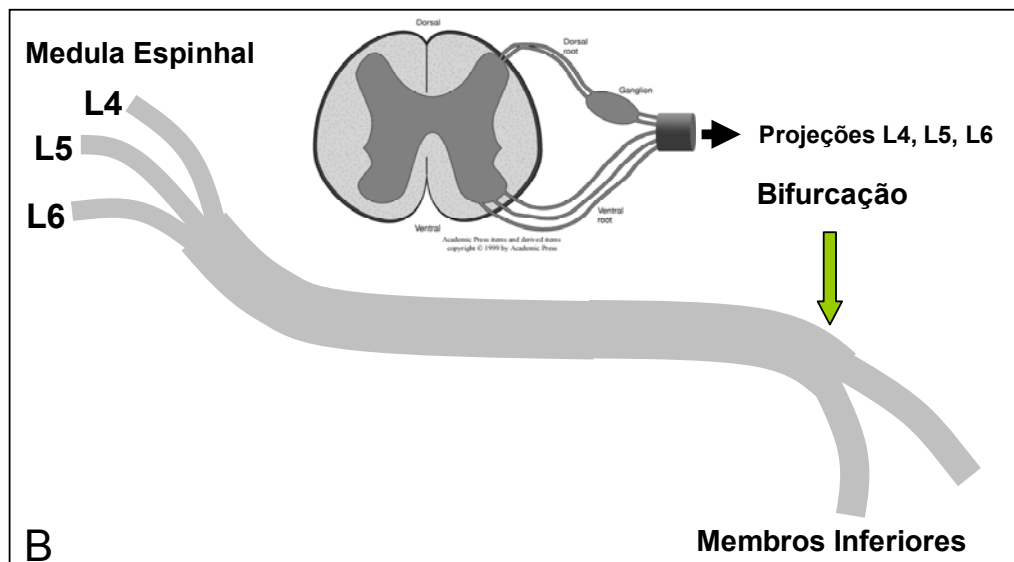
Maro e colaboradores (2004) demonstraram que existe uma população de células precursoras provenientes da crista neural que migra e habita por um curto

período de tempo duas regiões distintas do SNP em desenvolvimento. Uma delas seriam as raízes dos nervos espinhais e a outra seria a zona de entrada do gânglio da raiz dorsal. Para essa demonstração o grupo utilizou a técnica de *Knock in CRE recombinase* no locus do gene *Krox 20* de forma que o produto lac Z ou a proteína fluorescente amarela (YFP) fossem expressos como indicador de transfecção em camundongos no período embrionário de E10 até E15. Segundo o grupo, essa população de células pertence à chamada segunda onda migratória no desenvolvimento do SNP e dão origem as células precursoras de Schwann que ocupam as raízes dorsais. As células concentradas na região de entrada do GRD dão origem principalmente a neurônios de corpo celular pequeno (nociceptivos) e células satélite.

O SNP compreende aglomerados de corpos celulares de neurônios (gânglios) e nervos. Em mamíferos adultos esses neurônios são circundados por um tipo celular glial denominado de células satélite. Essas células além de função estrutural no gânglio, também são fundamentais para a sobrevivência e manutenção da atividade fisiológica dos neurônios. Através de junções comunicantes, as células satélite exportam para os neurônios moléculas como o fator de crescimento do nervo (NGF), o fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF) e o AMPc (Wetmore e Olson, 1995). Além dessa população glial, as células de Schwann e seus precursores também residem nos gânglios, exercendo funções na organização e mielinização das projeções axonais e dando origem às novas células de Schwann, respectivamente. No final do desenvolvimento os nervos periféricos são formados por células de Schwann que podem formar ou não bainha de mielina nos axônios. Os axônios por sua vez são os principais componentes dos nervos, por conduzirem o impulso elétrico no sentido aferente (em direção ao SNC) ou eferente (na direção



**Figura 1A – Desenho ilustrativo dos períodos iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso e da migração das células da crista neural dando origem aos principais tipos celulares que formam o SNP.** Dobramento da placa neural formando o tubo neural (azul claro) e a crista neural (laranja, esquema à esquerda). A partir da crista neural migram células da crista neural que irão formar as populações celulares que constituem o SNP (esquema à direita). Células da crista neural originam neurônios, células de Schwann e fibroblastos. Adaptado de: Pevny e Rao, 2003.



**Figura 1B - Desenho ilustrativo da anatomia do nervo ciático de ratos adultos.** Projeções axonais dos motoneurônios contidos no corno anterior (região ventral) da medula espinal se unem as projeções periféricas do GRD formando um dos três segmentos (L4, L5 ou L6) que mais adiante vão se unir e formar o nervo ciático. A partir do GRD partem também projeções axonais (raízes dorsais) em direção ao corno dorsal da medula espinal.



do tecido alvo). Além disso, fibroblastos formam três camadas de tecido conjuntivo denominadas de endoneuro, epineuro e perineuro. Essas camadas de tecido conjuntivo possuem importante função estrutural e de manutenção da composição da matriz extracelular.

O SNP pode ser ainda dividido em três componentes principais: o componente somático, autonômico (Sistema Nervoso Autônomo - SNA) e o sistema nervoso entérico. As estruturas somáticas do SNP são constituídas por dois componentes distintos, o motor e o sensitivo.

Além dos neurônios do GRD, seus prolongamentos e as células da glia, fazem parte do SNP os axônios dos neurônios motores. Os neurônios motores são unipolares com seus corpos celulares contidos no corno anterior da medula espinhal e estendem seus axônios até o tecido-alvo, representado pela musculatura estriada esquelética ou até a musculatura lisa e glândulas no caso dos axônios do SNA.

### ***1.2- O Nervo Ciático como Modelo de estudo do SNP:***

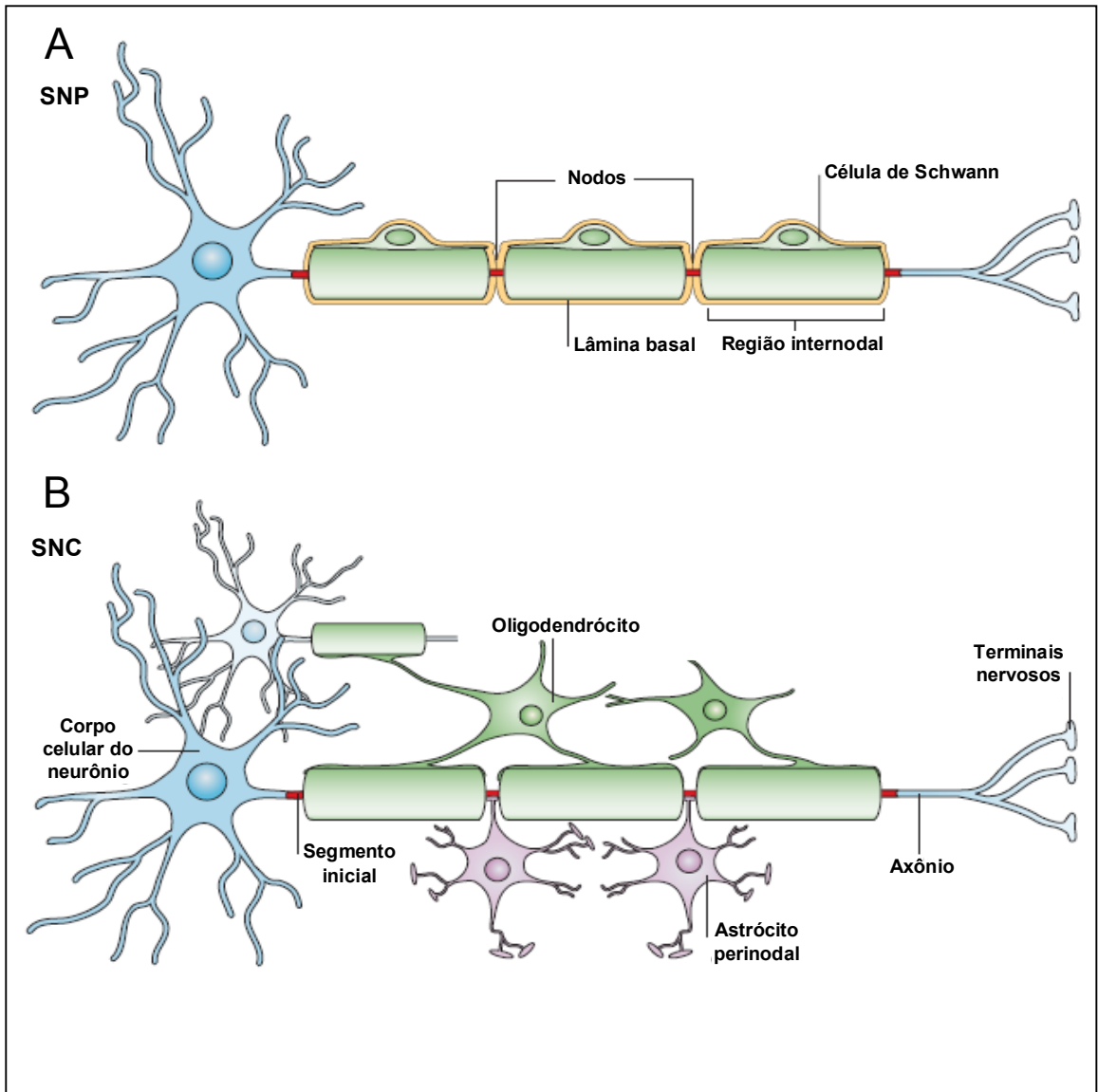
O nervo ciático pertence ao componente somático do SNP, sendo que sua composição é mista, isto é, possui axônios de neurônios sensoriais e motores. Os corpos dos neurônios motores que compõem o nervo ciático do rato encontram-se no corno anterior da medula espinhal ao nível das vértebras lombares L4, L5 e L6. Os neurônios sensoriais, que compõem o GRD, têm suas projeções axonais centrais conectadas a neurônios presentes no corno dorsal da medula espinhal, também ao nível das vértebras lombares L4, L5 e L6 (Figura 1B). As projeções axonais periféricas dos neurônios sensoriais e as projeções motoras inervam de forma homogênea três grupamentos musculares específicos presentes nos membros

posteriores do rato: lateral gastrocnêmio, solear e tibial anterior. Esses grupos musculares são inervados exclusivamente pelos axônios do nervo ciático. A maioria das fibras do nervo ciático são mielinizadas pelas células de Schwann, mas há uma parte das fibras sensoriais que são não mielinizadas (para revisão ver: Sherman e Brophy, 2005).

### ***1.3- A Célula de Schwann e a Bainha de Mielina***

As células de Schwann são responsáveis pela formação da bainha de mielina no SNP enquanto que no SNC os oligodendrócitos desempenham este papel. Outra diferença quanto à mielinização é que um único oligodendrócito é capaz de mielinizar mais de um axônio, enquanto uma célula de Schwann mieliniza apenas um axônio (Poliak e Peles, 2003; Fields e Stevens-Graham, 2003) (Figura 2)

Diversos estudos têm demonstrado a plasticidade das células de Schwann desde sua origem a partir das células precursoras da crista neural. Este dinamismo está relacionado a capacidade dessas células de se tornarem mielinizantes ou não-mielinizantes. Durante o desenvolvimento de vertebrados, uma população de células-tronco da crista neural dá origem a células precursoras, com capacidade de diferenciação em células de Schwann ou neurônios periféricos (Jessen e Mirsky, 1999; Mirsky et al., 2002). Uma vez que essas células precursoras assumem o fenótipo de células de Schwann imaturas, irão então se tornar células mielinizantes ou não mielinizantes. Recentemente foi descrito que a quantidade de neuregulina-1 expressa por axônios determina se essas fibras serão ou não mielinizadas. (Taveggia et al., 2002, Michailov et al., 2004) (Figura 3B). O estado mielinizante da

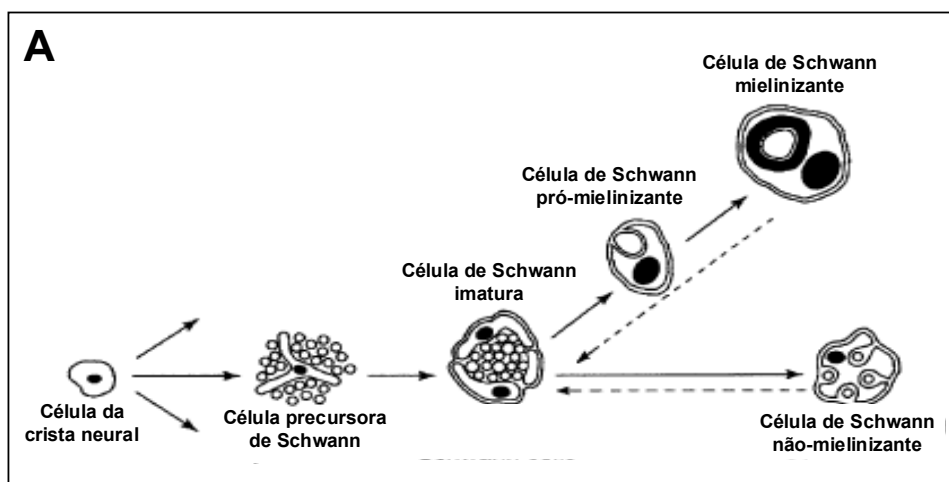


**Figura 2 – Ilustração das diferenças entre a mielinização por células de Schwann e por Oligodendrócitos.** No SNP as células de Schwann é capaz de mielinizar apenas um axônio (A) enquanto no SNC os oligodendrócitos são capazes de mielinizar mais de um axônio (B). Astrócitos perinodais, no SNC, fazem contato com os espaços nodais. Em nervos periféricos não foram descritas populações gliais exercendo a mesma função dos astrócitos perinodais.

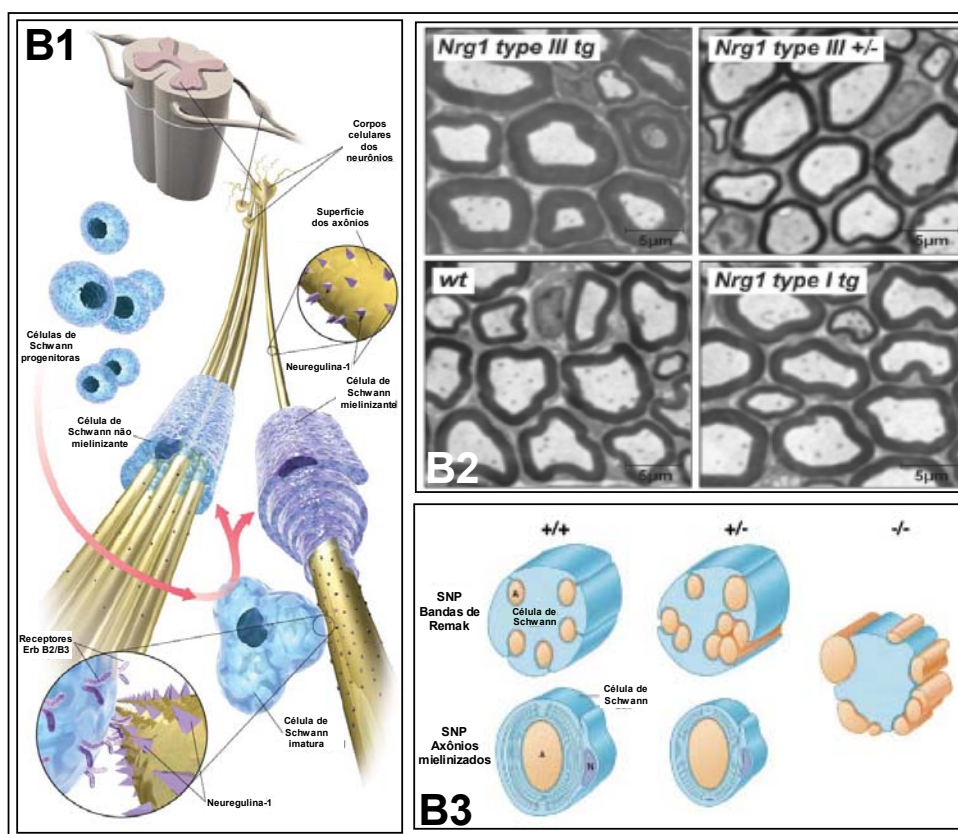
**Adaptado de: Poliak e Peles 2005**

célula de Schwann diz respeito à capacidade de formar a bainha de mielina em algumas populações de axônios periféricos.

Os estudos sobre o desenvolvimento das células de Schwann podem ser descritos em duas partes. A primeira descreve sua origem a partir das células da crista neural até a formação da célula precursora, com programa celular já definido (Jessen et al. 1994) (figura 3A). O grupo de Jessen e colaboradores caracterizaram a célula precursora de Schwann distinguindo-a das células da crista neural. Neste estudo foi observado que a proteína associada ao crescimento (GAP-43) era expressa somente nas células precursoras no período embrionário de E15 em roedores. Além da expressão de moléculas, a interação celular, o comportamento migratório e a regulação da apoptose foram parâmetros adicionais na caracterização das duas populações celulares. A análise da expressão de S100- $\beta$ , um marcador característico da célula de Schwann madura, mostrou que a porcentagem de células positivas para esta proteína aumenta de 7% para 90% entre E15 e E18 em camundongos. Esse estudo mostrou ainda que o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) era capaz de manter as células precursoras de Schwann vivas na ausência de axônios *in vitro*. Em camundongos nocaute para  $\beta$ -neuregulina, que é um fator produzido por neurônios, a sobrevivência das células precursoras de Schwann foi reduzida, sugerindo que os receptores desse fator (ErbB2 e ErbB3) estão presentes em células de Schwann e quando ativados levariam à sinalização de vias anti-apoptóticas (Garratt et al. 2000a e b). Os receptores ErbB2, no entanto, parecem não ser importantes para mielinização, proliferação ou sobrevivência de células de Schwann após lesão (Atanasoski et al., 2006). Durante a mielinização grandes mudanças ocorrem no padrão de expressão gênica das células de Schwann. A formação da bainha de mielina necessita de extensa síntese de



**Figura 3A – Ilustração do desenvolvimento das células de Schwann à partir das células de crista neural.** Células da crista neural dão origem a células precursoras de Schwann que por sua vez originam células de Schwann imaturas. A partir desse fenótipo imaturo as células de Schwann podem se tornar células mielinizantes, passando por um período pró-mielinizante ou podem se tornam células não mielinizantes. Uma célula mielinizante pode, no entanto, se tornar uma célula não mielinizante (ou vice-versa) durante a regeneração de um nervo periférico, passando pelo fenótipo de célula de Schwann imatura (setas pontilhadas). **Adaptado: Mirsky e colaboradores 2002**



**Figura 3B – O papel da Neuregulina-1 na mielinização por células de Schwann.** A quantidade de neuregulina-1 expressa nos axônios (pontos ao longo do axônio) periféricos durante o desenvolvimento determina se a célula de Schwann imatura será mielinizante ou não mielinizante (B1). Além disso a quantidade de neuregulina expressa por axônios determina a espessura da mielinização (B2 e B3) e a organização dos axônios pelas células de Schwann não mielinizantes (B3). **Adaptados de: Lemke e cols. 2006, Taveggia e cols. 2005, Michailov e cols. 2004**

membrana plasmática, de alterações na expressão gênica e de modificações em seu citoesqueleto para permitir formas espiraladas e o envolvimento dos axônios. Proteínas de mielina, as quais incluem periaxina, MAG, P<sub>0</sub>, MBP e PMP22, são fortemente expressas, enquanto outras proteínas, como N-CAM, p75 e GFAP, que estão presentes em células precursoras de Schwann e células maduras não mielinizantes têm sua expressão reduzida de forma marcante (Jaegle e Majjer, 1998). Sox10, Oct-6 e Krox-20 são fatores de transcrição induzidos durante a interação entre o axônio e a célula de Schwann necessários para que células precursoras de Schwann se tornem maduras (Britsch et al., 2001).

A proximidade das células de Schwann com axônios de neurônios cujas projeções encontram-se estabelecidas favorece o estado mielinizante. No entanto, com a ocorrência de uma injúria que leve ao rompimento de axônios periféricos, células mielinizantes podem se tornar não mielinizantes e sobreviverem, mesmo na ausência de interação axônio-glia (para revisão ver: Jessen e Mirsky, 2002). Células de Schwann maduras que perdem o contato com axônios em função de um rompimento por transecção, sofrem alterações na sua morfologia e na expressão gênica (Bajestan et al., 2006). Essas mudanças levam a alteração dos seus papéis biológicos no SNP.

O grupo de Barres demonstrou que o NGF é capaz de promover mielinização (expressão de MAG e P<sub>0</sub>) em axônios de neurônios do GRD pelas células de Schwann (Chan et al., 2004). No entanto, o oposto foi observado em relação à mielinização de axônios do GRD por oligodendrócitos, ou seja, o NGF inibiu a mielinização. Por outro lado, as proteínas plasmáticas S100-β e CNPase, presentes em células de Schwann e oligodendrócitos respectivamente, foram utilizadas como controle e não apresentaram alterações nas suas expressões na presença ou não

de NGF. Ainda quanto à mielinização, foi demonstrado que camundongos nocaute para uma molécula de superfície chamada periaxina causa deformação na morfologia do citoplasma de células de Schwann mielinizantes. (Court et al., 2004). As bandas de Cajal, que são projeções do citoplasma das células de Schwann vistas em corte transversal, praticamente desaparecem nesses camundongos. Foi visto ainda que o comprimento longitudinal das células de Schwann, ou seja, a distância internodal é severamente reduzida. Como consequência, esses animais apresentaram diminuição da velocidade de condução dos impulsos elétricos e também reduziram o tempo de corrida na roda giratória (Court et al., 2004).

Esse conjunto de dados mostra claramente que moléculas já conhecidas, como as neurotrofinas e a neuregulina têm apresentado novos papéis biológicos na biologia das células de Schwann e na sua interação com axônios no SNP. NGF e BDNF foram inicialmente descritos como fatores de sobrevivência neuronal e crescimento de axônios (para revisão ver; Barde, 1989 e Lykissas et al., 2007). No entanto, a literatura recente mostra que essas moléculas participam também nos processos de mielinização, controle da atividade elétrica neuronal e plasticidade sináptica (Arancio e Chao, 2007; Tolwani et al., 2004). As neuregulinas inicialmente foram descritas como fatores envolvidos na sobrevivência de precursores gliais, incluindo células precursoras de Schwann. Atualmente acredita-se que também participem dos processos de mielinização.

#### ***1.4- O Gânglio da Raiz Dorsal (GRD)***

As células do GRD, de acordo com o período do desenvolvimento em que se encontram, originam neurônios numa primeira etapa e células gliais numa etapa seguinte (Bixby et al., 2002, Kruger et al., 2002). Os neurônios do GRD com corpo celular pequeno possuem axônios de calibre fino não mielinizados e sua atividade fisiológica depende do contato com células de Schwann não mielinizantes. Esses neurônios possuem velocidade de condução dos impulsos elétricos lento e seus axônios também são denominados de fibras C (Ruscheweyh et al., 2007). Além disso esses neurônios têm função de conduzir impulsos relacionados a dor estimulada por calor (queimaduras). Recentemente foi demonstrado que neurônios com essa morfologia respondem ao NGF, através da ligação ao receptor de alta afinidade do tipo tirosina cinase A (TrKA). Por outro lado, neurônios com corpo celular médio possuem axônios de calibre médio que são mielinizados, denominados de fibras A $\beta$ . Os axônios desses neurônios conduzem o impulso elétrico com velocidade superior aos axônios não mielinizados das fibras C e possuem a função de mecanoreceptores. Além disso, foi observado que neurônios de corpo celular médio do GRD respondem ao BDNF através da ligação aos receptores de alta afinidade tipo tirosina kinase B (TrKB). Finalmente, os neurônios com corpo celular grande possuem axônios de grosso calibre e espessura de mielinização ainda maior que os axônios dos neurônios de corpo celular médio, e suas fibras são denominadas de A $\alpha$ . A velocidade de condução desses axônios é alta, estando esses neurônios relacionados com a propriocepção, isto é, a percepção do corpo no espaço. Esses neurônios são ativados pela neurotrofina-3 (NT-3) através da ligação aos receptores de alta afinidade tipo tirosina cinase-C (TrKC) (Teng e Hempstead, 2004).



Além das populações neuronais descritas acima, quatro populações de células gliais são encontradas no SNP: células de Schwann, células precursoras de Schwann, a teloglia e células satélite. Embora as células precursoras dêem origem e mantenham a população de células de Schwann presentes no GRD, não se sabe se essas células originam as células satélite. A interação entre neurônios e células satélite ocorre via junções elétricas após o período de diferenciação celular no desenvolvimento (Huang et al., 2006). Essas conexões são fundamentais para que moléculas produzidas pelas células satélite possam ser direcionadas para os neurônios. Dentre as moléculas transportadas através dessas junções estão NGF, BDNF, AMPc e o íon potássio. Esse fluxo favorece a neuroproteção e a manutenção da concentração ideal de íons importantes para o funcionamento dos neurônios do GRD. Essa comunicação, no entanto, também pode ocorrer na direção contrária, como foi demonstrado por Zhang e colaboradores (2007). Estes autores observaram que a estimulação elétrica aumentava a liberação de ATP contido nos neurônios em direção às células satélite através de um mecanismo dependente de influxo de cálcio no citoplasma dos neurônios. O ATP liberado, ao se ligar aos receptores P2X7 na superfície das células satélite, evoca um aumento da adesão e da comunicação com os neurônios. Enquanto o bloqueio dos canais de cálcio do tipo L inativa completamente essa comunicação neurônio-glia, a ativação dos receptores P2X7 induz a liberação do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). O TNF- $\alpha$  potencializa respostas mediadas por P2X7 aumentando a excitabilidade dos neurônios do GRD. Demonstrou-se recentemente, através de microscopia eletrônica, que o número junções elétricas entre células satélite e neurônios do GRD aumenta ao longo do desenvolvimento (Martinelli et al., 2004). Os dados morfológicos apresentados sustentam a hipótese de que a cooperação metabólica entre esses dois tipos

celulares é mantida ao longo da vida adulta. Quanto à proliferação glial no GRD adulto, foi demonstrada a presença de células BrDU positivas apenas em uma taxa basal, isto é, não mais que 5 células por corte longitudinal. Além disso, a análise da localização dessas células proliferantes sugere que tanto as células satélite perineuronais quanto as células de Schwann, além de precursoras de Schwann tenham uma taxa de proliferação basal no GRD. Apesar da demonstração de proliferação glial no GRD no adulto, ainda não está claro se essas células estabelecem comunicação funcional com os neurônios.

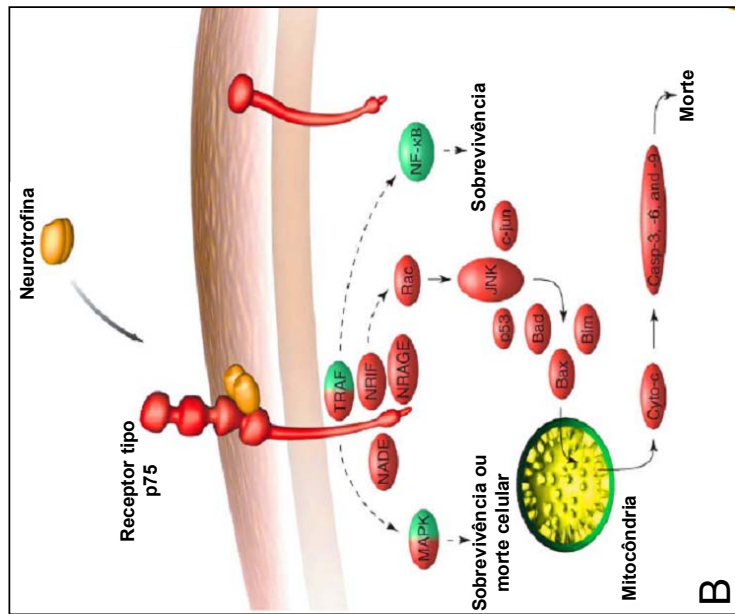
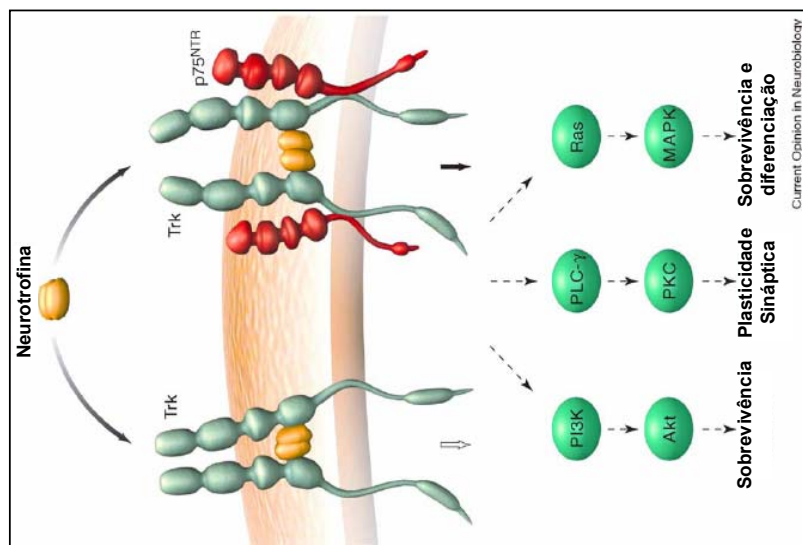
### ***1.5-A Regeneração do Sistema Nervoso Periférico***

Ao longo dos anos, pesquisadores de todo mundo vêm estudando os eventos regenerativos no sistema nervoso (SN). As conclusões obtidas no passado mostravam que depois de estabelecida a formação do SN adulto, qualquer injúria que levasse à perda de neurônios não poderia ser reparada, devido a incapacidade regenerativa desse tipo celular (para revisão ver: Sohur et al., 2006). Consequentemente, uma perda de neurônios representaria uma deficiência parcial ou total na função daquelas células que estivessem comprometidas. No entanto, hoje em dia é sabido que, embora limitada, o SNC adulto apresenta uma capacidade de regeneração. Sabe-se também que novos neurônios podem ser gerados no SN adulto, embora não se saiba ainda se os mesmos podem contribuir para restaurar funções perdidas após lesões (para revisão ver, Gage, 2002).

Diferente do SNC, o SNP tem a capacidade de manter a sobrevivência de grande parte dos neurônios cujas projeções axonais foram seccionadas após uma injúria.

Essa sobrevivência no SNP está relacionada com a distância entre a região transeccionada e o corpo celular do respectivo neurônio, de forma que, quanto menor for a distância entre a região de secção e o corpo celular, menor é a possibilidade dessas células sobreviverem. Uma explicação para esse fenômeno seria a dependência do aporte de fatores tróficos que proveriam a manutenção dos neurônios remanescentes e promoveriam a extensão dos axônios (Lankford et al., 1998). Muitos desses fatores, como BDNF, GDNF (fator de crescimento derivado da glia), NT3 e NGF são liberados por células de Schwann. Tais fatores tróficos ou neurotrofinas são amplamente descritos na literatura como pequenos peptídeos expressos por neurônios ou glia (para revisão ver, Markus et al., 2002). Logo após serem sintetizadas, essas macromoléculas são exportadas para a matriz extracelular e ligam-se a receptores de alta afinidade tipo TrK ou de baixa afinidade do tipo p75. Após a ligação, esses receptores são internalizados e podem ativar diferentes vias de sinalização intracelular, dependendo do complexo formado pelas subunidades dos receptores. Um dímero constituído de duas subunidades de receptores TrK pode levar a ativação das vias de PI3 cinase (PI3K), fosfolipase C (PLC) ou proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) que sinalizam para sobrevivência celular. A formação de tetrâmeros constituídos de duas subunidades de TrK e dois receptores tipo p75 também pode levar a ativação das mesmas vias de sinalização. No entanto, a ligação de uma neurotrofina ao receptor tipo p75 na ausência do receptor TrK pode levar a morte celular através da ativação da via de Jun Kinase (para revisão ver, Nykjaer et al., 2005) (Figura 4). As ativações das vias de sinalização que levam a sobrevivência neuronal geralmente estão associadas à repressão da atividade sinalizadora pró-apoptótica da proteína Bax e BaD, através da formação de um complexo com a proteína Bcl-2 (para revisão ver, Antignani e Youle, 2005).

A biologia das células gliais que formam a bainha de mielina no SNC e no SNP após uma injúria, ajuda a explicar do ponto de vista celular porque a regeneração é possível no SNP e não no SNC. Após a injúria de um nervo periférico que leve ao rompimento de axônios, as células de Schwann alteram sua morfologia, proliferam, migram e são capazes de se organizar formando vias permissivas à regeneração dos axônios (para revisão ver, Bunge, 1993). Diferente do que acontece no SNP, no SNC os oligodendrócitos proliferam de forma descontrolada após uma injúria que leve ao rompimento de axônios. Os astrócitos também tendem a proliferar de uma forma desorganizada (para revisão ver: Vargas e Barres, 2007). Essa proliferação desordenada leva a formação de uma cicatriz glial que forma uma barreira física para que os axônios centrais possam regenerar. Dentre as moléculas presentes nessa cicatriz glial os proteoglicanos de sulfato de condroitina (PGSC) apresentam-se como um dos principais componentes inibitórios para o crescimento axonal (para revisão ver Carulli et al., 2005). PGSP possuem uma variedade de papéis no SNC e SNP como: ligação às moléculas de forma que a sua atividade seja bloqueada, apresentação de moléculas para células e axônios, localização de moléculas ativas em sítios especiais e apresentação de fatores de crescimento para seus receptores. De maneira geral essas moléculas têm papéis biológicos durante o desenvolvimento, plasticidade e regeneração do SN. A demonstração mais direta de que a cicatriz glial inibe o crescimento axonal foi feita por Silver e Miller (2004). Eles demonstraram que neurônios do GRD micro transplantados estendiam seus axônios sobre a mielina do SNC intacta ou em degeneração. Todavia, ao adicionar fragmentos de tecido cicatricial ricos em PGSC sobre essa mielina o crescimento axonal foi impedido. Quanto à regeneração de axônios sensoriais e motores, investigações sobre a seletividade da regeneração de nervos mistos mostraram que os axônios se



**Figura 4- Ilustração do papel das neurotrofinas na sinalização para sobrevivência, diferenciação, plasticidade sináptica e morte celular. A dimerização dos receptores Trk que ocorre ao se ligarem de uma neurotrofina ou a formação de um tetramero constituído por duas unidades de Trk e duas unidades do receptor tipo P75 pode ativar vias de sinalização que promovem sobrevivência celular, plasticidade sináptica ou proliferação celular (4A). A ligação de uma neurotrofina ao receptor tipo p75 pode promover sobrevivência (verde) ou morte celular (vermelho) dependendo da via de sinalização ativada (4B). Adaptados de: Nykjaer e cols. 2005**

reinsiram nos tubos de células de Schwann randomicamente visualizados por técnicas com duplos traçadores (Brushart et al., 1988). Viu-se ainda que, após transecção e sutura do nervo femoral, motoneurônios com projeções regenerativas inseridas em tubos de célula de Schwann só sobrevivem caso haja formação de uma nova placa motora (Brushart et al., 1993). Axônios que entraram em tubos de células de Schwann incorretos, isto é, tubos próprios para axônios sensoriais, não tiveram contato com fatores tróficos e pistas moleculares adequadas que os levariam à extensão axonal completa (Brushart et al., 1993). Esse fenômeno foi chamado de "pruning" (poda) e é associado à incapacidade dos axônios de se estenderem ao longo de uma via. Resultados semelhantes foram obtidos com a transecção e sutura do nervo femoral seguido ou não pela remoção do GRD. Ao comparar a regeneração do componente motor e sensorial em estágios iniciais após transecção (72 horas), observou-se que neurônios sensoriais regeneram melhor do que os motoneurônios (Suzuki et al., 1998).

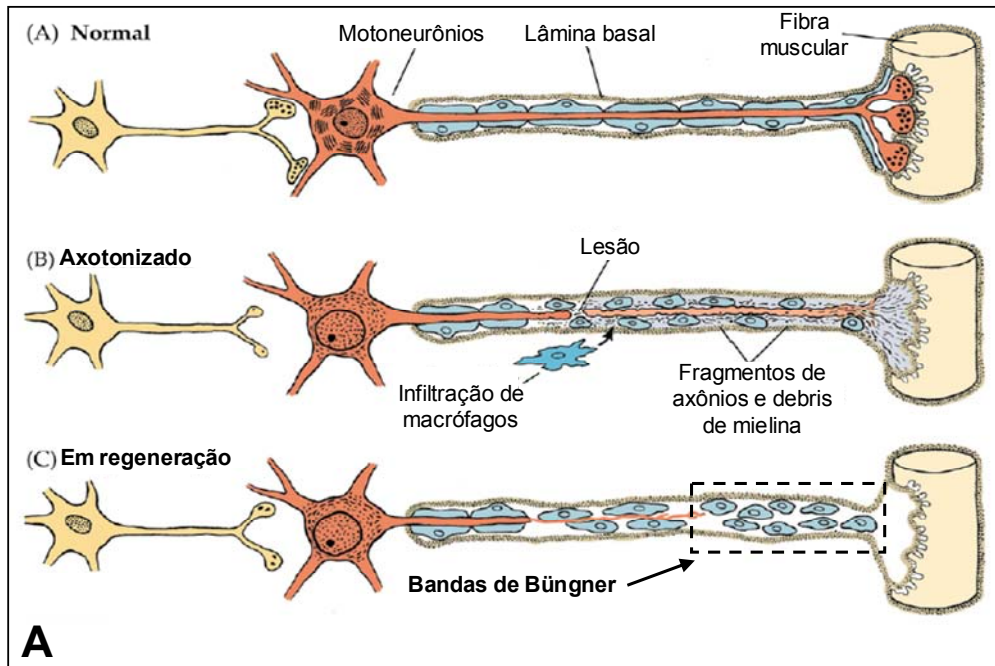
O transporte ao longo dos axônios pode ser definido como anterógrado, isto é, dos corpos celulares para a extremidade dos axônios ou retrógrado, tendo direção contrária. Trabalhos utilizando modelos de transecção total do nervo ciático mostram que existe um aumento na produção e no transporte de fatores tróficos ao longo dos axônios sensoriais em regeneração. Neurotrofinas como o BDNF tem sua expressão e transporte axonal anterógrado elevados após injúria do nervo ciático procedida por dupla ligadura (Tonra et al. 1998). No entanto, durante esses eventos, moléculas transportadas de forma anterógrada ao longo dos axônios como a substância P e a calcitonina, não apresentam aumento no seu transporte, demonstrando não haver aumento generalizado no transporte axonal (Tonra et al. 1998).

Grande parte dos trabalhos relacionados com as neurotrofinas e com o transporte axonal mostra o sentido retrógrado de transporte desses fatores (Henry et al., 1975). Esse fenômeno é coerente com o seu papel biológico no corpo celular em eventos anti-apoptóticos. O transporte das neurotrofinas como o BDNF no sentido retrógrado sugere sua interação com células de Schwann em proliferação (Dobrowsky et al., 1995). Num trabalho posterior foi demonstrado que as neurotrofinas são capazes de regular o estado não mielinizante e migratório de células de Schwann (Yamauchi et al., 2004). Através da ativação das vias de Rac-1 e Cdc42 nas células de Schwann, a neurotrofina-3 (NT-3) através do receptor TrkC induz o estado não-mielinizante e migratório dessas células. O BDNF ao se ligar no receptor p75, no entanto, é capaz de bloquear a migração de células de Schwann através da sinalização por Rho A e do fator de troca do nucleotídeo guanina Vav2 (Yamauchi et al., 2004).

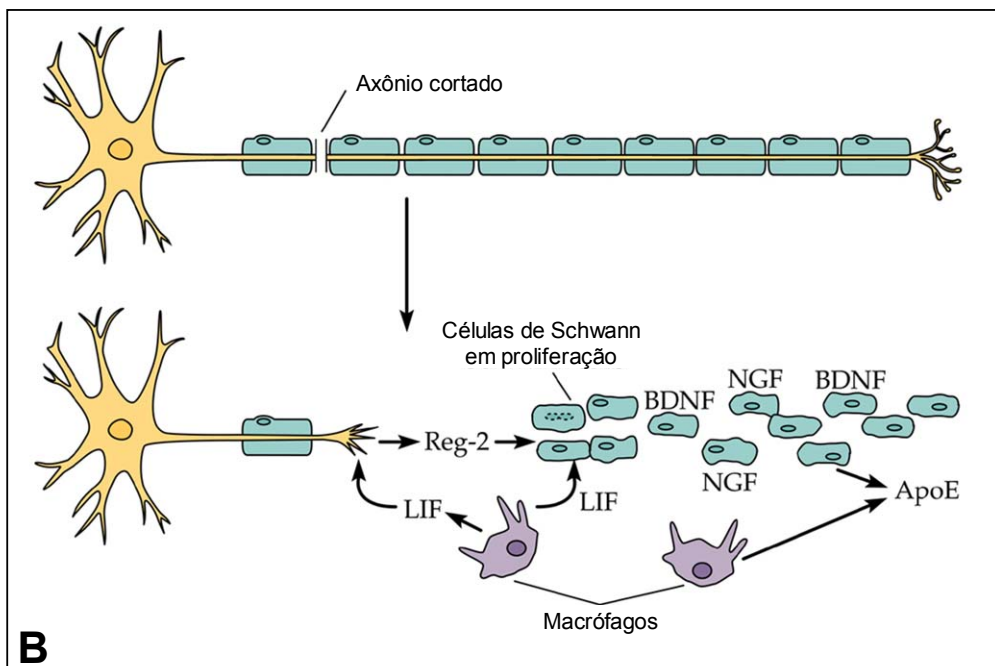
No nervo periférico ocorre um fenômeno denominado degeneração Walleriana após eventos de injúria por transecção ou por esmagamento. Este fenômeno caracteriza-se inicialmente pela mobilização de células fagocitárias do sistema imune para a região da lesão. Essas células, os macrófagos, desempenham dois importantes papéis: fagocitar o material resultante da degeneração das fibras nervosas (fragmentos da bainha de mielina decomposta e fragmentos de axônios) e liberar fatores que estimulem a proliferação das células de Schwann (Guertin et al., 2005). Com a proliferação das células de Schwann ocorre então a formação de uma estrutura denominada banda de Büngner (Figura 5a). Tal estrutura, cuja formação ocorre pela sobreposição de células de Schwann em seu estado não mielinizante, constitui uma via permissiva a regeneração axonal. Nesta via, axônios em regeneração reconhecem pistas moleculares e podem se orientar corretamente

durante a extensão (Aguayo et al.,1981). Os eventos iniciais de orientação dos axônios periféricos são fundamentais para o reencontro das fibras em regeneração com seu tecido alvo em períodos posteriores. No início da regeneração, o estado mielinizante da célula de Schwann não é favorável à extensão dos axônios. No entanto, o estado não-mielinizante permite a passagem das fibras através da via sem que haja a formação de uma barreira física (Bunge, 1993 e 1994). Uma molécula essencial para os fenômenos iniciais de regeneração de nervos periféricos é a fibrina (Akassoglou et al., 2002). Essa molécula se origina a partir da clivagem de um peptídeo precursor de maior peso molecular, o fibrinogênio. Tanto a fibrina como o seu precursor, são peptídeos comuns nos processos de coagulação. Com a lesão de nervos periféricos, alguns pequenos vasos se rompem e uma quantidade de plasma sanguíneo entra em contato com a região lesionada. A fibrina contida nessa região passa então a desempenhar um importante papel sobre a proliferação e o estado não mielinizante da célula de Schwann. Estudos *in vitro* mostraram que células de Schwann quando plaqueadas sobre um substrato contendo fibrina proliferam numa taxa superior à condição que não contém fibrina (Akassoglou et al., 2003). Neurotrofinas podem modular negativamente e positivamente a mielinização. O bloqueio experimental dos receptores TrKB promoveu aumento da produção de proteínas da mielina e mielinização (para revisão ver Chen et al., 2007). No entanto, o bloqueio experimental dos receptores p75 mostrou efeitos inibitórios sobre a mielinização (Song et al., 2006) Três moléculas vêm sendo descritas como importantes agentes ativadores de vias de sinalização para sobrevivência e proliferação de células de Schwann após lesão *in vitro* e *in vivo*: o NGF, a NRG-1 e o TGF- $\beta$ 1. A perda de contato com axônios na região distal após uma lesão aumenta a expressão dos receptores p75 nas células de Schwann (Heumann et al., 1987a,





**Figura 5A- Ilustração dos processos decorrentes ao rompimento de um axônios periférico.** Após o rompimento de um axônios funcional, células de Schwann alteram sua morfologia, reduzindo seu tamanho e aumentam sua proliferação. Ocorre também a invasão de macrófagos no sítio de lesão (**Ab**). Esses fenômenos em conjunto são chamados degeneração Walleriana. Células de Schwann em proliferação são capazes de se organizar e formar vias permissivas à passagem de axônios em regeneração (**Ac**, Bandas de Büngner, seta). **Adaptado de: From Neuron to Brain. J. Nicholls, 2001.**

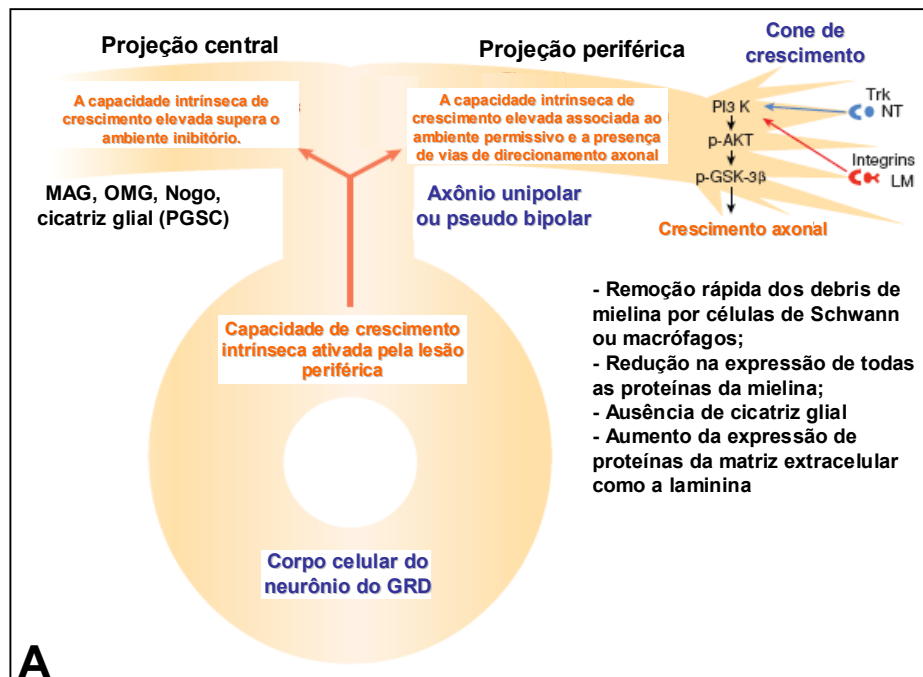


**Figura 5B- Ilustração exemplificando a atividade trófica derivada de macrófagos e células de Schwann durante a regeneração do SNP.** Macrófagos ativados liberam LIF que age em axônios auxiliando na regeneração e também em células de Schwann auxiliando na proliferação. Células de Schwann, por sua vez, aumentam a produção de NGF e BDNF. Essas neurotrofinas podem agir em células de Schwann vizinhas e também em neurônios cujos axônios estejam em regeneração. **Adaptado de: From neuron to brain. J. Nicholls, 2001.**

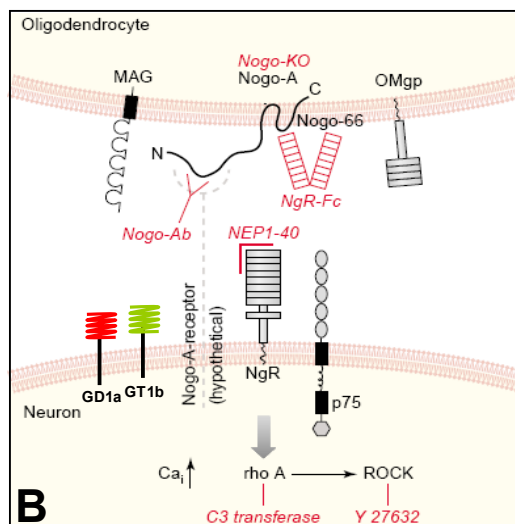
1987b). Essa mudança altera a sensibilidade das células ao NGF, que neste caso leva a sobrevivência dessas células. A NRG-1 que é liberada por axônios intactos ou em regeneração se liga a receptores do tipo ErbB1 e B2. Essa ligação aumenta a sobrevivência das células de Schwann. A ligação concomitante de NRG-1 com TGF- $\beta$ 1 aos seus respectivos receptores induz aumento de proliferação dessas células durante a regeneração (D'Antonio et al., 2006). Além disso, TGF- $\beta$ 1 aumenta a atividade trófica derivada das células de Schwann para a regeneração dos axônios (Sulaiman e Gordon 2002).

Estudos demonstraram que a ligação entre MAG, presente na superfície das células de Schwann e de oligodendrócitos, e os gangliosídeos GD1a e GT1b, presentes na membrana dos axônios em regeneração contribuem para o bloqueio dos processos de extensão neurítica de culturas primárias de neurônios granulares do cerebelo (Vyas et al., 2002) (Figura 6). Em experimentos utilizando imunobloqueio, a inibição da via biosintética desses gangliosídeos não resultou em comprometimento da extensão dos neuritos em cultura de células de camundongos nocaute para MAG. No entanto, a competição entre MAG e laminina pela ligação aos gangliosídeos GD1a e GT1b no SNP, não bloqueia a regeneração dos axônios do SNP (MacKerracher et al., 2002). O bloqueio do acesso da MAG ao coto distal da lesão, através de injeções diárias de anticorpos anti-MAG, acelerou e elevou a regeneração motora preferencial (Mears et al., 2003). A ação desses anticorpos foi significativamente maior na regeneração de axônios sensoriais que não fazem parte do circuito (ou arco) reflexo com motoneurônios no mesmo nervo estudado. Outra molécula de superfície de membrana, associada à inibição do crescimento de neuritos foi a glicoproteína de mielina de oligodendrócitos (OMgp). Viu-se que os receptores do tipo NOGO possuem alta afinidade de ligação por esta âncora de

glicosilfosfatidilinositol (âncora de GPI). A formação do complexo entre essas duas entidades resultou na inibição da extensão neurítica de explantes de neurônios do GRD mantidos em cultura (Wang et al., 2002). Uma série de trabalhos subsequentes demonstrou a existência de um conjunto de moléculas de superfície tanto na membrana dos axônios como na membrana da glia embainhante (para revisão ver Schwab 2004) (Figura 6B). Essas moléculas localizadas em ambas as células, ao interagirem, bloqueiam o crescimento neurítico através da ativação de Rho A. No SNP, moléculas da matriz extracelular possuem expressão e secreção elevada mesmo após o desenvolvimento. A laminina impede a interação entre as moléculas de superfície das células de Schwann e dos cones de crescimento relacionados com o bloqueio da regeneração axonal (MacKerrecher et al., 2002). Outra molécula envolvida com regeneração e matriz extracelular é a galectina-1, uma glicoproteína ancorada na membrana dos axônios (Horie et al., 2004). Em um estudo utilizando modelos de esmagamento e transecção do nervo ciático de ratos mostrou-se que a galectina-1 tem papel fundamental no crescimento dos axônios em regeneração via ativação de macrófagos. Neste estudo, foi sugerido que a galectina-1 atua como uma molécula que favorece a mobilidade das células de Schwann levando a maior extensão dos axônios do GRD tanto *in vitro* como *in vivo*. Trabalhos anteriores mostraram que a galectina-1 é o principal receptor para o gangliosídeo GM1 em culturas de neuroblastoma humano (Kopitz et al., 1998). A morfologia dos neurônios do GRD e a sua disposição anatômica permitiram o surgimento de evidências muito importantes para explicar fenômenos regenerativos após a lesão. Diversas moléculas, entre fatores de transcrição, proteínas de citoplasma ou de membrana e glicolipídeos, têm a sua expressão alterada no GRD após a secção de axônios das projeções central ou periférica. Após a lesão dos axônios periféricos dos neurônios



**Figura 6A. Regeneração axonal em nervos periféricos.** Proteínas da matriz extracelular como a laminina se ligam aos receptores tipo integrinas no cone de crescimento ativando a via de PI3, resultando no acúmulo de Akt nos sítios de contato axônios-laminina. Akt ativada fosforila e inativa GSK-3β. Essa inativação regula proteínas associadas ao citoesqueleto e promove crescimento axonal. Neurotrofinas podem também participar da promoção do crescimento através dos receptores Trk e ativação de vias de sinalização similares as da laminina. A lesão periférica ativa a capacidade intrínseca de crescimento dos axônios centrais. Essa capacidade intrínseca supera o ambiente inibitório gerado pela mielina do SNC. **Adaptado de: Chen e cols., 2007.**



**Figura 6B- Interação entre moléculas de superfície dos axônios e da glia embainhante são capazes de inibir a regeneração axonal.** A glicoproteína associada a mielina (MAG), a proteína NOGO e a glicoproteína de mielina de oligodendrócitos (OMgp) estão presentes na superfície dos oligodendrócitos. Os Gangliosídeos GD1a e GT1b, o receptor da proteína NOGO e os receptores tipo p75 estão presentes na superfície dos cones de crescimento nos axônios. A interação entre essas moléculas promove a ativação da via de sinalização rhoA/ROCK que é inibitória para o crescimento axonal. Estratégias farmacológicas (em vermelho) foram desenhadas na tentativa de inibir essa via de sinalização inibitória ao crescimento. **Adaptado de: Schwab, 2004.**

do GRD, observou-se o aumento da capacidade regenerativa da projeção central (Richardson et al., 1984). A lesão apenas de axônios centrais, não seria suficiente para ativar um programa celular que permitisse sua regeneração. No entanto, a lesão do axônio periférico ativaria um programa celular permitindo a extensão do axônio de projeção central. Mais tarde, mostrou-se o envolvimento de duas proteínas nesse fenômeno: GAP-43 e CAP-23 (Bomze et al., 2001). O aumento em conjunto na expressão dessas proteínas nos neurônios do GRD leva a uma maior taxa de crescimento axonal das projeções centrais lesionadas, em camundongos transgênicos, sem que houvesse lesão periférica. A super expressão de apenas uma das proteínas não foi capaz de reproduzir o fenômeno.

Após a lesão por esmagamento do nervo ciático de ratos adultos foi também observado o aumento da expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 tanto em neurônios do GRD, quanto em motoneurônios e células gliais do SNP. No nervo ciático o pico de expressão desse gangliosídeo foi correlacionado com o início da regeneração axonal, ou seja, 7 dias após lesão (Ribeiro-Resende et al., 2007 anexo 2). Esses dados sugerem que esta molécula tenha um papel importante nos períodos iniciais da regeneração de nervos periféricos.

Com relação à reinervação feita pelos axônios em regeneração, foram realizados estudos de reinervação de músculos de ratos adultos por axônios motores do nervo ciático após transecção e reconexão (Ijkema-Paassen et al., 2002). Neste estudo, utilizou-se a técnica de revelação da enzima de degradação da acetilcolina (acetilcolinesterase) na placa motora dos músculos solear, gastroquinêmio e tibial anterior. Os resultados obtidos após 21 semanas mostraram que três quartos das placas motoras presentes no músculo tibial anterior, metade das placas presentes no músculo lateral gastroquinêmio e um terço das placas motoras do músculo solear

reestabeleceram sua morfologia normal após a transecção. Apesar desse reestabelecimento da morfologia normal de inervação das placas motoras, ocorreram anormalidades de locomoção nestes animais.

Ijkema-Paassen e colaboradores (2001) em estudos anteriores, também mostraram a mudança na distribuição do tipo de fibra muscular innervada por axônios regenerados. Em condições normais, a maioria das fibras do músculo lateral gastrocnêmio e do músculo tibial anterior são do tipo II e o músculo solear contém aproximadamente 80% de fibras do tipo I. Sete semanas após a transecção e reconexão do nervo ciático, todos os grupamentos musculares passam a conter proporções similares do tipo I e II das suas fibras musculares. Estudos utilizando proteínas marcadas com radioisótopos e marcação anterógrada de axônios em regeneração mostrou que a estimulação elétrica com pulsos de 20Hz na região de lesão, durante 1 hora, faz com que motoneurônios regenerem (Brushart et al., 2002).

Em suma, com relação a regeneração do SNP, poderíamos mencionar três pontos fundamentais. 1- A elevação dos níveis intracelulares de AMPc em nervos periféricos desempenha um papel fundamental na ativação da capacidade intrínseca do neurônio para regenerar. O sucesso da recuperação funcional depende de um ambiente permissivo e da capacidade intrínseca de crescimento do neurônio (Qiu et al., 2002). 2- O programa molecular para controlar a remielinização de células de Schwann denervadas em nervos periféricos é similar a diferenciação de células de Schwann imaturas em nervos em desenvolvimento (Mirsky et al., 2002). No entanto, os mecanismos moleculares que controlam a proliferação de células de Schwann são diferentes comparando-se a regeneração e o desenvolvimento. 3- Os dois maiores moduladores endógenos da remielinização das células de Schwann são moléculas da matriz extracelular e fatores neurotróficos (Zhang et al., 2000; Song et

al., 2006; Jungnickel et al., 2006; Sulaiman e Gordon, 2002; Chen e Strickland, 2003; Akassoglou et al., 2002; Willians e Brophy, 2002)

### ***1.6- Reparo de Nervos Periféricos Utilizando Próteses Tubulares.***

Uma das maiores dificuldades para que um nervo transeccionado possa regenerar e alcançar o coto distal é a orientação correta das fibras proximais até sua inserção durante períodos iniciais da lesão. Alguns modelos de reconexão de nervos periféricos vêm sendo aperfeiçoados visando maior viabilidade dos axônios potencialmente capazes de se projetar em direção ao tecido-alvo. O estudo de materiais biocompatíveis ou inertes em relação ao tecido nervoso em regeneração constitui uma linha de estudos paralela aos estudos sobre regeneração (Langone et al., 2005).

As próteses comumente descritas na literatura podem ser divididas em dois grupos. As de material biológico podem ser obtidas a partir de vasos de grande calibre, pequenos segmentos de nervos, próteses a base de colágeno e tecido acelular derivado de vasos ou músculos (Giardino et al., 1995) Este último, geralmente é obtido a partir do congelamento do tecido de interesse, seguido da remoção de restos celulares e obtenção da matriz de colágeno. O segundo grupo de próteses é obtido a partir de material sintético como silicone, polietileno, poliésteres e outros polímeros não absorvíveis. Algumas próteses tubulares sintéticas têm sido projetadas para serem não só biocompatíveis, mas também biodegradáveis. Dessa forma não seria necessário retirar posteriormente o tubo utilizado para reconexão do nervo transeccionado.

Langone e colaboradores (1995) demonstraram que a tubulinização do nervo ciático de camundongo lesionado utilizando próteses tubulares de poli(organo)fosfazeno (PEIP, poli [(etilalanato)<sub>1.4</sub>(imidazolil)<sub>1.6</sub>fosfazeno]) mostrou-se eficaz na orientação das fibras em extensão. Neste estudo comparou-se a eficiência de próteses tubulares à base de PEIP com as tradicionais próteses de silicone. Utilizando-se um segmento de 10mm dos tubos, após completa transecção do nervo ciático na região próxima à bifurcação (*pinch notch*), os cotos proximal e distal foram imediatamente inseridos e suturados no interior do tubo, resultando num intervalo de 5mm entre as duas extremidades inseridas. Observou-se a presença de tecido conectivo reativo ao redor de ambas as próteses 10 e 45 dias após o implante. No entanto, a cápsula de tecido conectivo ao redor da prótese à base de PEIP foi reduzida em relação à prótese de silicone. O material biológico interno ao redor do polímero de PEIP foi analisado através de métodos histoquímicos. Foram encontrados fibroblastos, estruturas ricas em colágeno e alguns monócitos. Apesar das vantagens da utilização de próteses à base de PEIP, a análise de cortes transversais mostrou que a organização das fibras no interior do tubo foi maior utilizando-se próteses de silicone. A análise ultra-estrutural mostrou extensa erosão do biomaterial associado à presença de monócitos e, 42 dias após o implante, foi observado que o diâmetro do coto proximal inserido no tubo de PEIP parecia ser maior que o coto proximal dos nervos implantados nos tubos de silicone.

Uma crítica feita ao uso de próteses não neurais diz respeito à baixa capacidade de sustentar a regeneração por grandes intervalos e permitir o acesso de células do sistema imune e a revascularização da área em regeneração. A bioengenharia tecidual propõe-se então a estudar modelos que sustentem essa regeneração ao longo de vias relativamente extensas. Fansa e colaboradores (2001) utilizaram



próteses de 2 cm à base de tecido muscular e venoso "acelularizados", obtidos por congelamento, para o nervo ciático transecionado. Essas próteses foram previamente enxertadas com células de Schwann mantidas em cultura. Este trabalho monitorou a revascularização e a invasão por macrófagos do tecido em regeneração. Essas duas abordagens são fundamentais para a manutenção da sobrevivência das células de Schwann e conseqüentemente para a regeneração do nervo periférico. Tanto as próteses derivadas de tecido venoso como muscular apresentaram maior revascularização e invasão por macrófagos se comparadas a próteses obtidas com segmentos de nervo periférico. Estudos preliminares mostraram que próteses obtidas com tecido acelular permitiram maior taxa de regeneração do coto proximal do nervo ciático se comparados com a utilização de tecidos íntegros (Fansa et al., 1999). Nakamura e colaboradores (2004) reconectaram o nervo peroneal de cães utilizando tubos de ácido poliglicólico contendo colágeno polimerizado no seu interior. No interior do tubo havia um intervalo de 15mm entre o coto proximal e o coto distal. Três semanas após o reimplante, os cotos estavam reconectados e 18 dias após o implante foram detectados potenciais musculares evocados através de eletrofisiologia (MEPs) e potenciais somatosensoriais evocados (CNAPs). Seis meses após a cirurgia, os animais que receberam o tubo contendo colágeno apresentaram MEPs e CNAPs com menor tempo de latência e maior pico de voltagem se comparados com os animais cujos cotos foram reconectados com fragmentos autólogos de nervos periféricos.

A reconexão das extremidades do nervo transecionado no interior das próteses tubulares têm grande importância para a obtenção de dados confiáveis sobre a regeneração dos axônios periféricos. Falhas neste procedimento, que

permitam a mobilidade do segmento inserido no interior do tubo, podem levar a erros na quantificação do crescimento dos axônios. Dentre as técnicas mais utilizadas estão à sutura das extremidades na prótese tubular com fio ultrafino, o clampeamento das extremidades transeccionadas no tubo utilizando pequenos fios metálicos inoxidáveis e a utilização de adesivos cirúrgicos. Alguns autores, por estarem mais interessados em estudar o crescimento axonal especificamente no interior do tubo, não têm grande preocupação com a reconexão do coto distal na prótese tubular. Todavia, para se estudar a regeneração dos axônios nos tubos de células de Schwann da região distal, é importante garantir o acesso desses axônios à região correta do nervo. Schlosshauer e colaboradores vêm contribuindo intensamente com estudos de biotecnologia e bioengenharia para a regeneração de nervos periféricos (Lietz et al., 2006). Com a aplicação de microfilamentos contendo células de Schwann ou fibroblastos, orientados longitudinalmente no interior de próteses tubulares, o grupo tem acompanhado a biocompatibilidade dessas células nos filamentos e no tubo *in vitro* (Lietz et al., 2006). O objetivo principal seria mimetizar as bandas de Büngner formadas pelas células de Schwann durante a regeneração dos nervos periféricos. Nesse sentido, foram adicionados explantes de GRD de ratos embrionários sobre placas de cultura contendo os mesmos filamentos, apresentando células de Schwann, fibroblastos ou nenhum tipo celular aderido na superfície. Foi observado que os neuritos crescem mais e em maior número na presença dos filamentos contendo células.

A eficiência das próteses tubulares na regeneração dos nervos periféricos foi demonstrada também na regeneração dos nervos facial, óptico e femoral (Dezawa et al., 2002, para revisão; Brushart, 1988).

### ***1.7- Características das Células da Medula Óssea e o seu Potencial Terapêutico em Lesões no Sistema Nervoso Periférico.***

A medula óssea contém duas populações de células precursoras que dão origem ao estroma (células com função estrutural) ou a células hematopoéticas. As células-tronco hematopoéticas dão origem a precursores mielóides e precursores linfóides. Esses precursores linfóides ou mielóides formam toda linhagem hematopoiética do tecido sanguíneo. O grupo de Irving Weissman (Wagers et al., 2002), através de técnicas de enxerto, inseriu células precursoras hematopoiéticas multipotentes ( $c\text{-Kit}^+$ ,  $\text{Lin}^-$ ,  $\text{Thy1.1}^-$ ,  $\text{Sca-1}^+$ ) de camundongos GFP em camundongos normais. A análise minuciosa dos tecidos dos animais receptores revelou o baixo potencial desse tipo celular para originar tecidos não hematopoiéticos. Esses achados, contrariando trabalhos anteriores (Lagasse et al., 2000), sugeriram que a produção de células não hematopoiéticas não é uma função típica de células precursoras hematopoéticas pluripotentes.

O estroma da medula óssea contém uma população de células-tronco denominada de células mesenquimais ou estromais. Grande parte dos autores sustentou até recentemente a hipótese de que células-tronco mesenquimais são células fibroblastóides com grande capacidade de diferenciação. No entanto diversos trabalhos posteriores mostraram muita controvérsia em relação ao potencial dessas células como fonte de células tronco capazes de reparar perdas celulares causadas por uma lesão ou uma doença no sistema nervoso. O grupo de Catherine Verfaillie (2002) após seguir rigorosos critérios de seleção clonal mostrou que as células progenitoras multipotentes adultas originaram células nos três folhetos embrionários, além de originar células da linhagem hematopoiética. Estudos previamente realizados mostraram que subpopulações de células derivadas da

medula óssea também são capazes de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários (Jiang et al., 2002). Apesar da elegância do trabalho, o número de células ditas diferenciadas de uma potencial célula-tronco mesenquimal não foi suficiente para explicar os benefícios trazidos em terapias celulares no sistema nervoso.

Muitos pesquisadores passaram a questionar o potencial dessas células tronco e boa parte deles passou a acreditar que os processos de fusão celular seriam a melhor forma de explicar a aparente diferenciação observada (Terada et al., 2002, Alvarez-Dolado et al., 2003). Dezawa e colaboradores (2001) demonstraram que células mesenquimais de rato, quando induzidas a expressar proteínas de células de Schwann como S100, GFAP, O<sub>4</sub> e p75 assumem uma organização em cultura semelhante à cultura de células de Schwann. Essas células foram submetidas a transfecção utilizando retro-vírus contendo um plasmídeo que expressa GFP. Após transfecção e "pré-diferenciação" em cultura, essas células foram injetadas no interior de uma prótese tubular inserida em ratos, cujo nervo ciático foi transecionado e reconectado no interior da prótese. A análise por microscopia eletrônica demonstrou que essas células injetadas foram capazes de se integrar ao tecido nervoso em regeneração e se tornarem células mielinizantes. A injeção dessas células também aumentou a taxa de regeneração dos axônios da região proximal do nervo. Até então esses dados não contavam com a possibilidade de haver uma atividade parácrina derivada de células da medula óssea. Pereira Lopez e colaboradores (2006) posteriormente demonstraram que, após transecção total e conexão do nervo ciático em tubos de colágeno, células do estroma da medula óssea injetadas no interior desses tubos auxiliavam na mielinização e no crescimento axonal no interior tubo. Foram ainda apresentadas evidências da

liberação de NGF através da detecção do RNAm dessa neurotrofina. A presença do RNAm de outros fatores tróficos derivados de células do estroma da medula óssea tais como, BDNF, CNTF e GDNF foi também demonstrado por Chen e colaboradores (2007). Esse grupo demonstrou também a presença dos fatores tróficos no meio de cultura dessas células após quatro passagens utilizando a técnica de ELISA. Em outro trabalho foi demonstrado que subpopulações de células tronco mesenquimais humanas expressam uma variedade de moléculas neuro regulatórias capazes de promover sobrevivência celular e neuritogênese. Nessas populações celulares foi descrita a presença de BDNF e NGF. No entanto, não houve detecção da presença de outros fatores tróficos como NT-3, NT-4 ou Neuregulina (Chen et al., 2007).

## 2- Objetivos

---

Tendo em vista as informações sobre o potencial regenerativo do SNP e os desafios demonstrados para que um número significativo de neurônios possa sobreviver e regenerar seus axônios, os objetivos desse trabalho foram:

- Avaliar *in vivo* a contribuição das células derivadas da medula óssea para a sobrevivência dos neurônios do GRD e dos neurônios motores presentes no corno anterior da medula espinhal lombar, após a transecção total do nervo ciático de ratos adultos;
- Seguindo o mesmo modelo experimental, procurou-se avaliar *in vivo* a contribuição das células derivadas da medula óssea para a regeneração dos axônios dos mesmos neurônios sensitivos e motores;
- Analisar *in vivo* o potencial de diferenciação de populações de células-tronco derivadas da medula óssea em células de Schwann;
- Analisar *in vitro* a existência de atividade trófica derivada de células da medula óssea que pudesse promover sobrevivência e neuritogênese em populações neuronais em desenvolvimento;
- Analisar *in vitro* e *in vivo* a proliferação glial após lesão do nervo ciático e a contribuição das células derivadas da medula óssea para essa proliferação.

### **3- Materiais e Métodos**

---

#### ***3.1- Animais.***

Neste estudo utilizamos ratos machos Lister ou Wistar, com aproximadamente três meses de idade e camundongos da linhagem black C57-6 selvagens e modificados por conter o gene que expressa a proteína fluorescente verde sob o controle do promotor de expressão da actina. Esses ratos foram criados no biotério de roedores do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ com fornecimento diário de água fresca e comida. Os camundongos foram criados sob as mesmas condições no biotério de roedores da fundação BioRio. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de uso de animais em pesquisa do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

#### ***3.2- Obtenção de Células da Fração Mononuclear da Medula Óssea.***

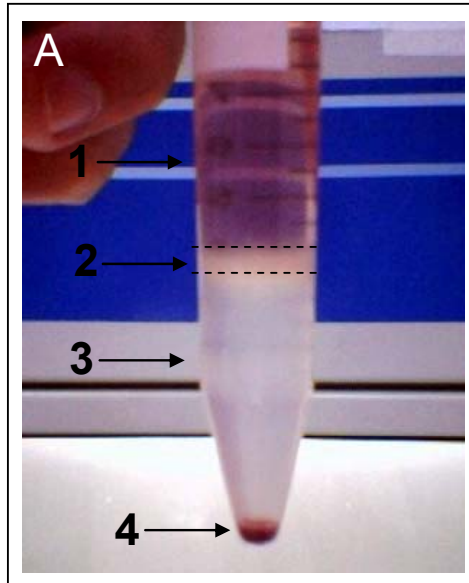
Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após anestesia em câmara com vapor de éter, e seus membros inferiores foram deslocados por desprendimento da cabeça do fêmur do acetábulo. Foram obtidos então o fêmur e a tíbia removendo todos os músculos da coxa e perna. Os ossos foram mantidos em PBS 10mM estéril em uma placa de Petri. Em seguida, no fluxo laminar, fêmur e tíbia foram separados e um último procedimento de limpeza foi realizado visando retirar restos de cartilagem e tendões presentes nas epífises ósseas.

As epífises ósseas foram então cuidadosamente removidas e a medula óssea foi totalmente transferida para um tubo plástico estéril de 15mL, utilizando-se uma seringa descartável estéril contendo meio de cultura  $\alpha$ -MEM (meio mínimo essencial) com 10% de soro fetal bovino (Life Sciences), adicionado de penicilina e estreptomicina (1,0mg/mL, Sigma) e fungizona (2,5mg/mL, Sigma). Após a aspiração, as células da medula foram dissociadas mecanicamente utilizando-se uma pipeta Pasteur estéril. Em seguida, as células dissociadas em meio de cultura foram centrifugadas durante 5 minutos com velocidade de 260 g. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi resuspenso em 3 mL de meio de cultura.

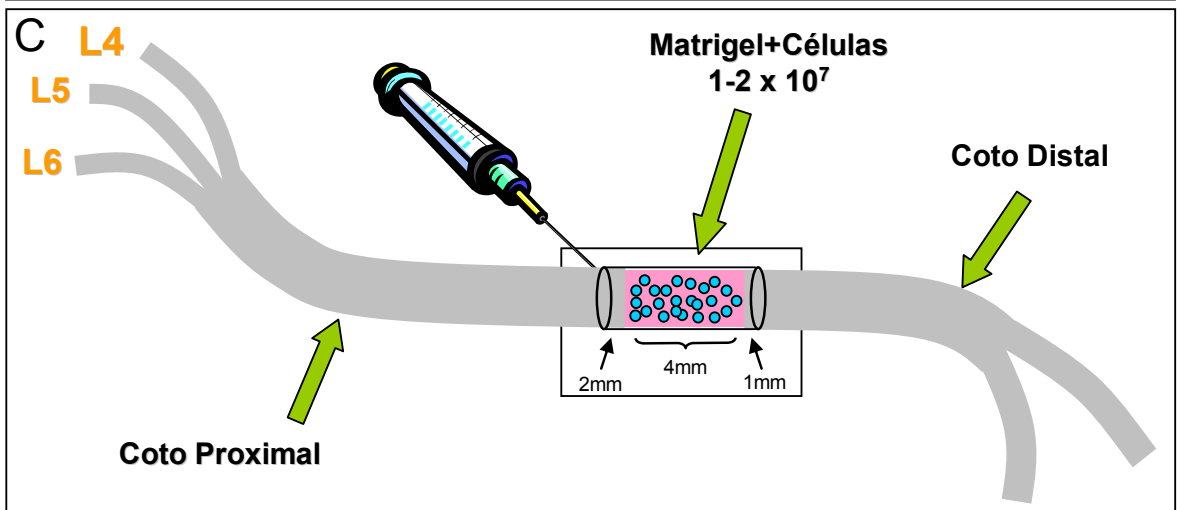
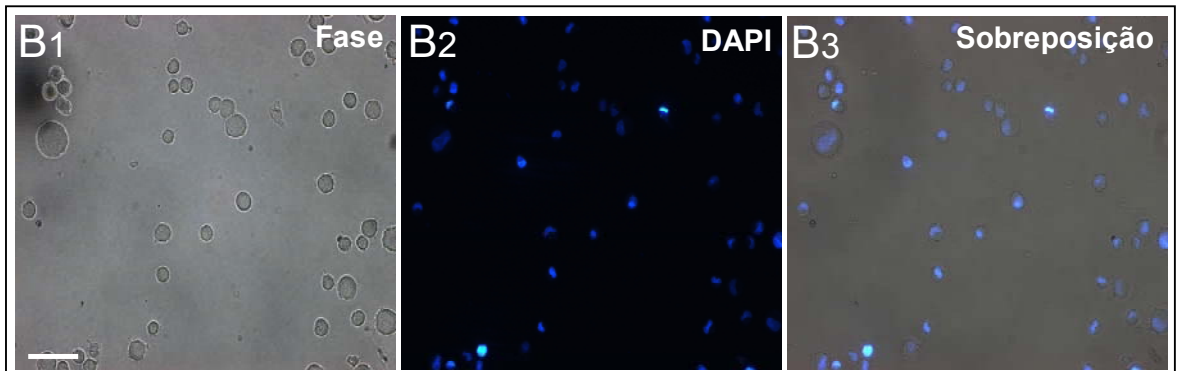
Para obtenção da fração de células mononucleares da medula óssea as mesmas foram separadas utilizando-se o gradiente de Ficol (*Histopaque<sup>TM</sup> Plus*  $d=1077g/mL$ , Sigma). Em um tubo estéril de 15 mL (Corning) foram adicionados 3mL de Ficol em temperatura ambiente. Cuidadosamente adicionou-se 3mL do meio contendo as células sobre o Ficol formando-se então duas fases distintas, uma transparente de Ficol e uma avermelhada do meio de cultura. O tubo foi centrifugado por 25 minutos a 260 g. Após centrifugação, recolheu-se o halo branco contendo as células da fração mononuclear que se forma entre o Ficol e o meio de cultura (Figura 7A). As células foram lavadas por três vezes durante 5 minutos com PBS 10mM para retirar os resíduos de Ficol que são tóxicos para as células.

Após a última lavagem, as células foram resuspenso em 1mL de PBS10mM para contagem. Uma alíquota de 10 $\mu$ L foi retirada da suspensão de células e seu volume aferido até 100 $\mu$ L. Em seguida adicionou-se volume igual de azul de tripan. Células mortas, que incorporaram o azul de tripan foram descartadas da contagem. Para contagem em microscopia óptica comum, utilizou-se uma câmara de Neubauer (Boeco Germany), na qual foi adicionada uma pequena





- 1- Meio de cultura;
- 2- Halo contendo a fração mononuclear de células da medula óssea (CDMO);
- 3- Ficol™;
- 4- “Pellet” contendo células vermelhas.



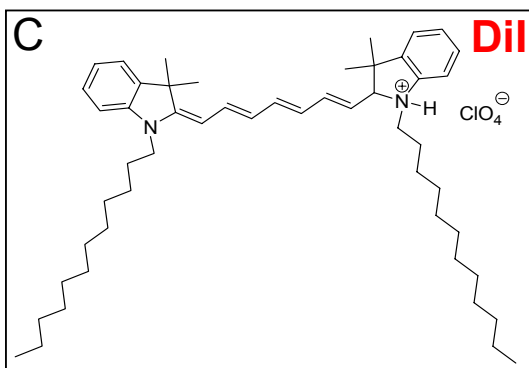
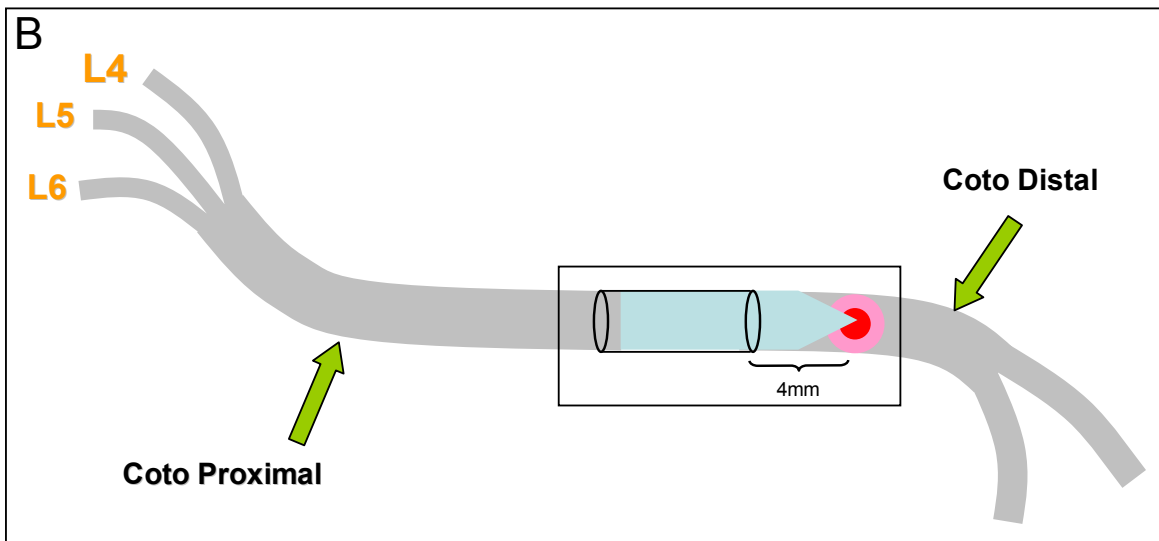
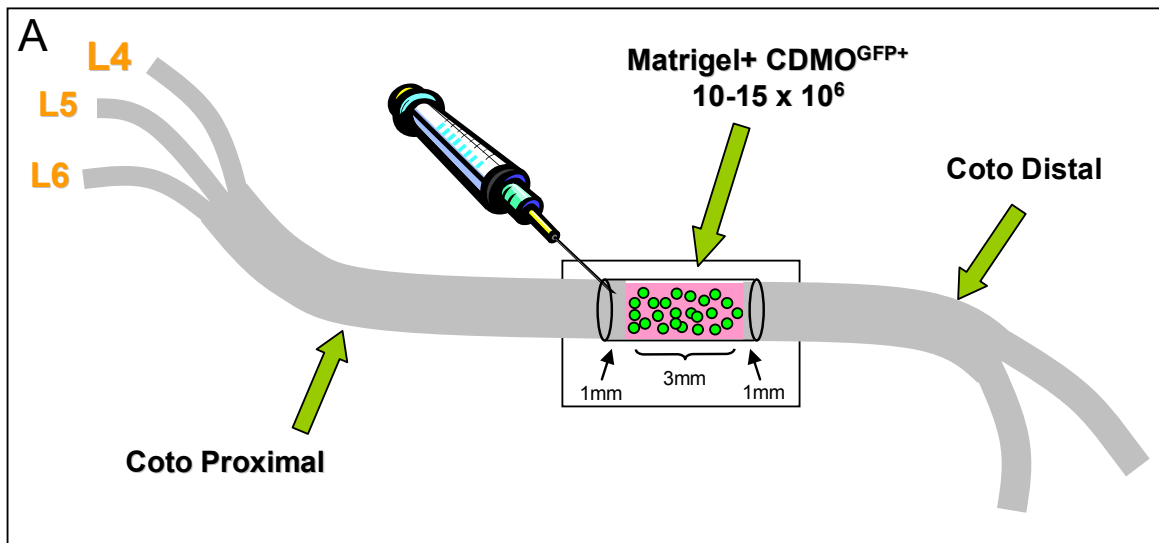
**Figura 7. Desenho experimental para obtenção, coloração e injeção da CDMO.** A: Fotografia de um tubo de 15mL após separação de células de fração mononuclear através de gradiente de ficol onde o esquema de números mostra o halo branco contendo as células entre o meio de cultura que continha as células CDMO antes da centrifugação e o ficol abaixo. Células vermelhas podem ser visualizadas no fundo do tubo. B: Fotomicrografia em contraste de fase das células da fração mononuclear da medula óssea (B1) cujos núcleos foram corados com DAPI (B2). A sobreposição das imagens pode ser vista em B3. C: Figura ilustrativa dos parâmetros utilizados para reconexão do nervo ciático lesionado. Barra=50µm

amostra da suspensão de células contendo azul de tripan (Sigma-Aldrich). A média aritmética de dois campos contendo 16 pequenos quadrados, multiplicados por  $10^4$  nos forneceu o número de células contidas no volume total da suspensão (parâmetros de contagem determinados pelo fabricante da câmara).

Para coloração dos núcleos das células de rato, utilizou-se DAPI (4',6-Diamino-2-Fenilindol, Sigma) na concentração de 2,69 mg/mL sendo que para cada mililitro de suspensão de células adicionou-se  $2\mu\text{L}$  da solução de DAPI. Essa suspensão de células contendo DAPI foi incubada durante 25-30 minutos em banho de gelo. Ao final do período de incubação, as células foram centrifugadas e submetidas a três lavagens com PBS 10mM. Após a última lavagem, uma pequena amostra era retirada do tubo para visualização em microscopia por contraste de fase e fluorescência comum. Cerca de 95% dos núcleos celulares encontravam-se marcados (Figura 7B). Esta coloração permitiu a posterior visualização das células após sua injeção nos animais experimentais (7 e 21 dias após injeção). Para cada animal foram obtidas em média  $6,00 \times 10^7$  células de medula óssea. Células da fração mononuclear da medula óssea derivada de camundongos GFP<sup>+</sup> não foram coradas com DAPI.

### ***3.3- Procedimentos cirúrgicos para estabelecimento do modelo experimental***

Para realizar os procedimentos cirúrgicos de transecção e reconexão do nervo ciático, os animais foram previamente anestesiados com éter. Em seguida foram anestesiados com uma injeção intra-peritoneal de solução contendo Cloridrato de Xilazina 0,5% (Rompum, Bayer) e Cloridrato de Quetamina 5% (Vetaset, Fort Dodge Laboratories), sendo que, a partir dessa diluição, utilizou-se  $100\mu\text{L}$  de cada um dos anestésicos para cada 100g de peso do animal. O tempo de anestesia



**Figura 8. Desenho experimental dos procedimentos cirúrgicos em camundongos e para aplicação do Dil.** **A:** Figura ilustrativa dos parâmetros utilizados para a injeção das CDMO<sup>GFP+</sup> no interior do tubo após reconexão do nervo ciático lesionado. **B:** Figura ilustrativa dos parâmetros utilizados para aplicação do cristal de Dil no coto distal do nervo ciático 40 dias após lesão. **C:** Estrutura molecular do Dil.

variou de 20 a 30 min sem a necessidade de reaplicação. Após incisão realizada na coxa direita, o acesso ao nervo foi feito através do afastamento da musculatura da coxa, atingindo-se então a fossa poplíteia, por onde o nervo se projeta em direção aos músculos da perna (solear, gastrocnêmio lateral e tibial anterior). O nervo ciático foi exposto e sofreu transecção completa a 1cm da região de bifurcação deste nervo. Previamente ao início do procedimento cirúrgico, um segmento de um tubo de polietileno com 7mm era confeccionado e através desse tubo cruzavam-se dois segmentos de linha de algodão comum. Antes da transecção, as linhas eram levemente amarradas ao nervo, deixando-se um intervalo entre elas de aproximadamente 4mm. A secção era então realizada neste intervalo. Imediatamente após a transecção o nervo era reconectado ao tubo, de tal maneira que, aproximadamente 2mm do coto proximal e 1mm do coto distal permaneciam inseridos em seu interior. No interior do tubo havia portanto, um intervalo de aproximadamente 4mm (Figura 7C).

No primeiro grupo de animais foi injetada no interior do tubo de polietileno uma suspensão contendo aproximadamente 15 milhões de células da fração mononuclear obtidas a partir do gradiente de Ficoll em Matrigel a 33% (Collaborative Biomedical Products) (Figura 1C). Os núcleos dessas células foram marcados com DAPI e a ordem de grandeza do número de células era de  $10^7$ , variando entre 1 e  $2 \times 10^7$ . O volume final da suspensão era de aproximadamente 15 $\mu$ L.

Um segundo grupo de animais, o grupo controle, recebeu uma suspensão contendo Matrigel a 33% diluído em PBS 10mM no interior do tubo de polietileno. Nos experimentos realizados com períodos curtos de sobrevivência (7 e 21 dias após lesão), o PBS 10mM era proveniente da última lavagem da fração mononuclear, após procedimento de coloração de seus núcleos utilizando corante fluorescente

DAPI. As injeções da suspensão do grupo experimental e do grupo controle foram realizadas com uma microseringa Hamilton, sendo que o acesso ao interior do tubo foi feito através de uma agulha não bixelada.

Esses experimentos visavam a quantificação do número de axônios com Dil (1,1'-dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Invitrogen, aproximadamente 0,4mm). O terceiro grupo de animais recebeu no interior do tubo um coquetel contendo 50ng/mL de NGF e 50ng/mL de BDNF diluídos em solução de Matrigel a 33%. Essa condição experimental foi denominada de controle positivo, uma vez que as neurotrofinas adicionadas promovem sobrevivência e crescimento axonal.

Os nervos reconectados foram novamente acondicionados no interior da fossa poplítea e a incisão foi costurada com fio de sutura não absorvível (Clone I Nylon 5-0, Shalon Suturas) após a injeção das células no interior dos tubos. Logo após o procedimento cirúrgico foi possível observar o severo comprometimento nos movimentos da pata dos animais recém manipulados, cujos nervos foram seccionados.

### ***3.4- Procedimentos cirúrgicos para aplicação de traçador axonal***

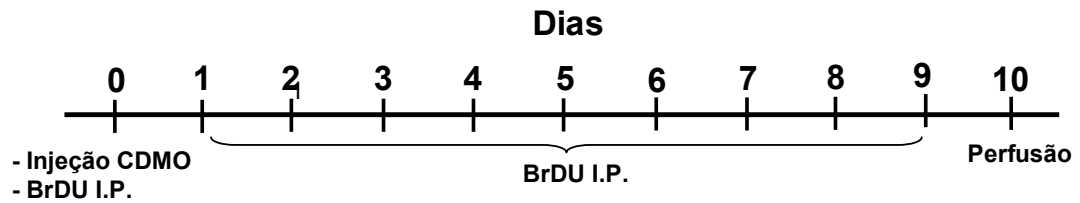
Quarenta dias após a transecção do nervo ciático, os animais foram novamente anestesiados, seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente. O nervo ciático reconectado desses animais foi novamente exposto e uma lesão por compressão foi realizada a 4 mm do tubo no coto distal a lesão. Nesta região foi inserido um pequeno cristal de Dil (Figura 8B). A região do implante foi identificada com uma linha de algodão. O nervo foi colocado novamente no interior da fossa poplítea seguido pela sutura interna da musculatura e sutura externa da pele. Esses

ratos tiveram três dias de sobrevida para que o traçador pudesse atingir os corpos celulares dos neurônios. Após esse período os animais foram perfundidos e o nervo ciático, os GRDs e a medula espinhal lombar foram cuidadosamente dissecados e removidos para posterior obtenção de cortes no criostato.

### ***3.5- Administração de Bromo-Deoxiuridina para quantificação da proliferação glial in vivo.***

Para analisar a proliferação glial *in vivo*, inicialmente os ratos foram manipulados seguindo os procedimentos do item 3. Após o procedimento cirúrgico, esses animais receberam durante 10 dias uma injeção diária intra-peritoneal (IP) de Bromo-deoxiuridina (90mg/kg de peso de BrDU por dia, Sigma), sendo que a primeira injeção ocorreu no mesmo dia em que o nervo ciático foi transeccionado (Figura 9A). Um dia após a última injeção de BrDU os animais foram perfundidos e o nervo ciático, os GRDs e a medula espinhal lombar foram dissecados e removidos para a posterior obtenção de cortes no criostato. Durante o período das injeções, os animais foram mantidos sob as mesmas condições de sobrevivência, no interior das caixas, com acesso livre a água e ração.

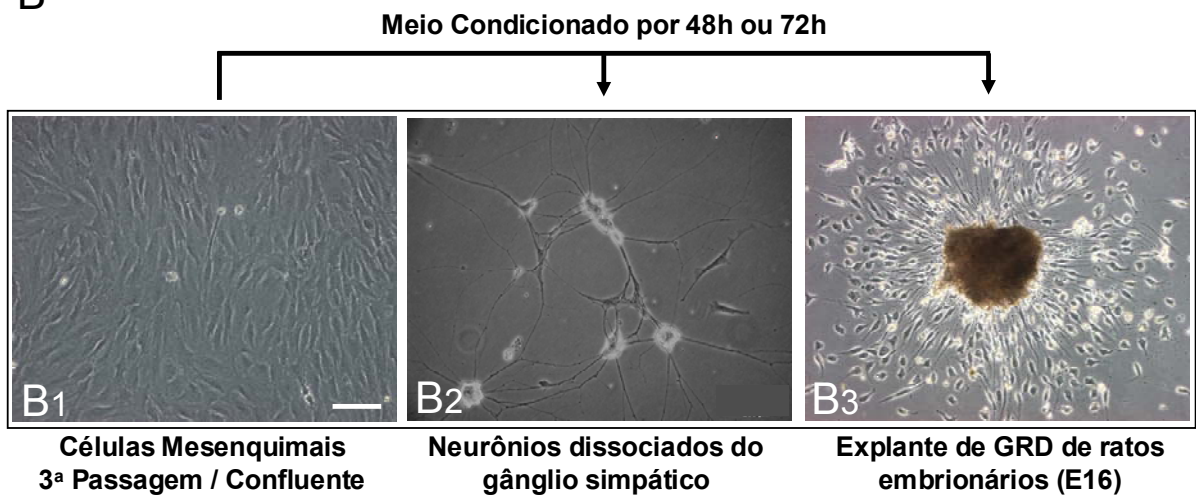
A



[ ]<sub>BrDU</sub> = 35mg por injeção (1x ao dia)

**Figura 9A- Desenho experimental para análise da proliferação glial utilizando BrDU.** Após o procedimento cirúrgico e injeção das CDMO os animais receberam durante dez dias, um vez ao dia, injeções contendo 35mg de BrDU diluído em salina alcalinizada. 24h após a última injeção os animais foram perfundidos.

B



**Figura 9B- Desenho experimental para ensaio com meio condicionado das CDMO.** **B1:** Fotomicrografia em campo claro mostrando células mesenquimais confluentes após três passagens incubadas com DMEM F12 +10% de soro fetal bovino (SFB). Após as células mesenquimais atingirem a confluência na terceira passagem, DMEM F12 +10%SFB foi substituído por DMEM F-12 sem soro e condicionado por 48h ou 72h em cultura. **B2:** Fotomicrografias em contraste de fase mostrando neurônios simpáticos dissociados e incubados durante 48h com meio condicionado de CDMO. **B3:** Fotomicrografias em contraste de fase mostrando explantes de GRD incubados durante 48h com o meio condicionado de CDMO. Barra (B1-B3)= 50µm

### ***3.6- Perfusão, Crioproteção, Medidas de Crescimento, Densidade Axonal e Obtenção de Cortes Congelados***

O objetivo da perfusão foi fixar os tecidos do animal, de forma a manter a integridade das células e permitir sua manipulação a baixas temperaturas para obtenção de cortes em criostato. Após a sobrevivência de 7, 21 ou 42 dias, os animais sofreram procedimento de perfusão para que fosse feito o acesso ao nervo ciático reconectado, GRDs L4 e L5 e às medulas espinhais lombares (L4-L6). Para este procedimento, os animais foram profundamente anestesiados com éter. Em seguida injetou-se solução salina a 0,9% com uma bomba peristáltica de perfusão (Masterflex, Cole Palmer Instrument Co.) durante 10 minutos, para retirar o conteúdo sanguíneo. Em seguida foi aplicado solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,4 por 40 minutos para fixação do tecido, seguido de uma solução de 10% de sacarose em paraformaldeído 4% por 10 minutos para crioproteção. O nervo ciático, os GRD e as medulas espinhais foram dissecados e colocados em solução crioprotetora de tampão fosfato contendo 30% de sacarose. O material foi mantido nesta solução durante aproximadamente 24 horas, exceto as amostras contendo Dil por motivos de difusão do traçador e perda de fluorescência.

Após crioproteção total, os nervos foram retirados do interior dos tubos e a membrana de tecido conjuntivo mais externo, o epineuro, foi retirada para uma melhor visualização do tecido regenerado. Esse procedimento também preveniu a ligação inespecífica dos anticorpos secundários durante os procedimentos de imunocitoquímica.

Antes da obtenção dos cortes congelados dos nervos, foi realizada a medição do crescimento dos axônios, utilizando um paquímetro com precisão de



0,02mm. A referência para orientação do paquímetro foi a deformação no coto proximal inserido no tubo. Após a determinação da medida, subtraía-se 2mm referentes à inserção do coto proximal no tubo.

Logo após a realização das medidas, as amostras foram incluídas em resina de congelamento (OCT, Sakura Fine Technologies) sendo endurecida com o uso de nitrogênio líquido. Para obtenção de cortes de 16µm, os blocos de resina contendo o material foram alinhados no criostato (Leica) com temperatura de -19°C. Foram obtidos cortes longitudinais do nervo ciático e GRDs, além de cortes transversais de medula espinhal lombar, os quais foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e armazenadas no freezer comum (-20°C) até o processamento histológico e/ou imunocitoquímica.

### ***3.7- Técnicas Histoquímicas e Imunohistoquímicas***

#### ***3.7.1- Coloração com Vermelho Neutro***

Para visualização da citoarquitetura do GRD foi utilizada a técnica de coloração histológica de vermelho neutro. Cortes longitudinais de GRD e cortes transversais da medula espinhal foram lavados três vezes com PBS 10mM para retirada dos resíduos da resina de congelamento. Em seguida foram colocados por 2 minutos em banho de tampão acetato 5%, pH 3,3. A seguir, as lâminas foram mergulhadas em solução de vermelho neutro 1% em tampão acetato 0,1M pH 4,8, onde permaneciam por aproximadamente 20 segundos e eram então mergulhadas novamente em tampão acetato durante 5 minutos para retirada do excesso de

corante no tecido. Os cortes foram então desidratados e montados em Entellan (Rapid Montage Medium, Merck).

### *3.7.2-Imunocitoquímica dos cortes de Nervo Ciático, GRD e Medula Espinhal*

Para marcação imunocitoquímica, os cortes longitudinais de nervo ciático e GRD previamente adicionados às lâminas gelatinizadas, foram lavados três vezes com PBS 10mM + 0,1% de Triton X-100 por 5 minutos. Após as lavagens, os cortes foram pré-incubados com solução de lavagem contendo 10% de soro normal de cabra (NGS, Life Sciences, BRL) e 1% de albumina sérica bovina (BSA, Life Sciences, BRL) durante 1 hora. Essa pré-incubação em câmara úmida visou bloquear sítios inespecíficos. Cortes de medula espinhal sofreram bloqueio dos sítios inespecíficos com apenas 5% de NGS diluído em PBS 10mM +0,1% pH 7,4 em Triton X-100. Em seguida a solução de bloqueio foi removida e as lâminas foram incubadas durante 2 horas em temperatura ambiente com solução contendo o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio (ver tabela de anticorpos primários). Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS 10mM, pH 7,4 (3 vezes durante 5 minutos) e incubados por 90 minutos com anticorpo secundário (ver tabela de anticorpos secundários). Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS 10mM, pH 7,4 (3 vezes durante 5 minutos) e montadas com lamínulas utilizando n-Propil-Galato, pH10 (Sigma) ou Vecta Shield (Vector) como meio de montagem para visualização em microscopia de fluorescência. Ambos os meios de montagem, para visualização dos núcleos celulares, continham DAPI na sua composição, exceto quando o material examinado era originado dos animais que receberam CDMO previamente marcadas com DAPI. Para visualização dos

núcleos celulares através de microscopia confocal foi utilizado To-Pro (1:1000, Molecular Probes) diluído juntamente com o anticorpo secundário.

Para a dupla marcação de BrDU e GFAP, cortes de animais que receberam as injeções de BrDU durante 10 dias foram descongelados em temperatura ambiente e incubados posteriormente numa câmara úmida contendo paraformaldeído 4%, a 50°C durante 15 minutos. Esse procedimento aumentava a adesão dos cortes na lâmina evitando o desprendimento ao longo do procedimento. Em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada a 40°C (2 x 5 min.) e incubadas com ácido clorídrico (HCl 2N) por 30 minutos a 37°C. Os cortes foram então incubados duas vezes durante 10 minutos, com tampão borato 0,1M pH 8,4 a 40°C, e lavados por duas vezes com PBS 10mM pH 7,4 + 0,3% de Triton X-100. Após esse tratamento os cortes foram incubados com a mesma solução de lavagem contendo 10% NGS e 1% de BSA em temperatura ambiente durante 1 hora. O anticorpo anti-BrDU monoclonal (1:100, AbCam) foi diluído na mesma solução de bloqueio, juntamente com anti-GFAP policlonal (1:500, Dako Corporation) e foram incubados durante a noite. Após esse período, os cortes foram lavados (3x 5 min.) com PBS 10mM pH 7.4 + Triton X-100 0,3% durante 1 hora e em seguida foram incubados com anticorpos secundários Alexa 488 anti-mouse (1:250, Molecular Probes) e Alexa 555 anti-rabbit (1:250, Molecular probes) durante 90 minutos. Os cortes foram então lavados com PBS 10mM pH 7.4 + Triton 0,3% (3x 5 min.). As lâminas foram montadas com Vectashield contendo DAPI (Vector) e lamínula. Os procedimentos foram os mesmos para cortes de nervo ciático, GRD e medula espinhal, sendo que a solução de bloqueio para os cortes de medula apresentava apenas 5% de NGS. As lâminas reagidas foram armazenadas a 4°C em geladeira.

**Tabela1. Anticorpos Primários**

	<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Desenvolvido em</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Incubação</b>	<b>Empresa</b>
<b>1</b>	anti NF-200	1-200µL	Coelho	Policlinal	2 horas 25°C	Sigma
<b>2</b>	anti GAP-43	1-25000µL	Coelho	Policlinal	3 horas 25°C	Doação*
<b>3</b>	anti GAP-43	1-100µL	Ovelha	Policlinal	2 horas 25°C	Santa Cruz
<b>4</b>	anti S100-β	1-100µL	Camundongo	Monoclonal	2 horas 25°C	Sigma
<b>5</b>	anti GFAP	1-500µL	Coelho	Policlinal	2 horas 25°C	DAKO
<b>6</b>	anti BrDU	1-100µL	Camundongo	Monoclonal	14 horas 4°C	AbCam
<b>7</b>	anti BrDU	1-500µL	Camundongo	Monoclonal	14 horas 4°C	Harlam

\* Gentilmente doado pelo Prof<sup>o</sup> Benowitz/Harvard Medical School

**Tabela2. Anticorpos Secundários**

	<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Desenvolvido em</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Incubação</b>	<b>Empresa</b>
<b>1</b>	Alexa 488	1-250µL	Camundongo	anti-camundongo	90min. 25°C	Molecular Probes
<b>2</b>	Alexa 488	1-250µL	Coelho	anti-coelho	90min. 25°C	Molecular Probes
<b>3</b>	Alexa 555	1-250µL	Camundongo	anti-coelho	90min. 25°C	Molecular Probes
<b>4</b>	Alexa 555	1-250µL	Coelho	anti-camundongo	90min. 25°C	Molecular Probes
<b>5</b>	FITC	1-200µL	Ovelha	anti-ovelha	90min. 25°C	Sigma
<b>6</b>	CY3	1-1000µL	Camundongo	anti-camundongo	90min. 25°C	Sigma

### ***3.8- Cultura de Células derivadas da Medula Óssea: Obtenção do Meio Condicionado.***

Células derivadas da medula óssea (CDMO) foram obtidas seguindo os procedimentos descritos acima e foram plaqueadas em meio DMEM F-12 mais 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), penicilina/estreptomicina (10.000 unidades/mL e 10mg/mL, Sigma), fungizona (10mg/mL, Sigma), glutamina (100mg/mL,Invitrogen) e sacarose (0,15%, Sigma). Cerca de  $2,00 \times 10^5$  CDMO foram plaqueadas em placas de 10cm (Corning) e mantidas na estufa a 37°C durante 24 horas. Após esse período, as células não aderentes foram removidas e a porção aderente, denominada de células mesenquimais (Figura 9B), foram expandidas. Após três passagens, através de tripsinização de placas confluentes e replaqueamento, novos meios suplementados com e sem soro foram adicionados e as células foram mantidas em cultura por 72 horas. Esse meio de cultura condicionado foi então coletado, centrifugado a 260g durante dez minutos e congelado a -20°C.

### ***3.9- Cultura de Explantes de Gânglio da Raiz Dorsal e de Neurônios Simpáticos.***

Culturas de explantes de GRD foram realizadas utilizando embriões de rato com 16 dias de gestação (E16). Fêmeas grávidas foram anestesiadas com éter e posteriormente sacrificadas por deslocamento cervical sendo que os embriões foram imediatamente removidos. Os GRDs foram removidos após exposição da medula espinhal, dissecados e plaqueados com DMEM F-12 contendo 50ng/mL de NGF (Invitrogen) por 1 hora na estufa a 36°C, antes do plaqueamento definitivo. Os gânglios tratados com NGF foram então plaqueados sobre lamínulas pré-tratadas

com 100µg/mL de poli-L-lisina e 50 µg/mL de laminina (Invitrogen). O grupo controle foi incubado com DMEM F-12 sem soro (n=5). O grupo controle positivo foi incubado com DMEM F-12 sem soro contendo 20ng/mL NGF (n=5). O terceiro grupo foi incubado com o meio condicionado sem soro das CDMO (diluição 1:1, com DMEM F-12, n=6). Todas as condições experimentais foram mantidas a 36°C, 5% de CO<sub>2</sub> na estufa durante 48 horas. Após esse período, as culturas foram fixadas com paraformaldeído, lavadas com PBS 10mM +0,01% de triton X-100 (3 x 5 min.) e processadas para imunocitoquímica contra NF-200 (policlonal, 1:200, Sigma/ Alexa 488 anti-rabbit, 1:250, Molecular Probes). Em seguida as lamínulas foram aplicadas sobre lâminas contendo uma gota (20µL) de Vectashield (Vector), seladas com esmalte e levadas ao microscópio de fluorescência para visualização e quantificação da neuritogênese.

Para a cultura de neurônios simpáticos, foram removidos os gânglios simpáticos de embriões de pinto com 10 dias (E10). Após lavagem com tampão livre de cálcio e magnésio (CMF) as cadeias de gânglios foram incubadas com a mesma solução contendo 0,05% de tripsina a 37°C por 30 minutos. Após centrifugação e remoção da solução contendo tripsina os gânglios foram lavados com DMEM F-12 contendo 10% de soro fetal bovino e dissociados com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Células não neuronais foram removidas por um gradiente diferencial de sedimentação através da adição do número total de células dissociadas em uma coluna contendo aproximadamente 60mL de DMEM F-12 + 10% de soro fetal bovino. Frações foram coletadas após uma hora de corrida sendo que das 12 frações coletadas, os neurônios simpáticos estavam contidos em sua maioria nas frações intermediárias (Frações de 6-9). Esses neurônios foram plaqueados em baixa densidade sobre placas de cultura (35mm, Corning) previamente tratadas

com poli-L-lisina (10µg/mL, Sigma) e laminina (20 µg/mL, Invitrogen). As condições experimentais foram as mesmas utilizadas para os explantes de GRD, DMEM F-12 mais soro como controle, DMEM F-12 com soro mais NGF (20ng/mL) como controle positivo e o meio condicionado das CDMO sem soro diluído (1:1) com DMEM com soro. Nesse experimento testamos o meio condicionado por 48 horas e 72horas. Os neurônios simpáticos foram incubados por 48 horas a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub> na estufa. Foram realizados três experimentos independentes para cada condição experimental. Após 48 horas as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% pH 7.4, lavadas (3x 5 min.) e mantidas em PBS 10mM para imediata análise e quantificação da sobrevivência neuronal e neuritogênese.

### ***3.10- Cultura de Explantes de Nervo Ciático de Ratos Adultos***

Para obtenção da cultura de explantes de nervo ciático, o nervo foi exposto e sofreu um esmagamento por compressão utilizando-se uma pinça média mergulhada em nitrogênio líquido, vinte e quatro horas antes da remoção do nervo. Esse procedimento permitiu que as células de Schwann fossem ativadas em função do rompimento dos axônios. Após o período de 24 horas do esmagamento, os animais foram anestesiados com éter, sacrificados por deslocamento cervical e ambos os nervos foram removidos. O tecido conjuntivo mais externo, o perineuro, foi removido da região distal à lesão e com o auxílio de uma lâmina de bisturi foram obtidos pequenos fragmentos da região distal. Em seguida foi aplicado um explante por poço numa placa de 24 poços. Esses explantes foram mantidos com as seguintes condições experimentais: DMEM F-12+10% de SFB como meio padrão, 50ng/mL de NGF, 50ng/mL de BDNF, 50ng/mL de NGF e BDNF e o meio

condicionado das CDMO com 10% de SFB em diluição 1:1 com DMEM F-12. Esses explantes foram mantidos em cultura por 10 dias, e após esse período as placas de cultura foram levadas ao microscópio invertido para que os explantes e as células migratórias pudessem ser fotografados por contraste de fase.

### ***3.11- Análise Microscópica, Quantificação e Análise Estatística.***

Para análise das lâminas submetidas a métodos histoquímicos de coloração, foi utilizada microscopia óptica convencional através de contraste de fase ou contraste diferencial interferencial (DIC, microscópio Axioskop, Zeiss), com objetivas de baixo e grande aumento.

Para análise dos cortes processados por métodos imunocitoquímicos, foi utilizada microscopia óptica de fluorescência (microscópio Axiovert 135, Zeiss) com objetivas de baixo e grande aumento.

As imagens de microscopia óptica comum e de fluorescência foram feitas com a utilização de uma câmara fotográfica digital acoplada ao microscópio invertido (AxioCam, Zeiss) e o processamento e melhora gráfica das imagens foi realizada utilizando-se o software específico da câmara (Axiovision 5.0, Zeiss). A contagem do número de células do GRD e da medula espinhal foi feita a partir da visualização direta dos cortes reagidos pela técnica de vermelho neutro ao microscópio óptico comum utilizando uma objetiva com aumento de 40 vezes. O número de neurônios Dil positivos do GRD e da medula espinhal foi quantificado diretamente ao microscópio de fluorescência convencional (Axiovision 5.0, Zeiss) utilizando-se o filtro para rodamina. Imagens de cortes longitudinais dos nervos ciáticos de



camundongos que receberam CDMO<sup>GFP+</sup> foram obtidas através de microscopia confocal (microscópio invertido, Zeiss Confocal Microscopy LSM 510 Meta) utilizando-se os lasers de 488, 583 e 633nm de comprimento de onda.

Para análises estatísticas dos dados de quantificação foi utilizado o programa Prizma (Graph Pad). Análise de variância não paramétrico, seguido pelo pós-teste Neuman-Keuls para comparação entre pares de coluna foram utilizados como testes. A densidade de colocalização entre GFP e S100- $\beta$  foi medida com a função de colocalização gráfica do software (Axiovision, Zeiss).

## 4- Resultados

---

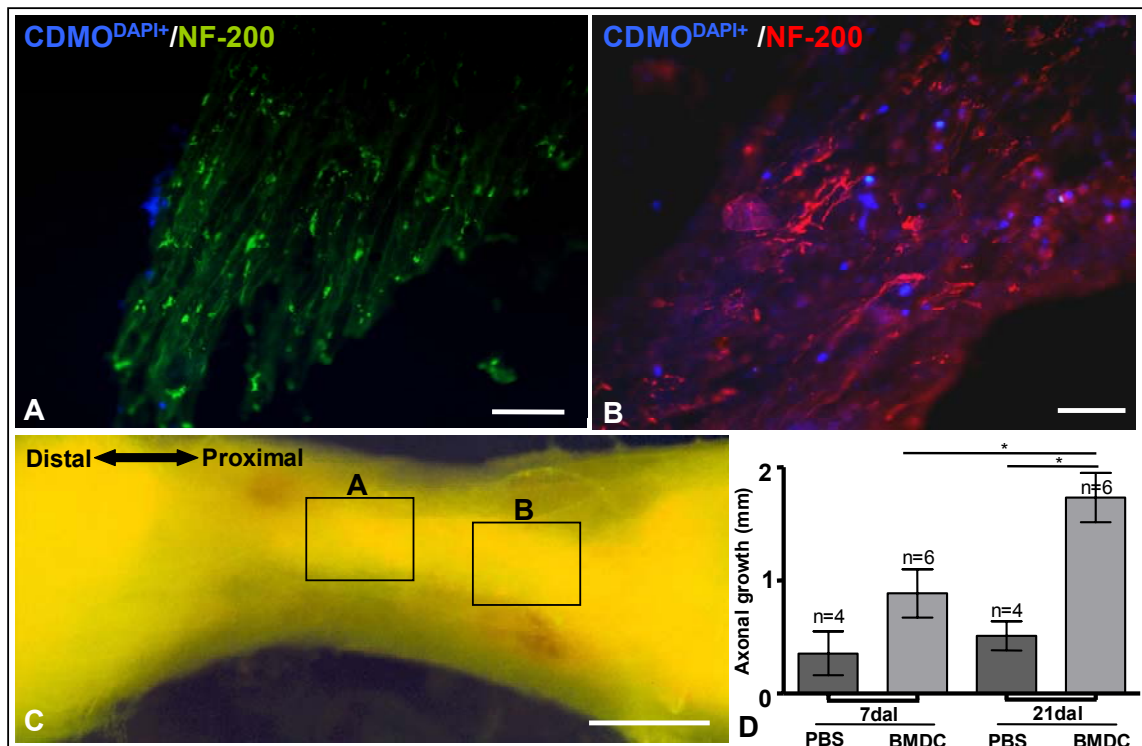
### *4.1-Crescimento Axonal no Interior do Tubo de Polietileno.*

Os nervos ciáticos lesionados foram cortados e a análise dos cortes histológicos processados para o neurofilamento-200 (NF-200) mostrou a presença de axônios no interior do tubo na extremidade do coto proximal em regeneração. Nessas regiões analisadas foi possível visualizar células injetadas que foram previamente coradas com DAPI (Figura 10A e B). Isso demonstra que uma população das células injetadas se estabelece em regiões adjacentes aos axônios em regeneração e é possível sugerir que estas células possam estar exercendo alguma atividade biológica que favoreça o aumento do crescimento desses axônios no interior do tubo de polietileno.

A análise morfométrica da regeneração do nervo ciático mostrou que o crescimento do nervo foi maior em animais que foram injetados com uma suspensão contendo CDMO marcadas com DAPI, quando comparado à situação controle onde foi injetado apenas matrigel em PBS10mM (figura 10D). A análise estatística comparando a taxa de crescimento do nervo em ambas as condições experimentais demonstrou que não houve diferença significativa na regeneração sete dias após o tratamento com CDMO ( $p>0,05$ ).

No entanto, vinte e um dias após lesão houve um aumento significativo na regeneração axonal no interior do tubo nos animais tratados com CDMO ( $p<0.0001$ ) (Figura 10 D).

Nesse sentido, observa-se um tecido conectivo unindo os cotos proximal e distal vinte e um dias após transecção e injeção das células da fração mononuclear (Figura 10 C).

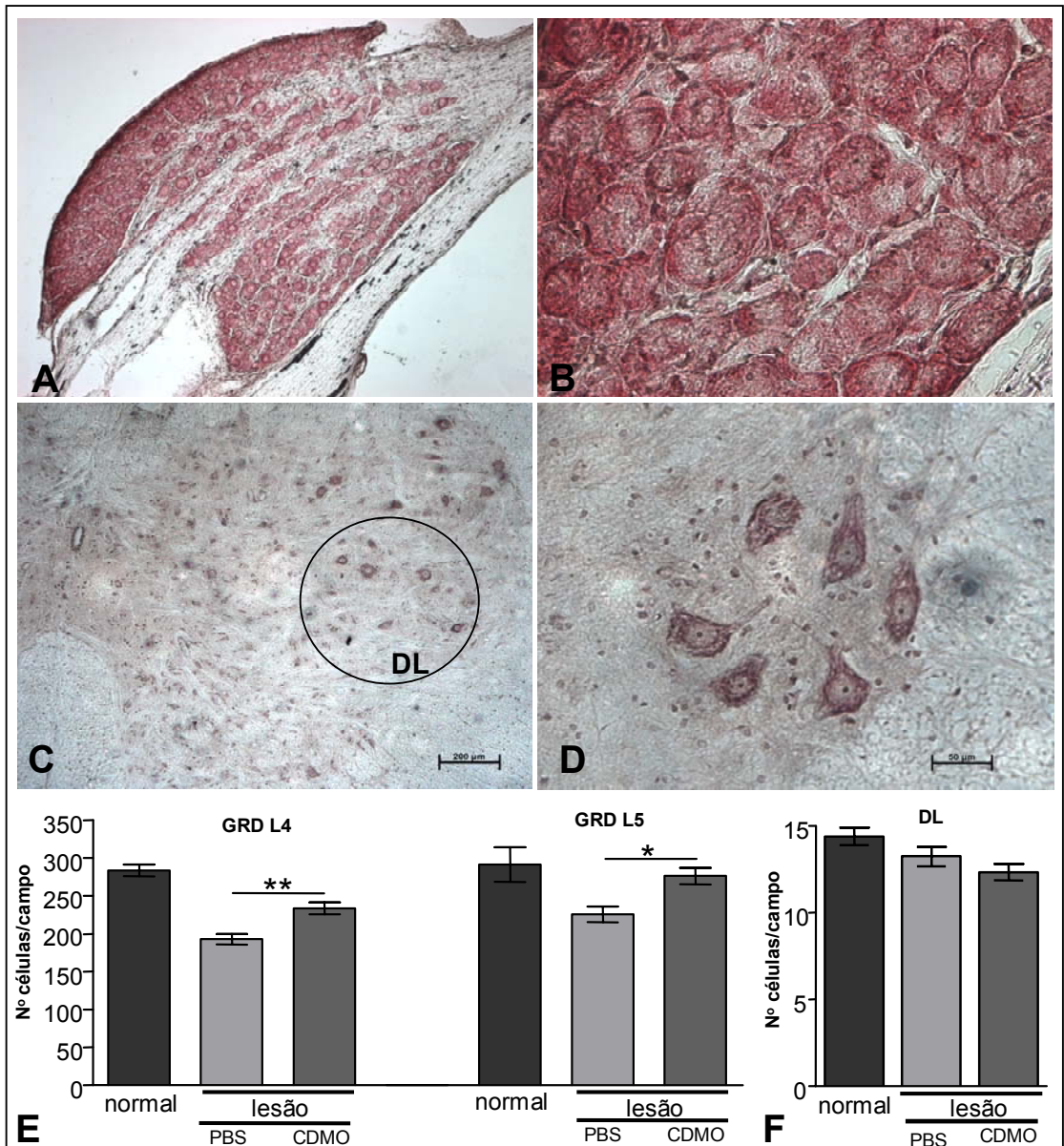


**Figura 10. CDMO aumentam a regeneração do nervo ciático lesionado nos períodos iniciais após lesão. A-B:** cortes longitudinais do nervo ciático imunomarcados para NF-200, 21 dias após transecção. CDMO<sup>DAPI+</sup> podem ser visualizadas bem próximas aos axônios positivos para NF-200. **C:** Fotografia em baixo aumento mostrando a região reconectada do nervo ciático 21 dias após a injeção das CDMO. **D:** Histograma da análise quantitativa do crescimento axonal no interior do tubo de polietileno 7 e 21 dias após lesão. **E:** Desenho esquemático do nervo ciático em regeneração onde os quadrados indicam o campo exato de obtenção das fotografias em A e B.

#### ***4.2- CDMO Aumenta a Sobrevivência de Neurônios do GRD após Lesão do Nervo Ciático.***

Existe uma perda de aproximadamente 30% dos neurônios nos GRDs L4 e L5 após lesão do nervo ciático (figura 11D). Nos animais tratados com CDMO e sacrificados após 21 dias foi observado que a porcentagem do número de neurônios nos GRDs correspondia a 82% do total quando comparado ao animal controle (sem lesão). (Figura 11E, Tabela 1 e 2, GRD L4 \*\* $p < 0,001$  e L5 \* $p < 0,01$ ). Dessa forma observamos que o tratamento com CDMO aumenta a sobrevivência de neurônios sensitivos do GRD em aproximadamente 15%.

A lesão do nervo ciático não resulta em perda de motoneurônios (Hammarberg et al., 2000). No nosso estudo, a contagem do número de motoneurônios presentes nos cortes transversais da medula espinhal lombar (Figura 11C e D), especificamente na região dorso-lateral, revelou que não houve diferença significativa no número de células entre o grupo de animais que recebeu CDMO e o grupo controle que recebeu apenas PBS 10mM diluído em Matrigel (Figura 11F, Tabela 2,  $p > 0,05$ ). As porcentagens foram novamente calculadas tendo como referência o número total de motoneurônios existentes na região dorso-lateral da medula de ratos que não sofreram qualquer tipo de lesão.



**Figura 11. CDMO aumentam a sobrevivência de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD, L4 e L5).** A-B: Fotografias de cortes longitudinais de GRD L4 em menor (A) e maior aumento (B), 21 dias após a lesão do nervo ciático, coradas com vermelho neutro. C-D: Fotografias de cortes transversais da medula espinhal lombar em baixo (C) e maior aumento (D), 21 dias após lesão do nervo ciático, coradas com vermelho neutro. E e F: Histogramas da análise quantitativa do número de neurônios do GRD L4 e L5 (E) e motoneurônios (F) remanescentes 21 dias após a lesão do nervo ciático. Tabelas 1, 2 e 3 de quantificação da sobrevivência dos neurônios do GRD (L4 e L5) e motoneurônios respectivamente (Verso). Barras: A e C=200µm; B e D= 50µm. DL=dorso-lateral.

<b>Tabela 4. Regeneração dos neurônios GRD L4</b>				
	<b>Ratos</b>	<b>Cortes</b>	<b>Dil+</b>	<b>Regeneração</b>
<b>CDMO</b>	7	52	188	60,5%
<b>PBS</b>	6	38	138	48%
<b>NGF/BDNF</b>	4	30	162	54%

<b>Tabela 5. Regeneração dos neurônios GRD L5</b>				
	<b>Ratos</b>	<b>Cortes</b>	<b>Dil+</b>	<b>Regeneração</b>
<b>CDMO</b>	7	63	202	48%
<b>PBS</b>	6	50	135	39,5%
<b>NGF/BDNF</b>	4	31	223	56%

<b>Tabela 6. Regeneração dos Motoneurônios</b>				
	<b>Ratos</b>	<b>Cortes</b>	<b>Dil+</b>	<b>Regeneração</b>
<b>CDMO</b>	7	28	15	65%
<b>PBS</b>	6	25	10,5	45,5%
<b>NGF/BDNF</b>	4	26	22,2	96%

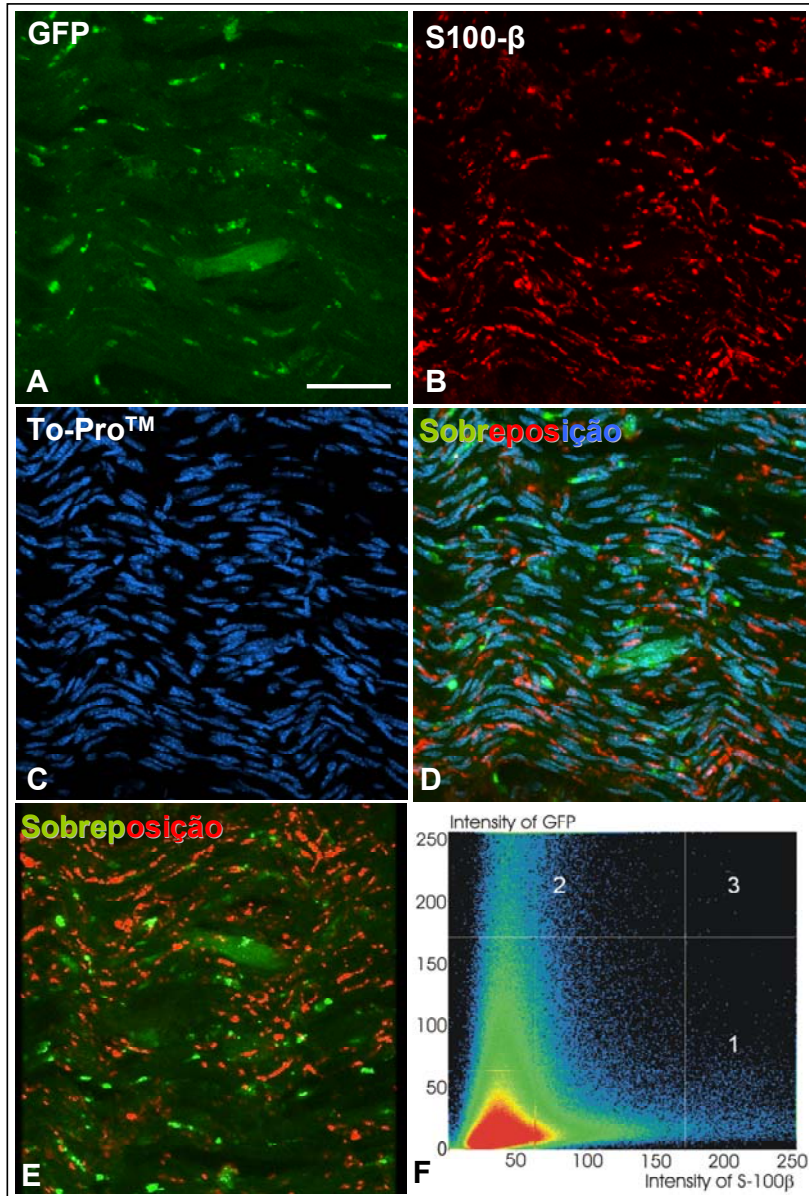
#### ***4.3- CDMO Aumentam o Número de Axônios Sensitivos e Motores em Regeneração após Lesão do Nervo Ciático.***

Para analisar os axônios em regeneração que alcançaram o coto distal utilizamos a imunocitoquímica para GAP-43, uma proteína expressa por axônios em crescimento. Os animais que receberam CDMO apresentaram maior número de axônios no coto distal quando comparados ao grupo controle que recebeu apenas PBS 10mM diluído em Matrigel, quarenta e dois dias após a transecção do nervo ciático e reconexão no interior do tubo de polietileno (Figura 12A e B).

A figura 12 C mostra o raio de difusão do cristal de Dil 2 dias após a aplicação no coto distal em relação à lesão do nervo ciático. Através da análise desse raio, foi possível descartar a hipótese de difusão desse traçador para o interior do tubo, o que poderia resultar em marcações falso-positivas dos corpos celulares dos neurônios do GRD e motoneurônios da medula espinhal. Na figura 12 D observa-se a presença de axônios marcados com Dil numa região muito próxima aos corpos celulares dos neurônios do GRD L4 de um rato que sofreu a transecção do nervo ciático e injeção das CDMO. É importante notar a presença de um neurônio marcado para Dil ao lado de um neurônio não marcado para o mesmo traçador (Figura 12E), através de microscopia de fluorescência convencional no GRD L4. Essa observação sugere que o axônio do neurônio positivo pra Dil apresentou regeneração na região onde o cristal de Dil foi aplicado enquanto o neurônio vizinho não.

A análise através de microscopia de epifluorescência revelou a marcação de Dil em neurônios no GRDs nos segmentos L4 e L5 e na medula espinhal (Figura 12 F e G).





**Figura 13.** A-E, Reconstrução bidimensional por microscopia confocal da extremidade do coto proximal do nervo ciático 14 dias após lesão. A,E, GFP; B,F, S-100 $\beta$ ; B,G,To-Pro; D,H, Sobreposição. Barras=50 $\mu$ m. F: Gráfico de colocalização entre GFP e S100- $\beta$  onde os pontos contidos no quadrado número 3 representam pontos de colocalização. A variação de cor do vermelho para o azul representa maior frequência de pontos (vermelho) para menor frequência de pontos (azul). G: Esquema do nervo ciático em regeneração onde o quadrado indica o campo exato de obtenção das fotografias de A a E. Barra: A-E=50 $\mu$ m



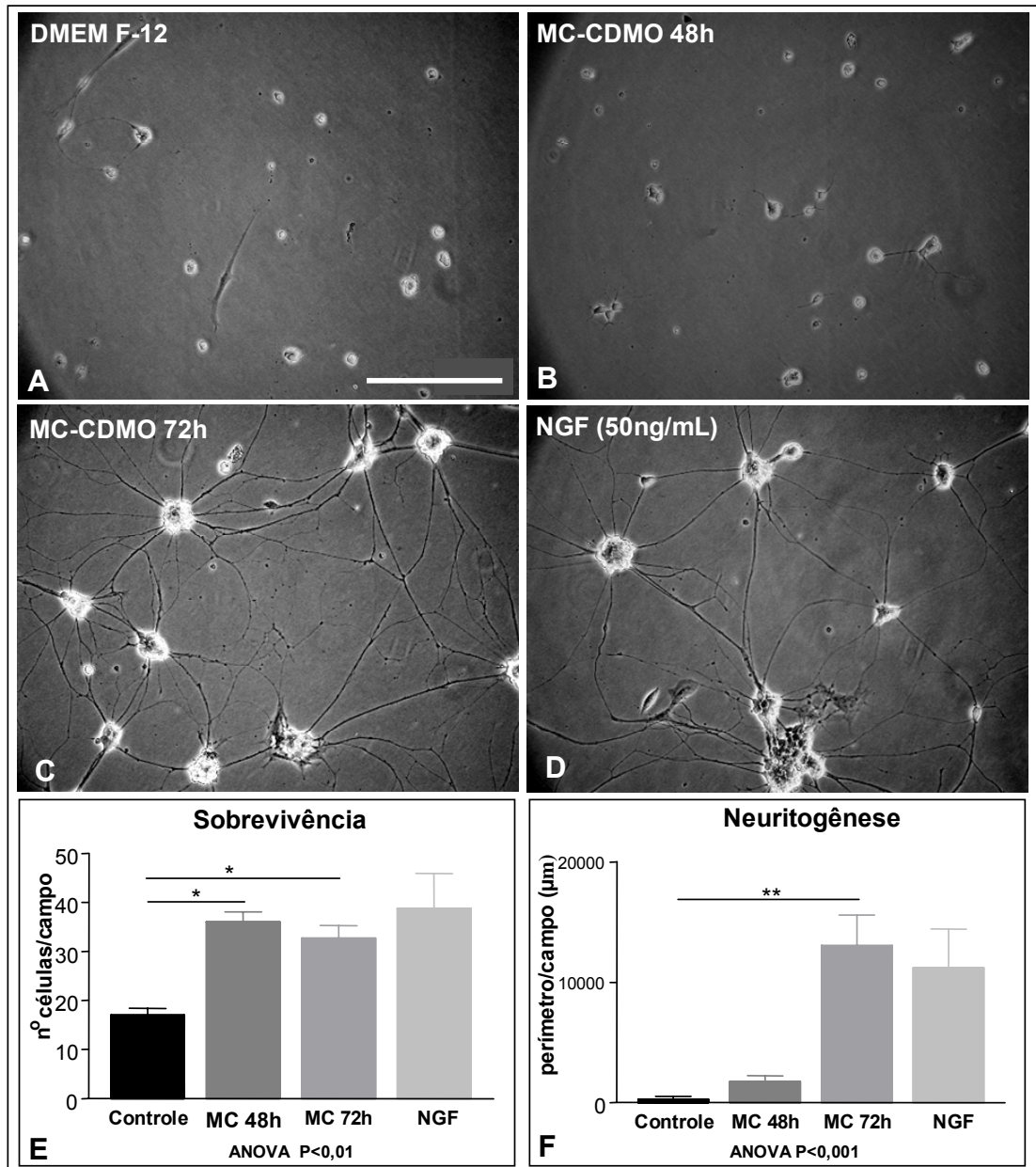
Essa marcação está de acordo com o padrão de marcação *in vivo*, representada por pontos fluorescentes no interior dos corpos celulares dos neurônios. No GRD de um animal que recebeu CDMO observou-se marcação para Dil nas três populações de neurônios (Figura 12 F): os de corpo celular pequeno (setas brancas), médio (setas amarelas) e grande (setas verdes). Esse padrão de marcação também ocorreu nos animais controle. A análise quantitativa demonstrou que o número total de neurônios positivos para Dil nos GRDs L4 e L5 dos animais que receberam CDMO foi significativamente maior que no grupo que recebeu apenas PBS 10mM e Matrigel (Figura 12 H e I, Tabela 3, GRD L4 e L5 \*\* $p < 0,001$ ). Não houve diferenças significativas entre o grupo de animais que recebeu CDMO e o grupo controle positivo representado pelos animais que receberam NGF e BDNF diluído em Matrigel. Na medula espinhal o número de neurônios Dil<sup>+</sup> foi maior no grupo de animais que receberam as CDMO se comparado com o grupo controle (Figura 12 J, Tabela 4, \* $p < 0,05$ ). Estes resultados sugerem que o tratamento com CDMO aumenta o crescimento de axônios motores até o coto distal. Os animais que receberam NGF e BDNF no sítio de lesão apresentaram um aumento no número de motoneurônios Dil<sup>+</sup> quando comparado ao grupo tratado com CDMO e ao grupo controle (PBS 10mM+Matrigel). Estes resultados sugerem que o tratamento com CDMO aumenta o crescimento tanto de axônios sensitivos quanto de neurônios motores.

#### ***4.4- CDMO Apresentam Baixo Potencial de Diferenciação em Células de Schwann in vivo.***

A análise por microscopia confocal de cortes do nervo ciático de camundongos adultos tratados com CDMO<sup>GFP+</sup> mostrou uma pequena colocalização de GFP e de S100-β, uma proteína utilizada como marcador de células de Schwann, quatorze dias após a injeção (Figura 13 A e B). A coloração dos núcleos celulares com To-Pro (Figura 13 C) permitiu observar que as células injetadas, apesar de apresentarem expressão muito baixa de S100-β, estavam incorporadas ao tecido em regeneração (Figura 13 D). O gráfico que ilustra os pontos de fluorescência de GFP (abscissas) e S100-β (ordenadas) apresentou um perfil com precária co-localização (Figura 13 F). A co-localização dos pontos contidos no quadrante número três é muito baixa sugerindo não existir diferenciação das CDMO em células de Schwann.

#### ***4.5- A Atividade Trófica de CDMO Aumenta a Sobrevivência e Neuritogênese de Neurônios Simpáticos.***

Para analisar os possíveis efeitos tróficos de fatores liberados pelas CDMO, foram utilizadas culturas de neurônios simpáticos. A análise destas culturas em microscopia de contraste de fase mostrou que quarenta e oito horas após o plaqueamento e incubação com meio controle (DMEM F-12 sem soro) as células não apresentaram extensão neurítica (Figura 14 A). Neurônios tratados com o meio condicionado das CDMO incubados por 48h (MC-CDMO) apresentaram uma pequena neuritogênese (Figura 14 B).



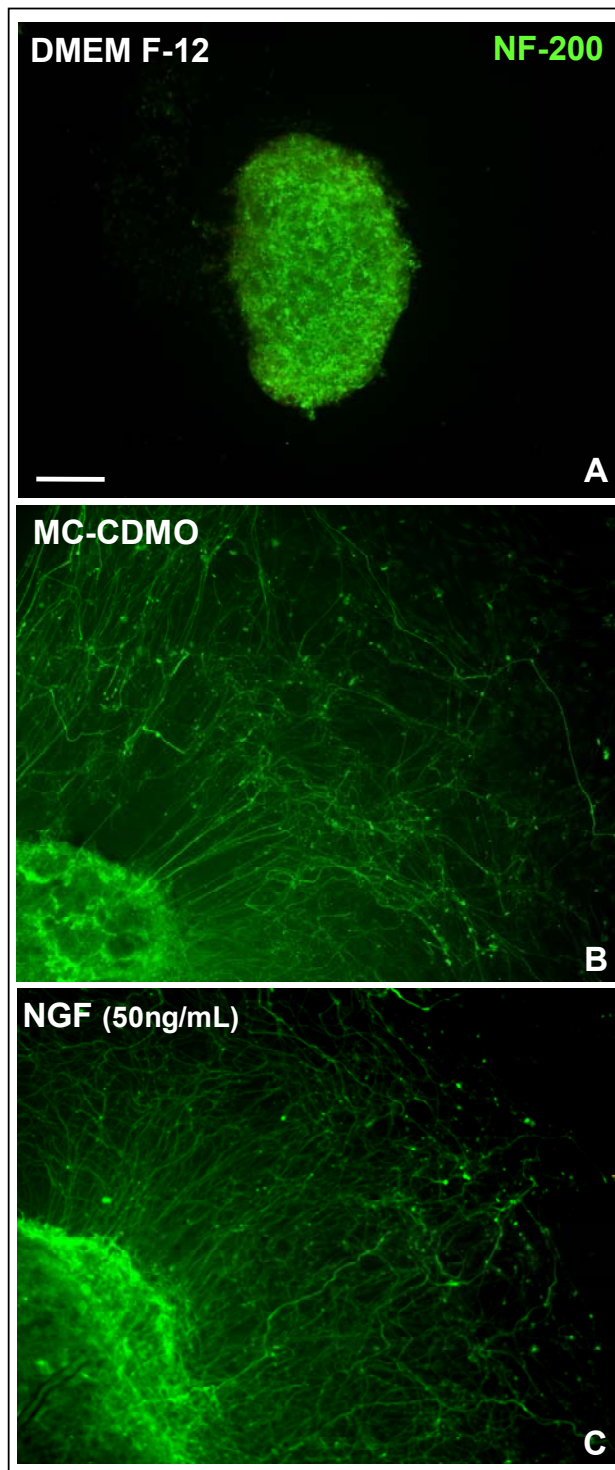
**Figura 14: Atividade trófica de CDMO aumenta a sobrevivência e neuritogênese de neurônios simpáticos. A-H, Fotomicrografias em contraste de fase de culturas fixadas de neurônios simpáticos dissociados de embriões de pinto (E-10) tratados com DMEM F-12 (A), MC-CDMO 48h (B), MC-CDMO 72h (C) e NGF (D). E e F, Histogramas da análise quantitativa da sobrevivência neuronal (E) e neuritogênese (F). Barras=100µm.**

Neurônios tratados com MC-CDMO incubados por 72h apresentaram extensa neuritogênese (Figura 14C). Esse efeito foi semelhante ao observado nas culturas de neurônios simpáticos incubados com NGF 20ng/mL (Figura 14 D). A análise quantitativa da extensão neurítica demonstrou que apenas o MC-CDMO com 72h de condicionamento induziu uma diferença significativa em relação aos neurônios mantidos em meio DMEM F-12 sem soro. No entanto não houve diferença significativa em relação ao controle positivo (NGF).

A análise quantitativa da sobrevivência de neurônios simpáticos dissociados (Figura 14 E, ANOVA  $p < 0,01$ ) mostra um aumento na sobrevivência dessas células quando incubadas por 48h com ambos os meios condicionados por 48 e 72h. Essa sobrevivência é semelhante à observada com culturas tratadas com NGF. Em conjunto, estes resultados mostram que os meios condicionados por 48 e 72 horas aumentam a sobrevivência de neurônios simpáticos, e que apenas o meio condicionado por 72 horas foi capaz de promover expressiva extensão neurítica.

#### ***4.6- A Atividade Trófica de CDMO Aumenta a Neuritogênese de Explantes de Gânglio de Raiz Dorsal.***

Para estudar o efeito de fatores liberados pelas CDMO sobre neurônios do GRD, utilizamos culturas de explantes obtidos de ratos embrionários no estágio E15. O crescimento neurítico foi observado utilizando como marcador a expressão de neurofilamento (NF-200). A análise mostrou que 48 horas após o plaqueamento e incubação com meio DMEM F-12 sem soro não houve neuritogênese nos gânglios em cultura (Figura 15 A, N=5). Os explantes incubados com meio MC-CDMO por 72 horas apresentaram um grande número de neuritos (Figura 15B, N=6). A extensão

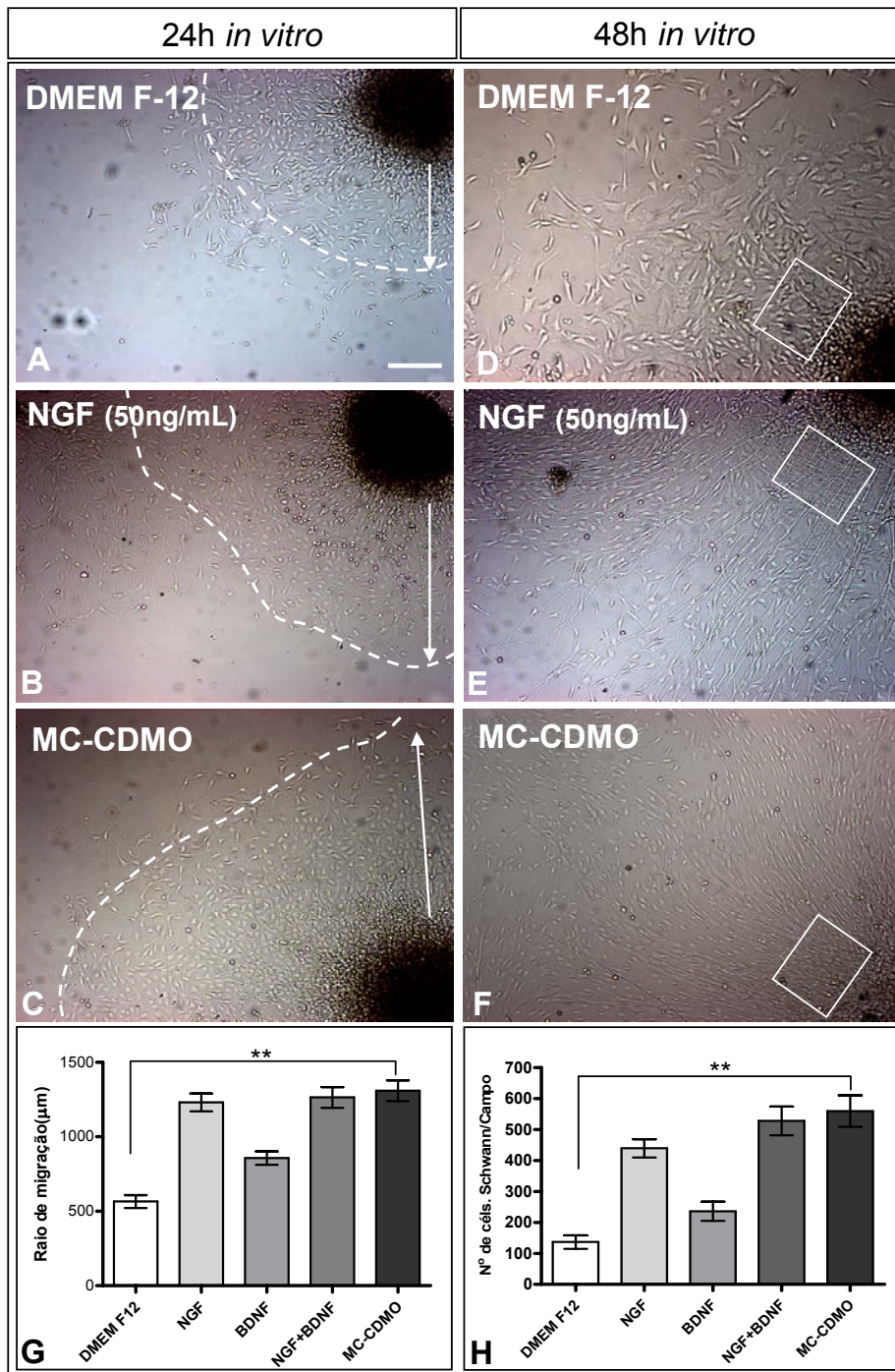


**Figura 15.** MC-CDMO promove neuritogênese de explantes de GRD *in vitro*. Fotomicrografias de explantes de GRD de ratos embrionários (E16) incubados por 48h com DMEM F-12 (A), MC-CDMO (B) ou NGF (C), imunomarcados para NF-200. Barra A-C=200µm.

neurítica observada nestas condições foi semelhante à das culturas mantidas na presença de NGF, que é um fator trófico endógeno necessário para indução neurítica de explantes de GRD (Figura 15 C, N=5).

#### ***4.7- Atividade Trófica de CDMO Aumenta a Migração e o Número de Células Gliais in Vitro.***

Para analisar o possível efeito de fatores liberados pelas CDMO sobre as células de glia do GRD foram utilizados explantes de GRD de embriões de rato E16 plaqueados na presença de DMEM F-12 ou MC-CDMO acrescidos de 10%SFB. Como observado nas figuras 16 A e 16 C, a migração de células para fora do explante foi maior nas culturas tratadas com meio condicionado quando comparadas ao meio controle. Explantes mantidos na presença de NGF (50ng/mL), também apresentaram uma grande migração de células (Figura 16 B). A análise quantitativa do raio de migração das células gliais mostrou que houve um aumento significativo nos explantes tratados com MC-CDMO em relação aos incubados com meio controle (Figura 16 G,  $p < 0,001$ ). Entretanto, não houve diferença entre o grupo MC-CDMO e o grupo NGF. Embora a incubação com BDNF tenha aumentado o raio de migração, esse aumento foi significativamente menor quando comparado ao grupo MC-CDMO ( $p < 0,01$ ). Na condição incubada com NGF+BDNF, o raio de migração foi semelhante ao do grupo incubado com MC-CDMO. A análise de uma região adjacente ao explante de GRD (células contidas no quadrado branco, Figuras 16 D-F) permitiu a comparação do número de células gliais entre os grupos controle, NGF e MC-CDMO, 48h após incubação. O grupo MC-CDMO apresentou densidade celular cinco vezes maior (Figura 16 D, F e H,  $p < 0,001$ ) do que o grupo controle, sendo também maior que os grupos tratados com NGF (Figura 16 E,  $p < 0,05$ ) e



**Figura 16. Atividade trófica de CDMO aumenta a migração e a densidade de células de Schwann de explantes de GRD *in vitro*.** Fotografias em baixo aumento de explantes de GRD de embriões de rato (E16) cultivados durante 24 (A-C) e 48 horas (D-F). A-C: Halo de migração das células de Schwann incubadas durante 24h com DMEM F-12+10% SFB (meio padrão, A), NGF 50ng/mL (B) e MC-CDMO (C). D-F: Densidade celular e organização das células de Schwann incubadas durante 48h com DMEM F-12+10%SFB (D), NGF 50ng/mL (E) e MC-CDMO (F). Histogramas da análise quantitativa do raio de migração (G) e densidade de células de Schwann por área. Barras A-F=200µm

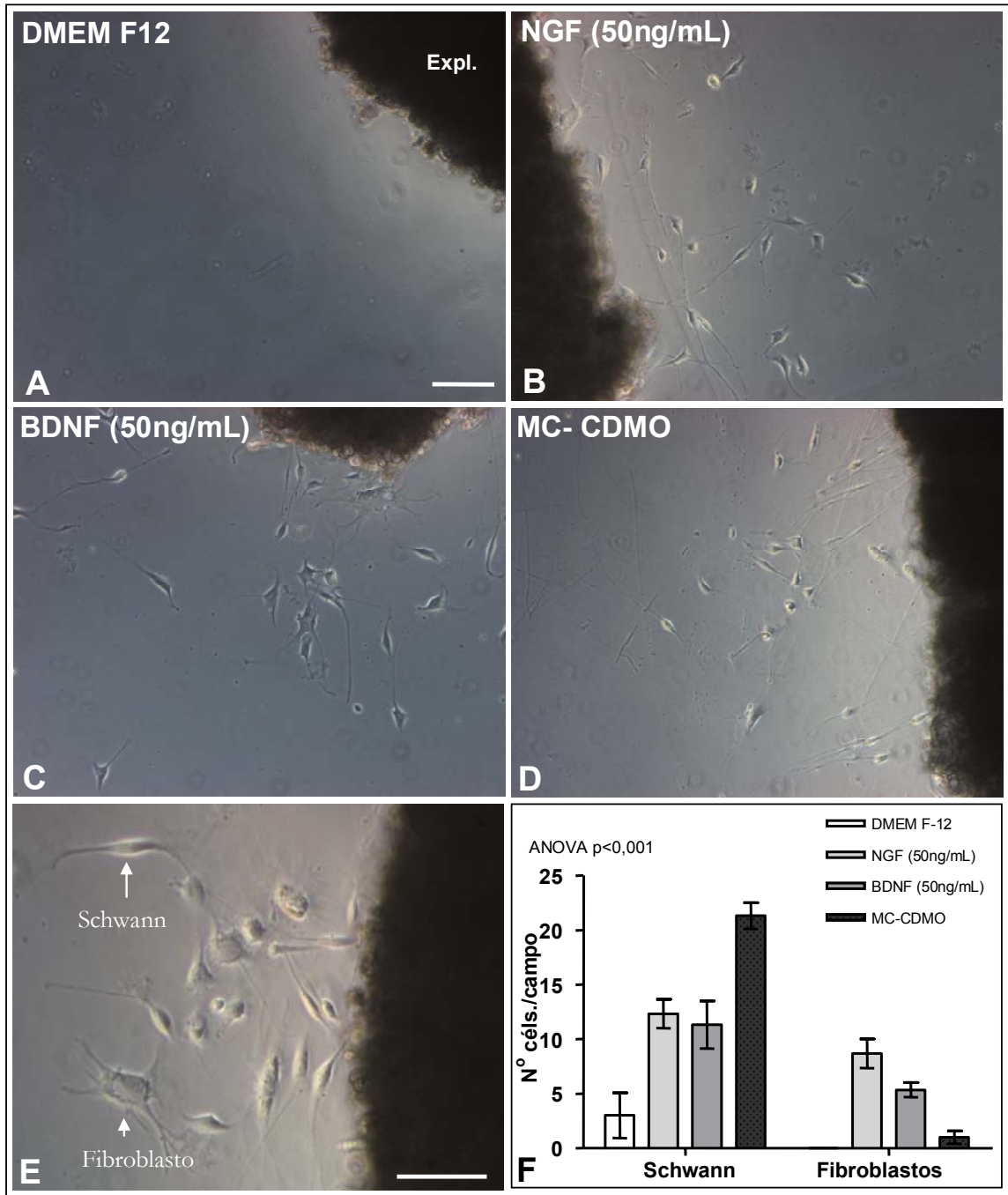
BDNF ( $p < 0,01$ , 150% maior). A densidade celular entre os grupos MC-CDMO e NGF+BDNF foi semelhante. Conclui-se que o meio condicionado das CDMO foi então capaz de aumentar o raio de migração e a densidade de células gliais a partir de explantes de GRD de embriões de rato E16.

#### ***4.8- A Atividade Trófica de CDMO Aumenta a Migração de Células de Schwann a partir de explantes de Nervo Ciático Adulto.***

Foram utilizados explantes de nervo ciático de ratos adultos para uma análise quantitativa do número de células de Schwann e fibroblastos migratórios, após incubação de dez dias (Figura 17 A-E). Os explantes incubados em meio controle (DMEM F-12 + 10% SFB) apresentaram um número pequeno de células migratórias sendo que na maioria não foi observado migração celular (Figura 17 A,  $n=5$ ). No entanto, explantes incubados com MC-CDMO apresentaram um grande número de células migratórias (Figura 17 E,  $n=5$ ), assim como os explantes tratados com NGF (Figura 17 B,  $n=5$ ) e BDNF (Figura 17 C,  $n=5$ ). O número de células de Schwann que migraram a partir dos explantes incubados com MC-CDMO foi 10 vezes maior quando comparado aos explantes controle (Figura 17 F) e aproximadamente 40% maior que os grupos tratados com NGF (50ng/mL) e BDNF (50ng/mL). A quantificação do número de fibroblastos oriundo dos explantes tratados com MC-CDMO foi 10 vezes menor quando comparado com explantes incubados com NGF e 6,5 vezes menor se comparado com aqueles tratados com BDNF (50ng/mL).

Conclui-se que o meio condicionado de CDMO induz uma maior migração de células a partir dos explantes de nervo ciático e essa migração é preferencialmente de células de Schwann.





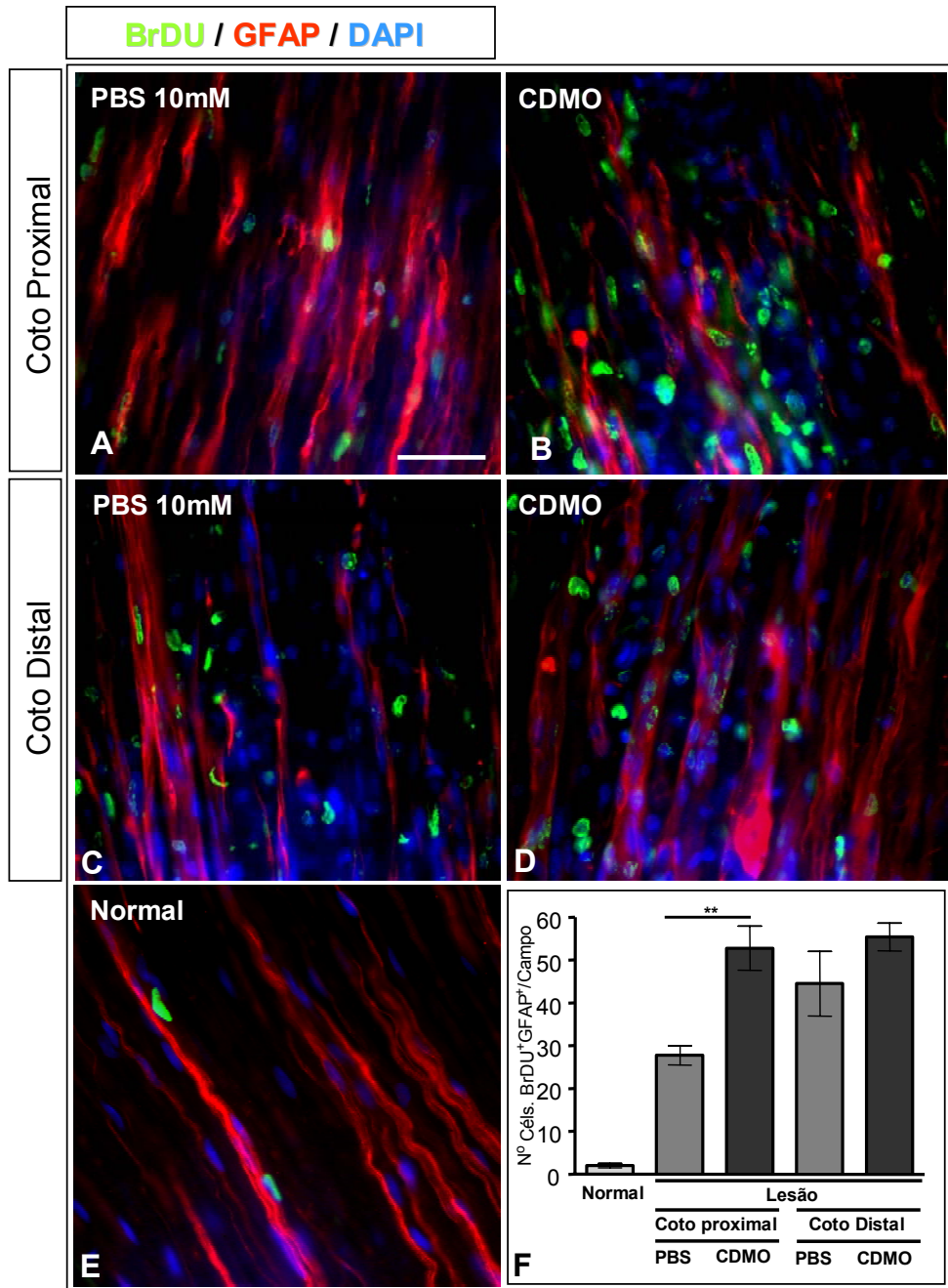
**Figura 17. Atividade trófica de CDMO aumenta a migração das células de Schwann a partir de explantes de nervo ciático lesionado.** Fotografias de explantes derivados de nervos ciáticos de ratos adultos, previamente lesionados por esmagamento (24h antes) e incubados durante 10 dias com DMEM F-12 (meio padrão, **A**), NGF 50ng/mL (**B**), BDNF 50ng/mL (**C**) e MC-CDMO (**D**). **E**: Fotomicrografia em maior aumento demonstrando células de Schwann (seta) e fibroblastos (cabeça de seta) que migraram a partir do explante de nervo ciático (Expl.). **F**: Histograma do número de células de Schwann e Fibroblastos que migraram a partir do explante de nervo ciático. Barra: **A-D**=200µm; **E**=100µm.

#### ***4.9- CDMO Aumentam a Proliferação de Células de Schwann in vivo .***

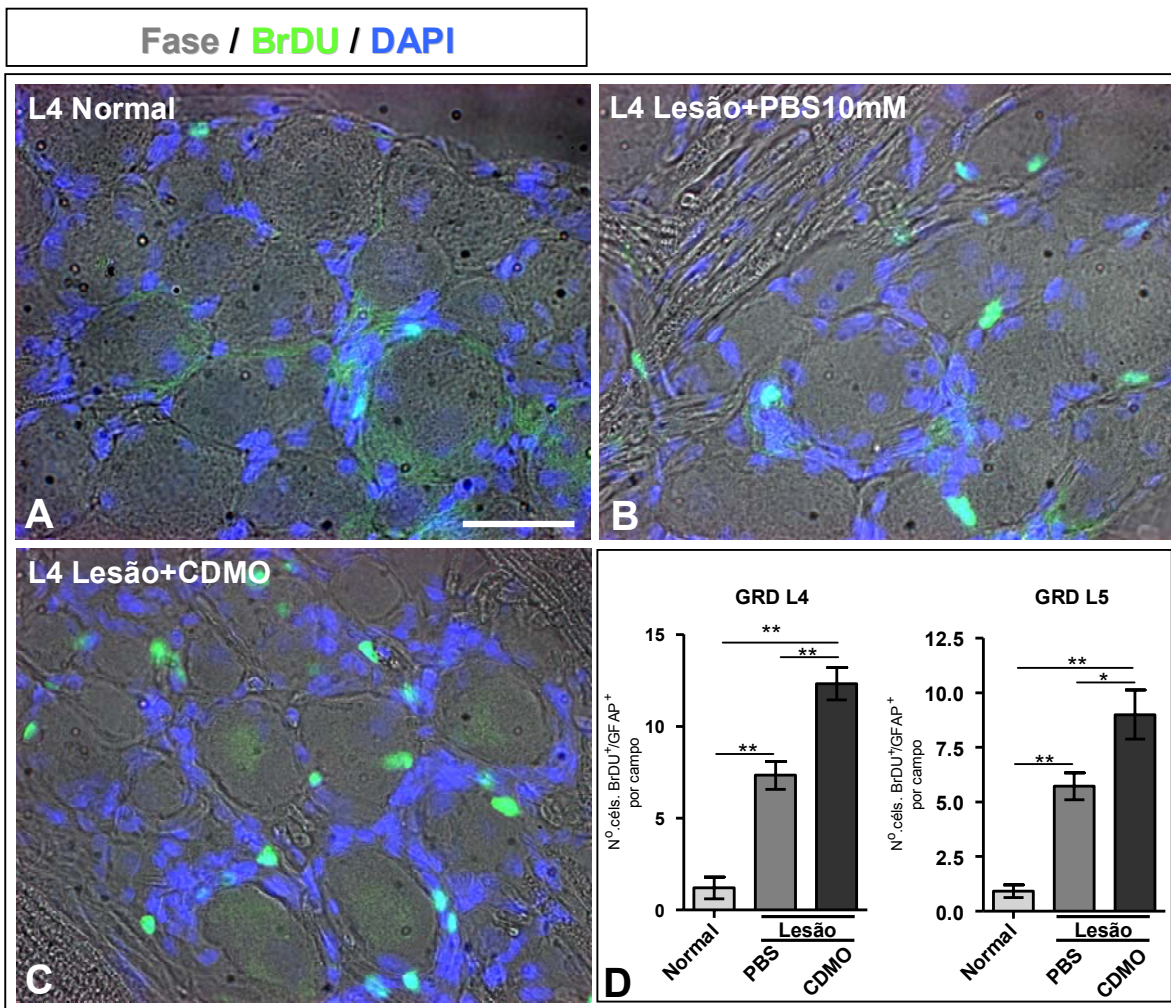
Para analisar uma possível contribuição das CDMO na proliferação de células de Schwann após lesão do nervo ciático, os animais receberam injeções intra-peritoniais de BrDU, durante dez dias, uma vez ao dia. A análise dos cortes longitudinais de nervo ciático mostrou intensa atividade proliferativa nas regiões adjacentes a lesão do nervo (Figura 18A-D). Os animais que receberam CDMO apresentaram um número 90% maior de células BrDU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> do que os que receberam apenas veículo (PBS10mM+Matrigel) (Figura 18 A, B, F,  $p<0,01$ ) mas, por outro lado, apresentaram cerca de 26 vezes mais células BrDU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> do que nos animais não lesionados (Figura 18 E e F,  $p<0,001$ ). No coto distal, no entanto, não houve diferença no número de células BrDU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> entre os animais que receberam células e os que receberam veículo (Figura 18 C, D e F).

#### ***4.10- CDMO Aumentam a Proliferação de Células Satélite no GRD in vivo.***

Para análise da proliferação de células satélite do GRD após lesão do nervo ciático e injeção das CDMO ou apenas veículo (PBS 10mM+Matrigel), os animais receberam durante dez dias, uma vez ao dia, injeções intra-peritoniais de BrDU. Cortes longitudinais de GRD (L4 e L5) imunoreagidos para BrDU revelaram a existência de uma proliferação basal de células satélite em ratos não lesionados (Figura 19 A). Por outro lado, observou-se que o número de células BrDU positivas aumentou 7 vezes após a lesão do nervo ciático e a injeção de veículo (Figura 19 B e D,  $p<0,001$ ) e 12 vezes nos animais que receberam CDMO (L4, Figura 19 C e D,



**Figura 18. CDMO aumentam a proliferação de células de Schwann in vivo após lesão do nervo ciático A-E:** Fotomicrografias de cortes logitudinais de nervo ciático 10 dias após lesão, duplamente marcados para BrDU (verde) e GFAP (vermelho) e contra-corados com DAPI. As imagens representam coto proximal de um rato que recebeu CDMO (A), o coto proximal de um rato que recebeu PBS10mM (B), o coto distal de um rato que recebeu CDMO (C), o coto distal de um rato que recebeu PBS10mM (D) e um nervo que não sofreu lesão (E). **F:** Histograma da proliferação das células de Schwann (BrDU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>) sob as diferentes condições experimentais. Barra: A-E=50µm.



**Figura 19. A atividade trófica de CDMO aumenta a proliferação das células-satélite do GRD após lesão do nervo ciático. A-C:** Fotomicrografias em contraste de fase e fluorescência de cortes longitudinais de GRD de ratos adultos que tiveram seus nervos ciáticos lesionados e receberam PBS10mM+Matrigel (B), CDMO+Matrigel (C) e de um nervo que não sofreu lesão (A), imunomarcados para BrDU e contra-corados com DAPI para visualização dos núcleos celulares. **D:** Histograma da análise da proliferação das células-satélite nos GRDs L4 e L5. Barra: A-C=50µm

$p < 0,001$ ). Os animais injetados com CDMO apresentaram 57,5% mais células BrDU positivas quando comparados aos animais injetados apenas com veículo (L4, Figura 19 D,  $p < 0,01$ ). O GRD L5 apresentou diferenças semelhantes às observadas em L4 (Figura 19 D).

Conclui-se que a lesão do nervo ciático seguida da injeção de veículo aumentou significativamente a proliferação de células satélite em ambos os GRDs analisados. As CDMO, por sua vez, potencializaram ainda mais o aumento da proliferação de células satélite.

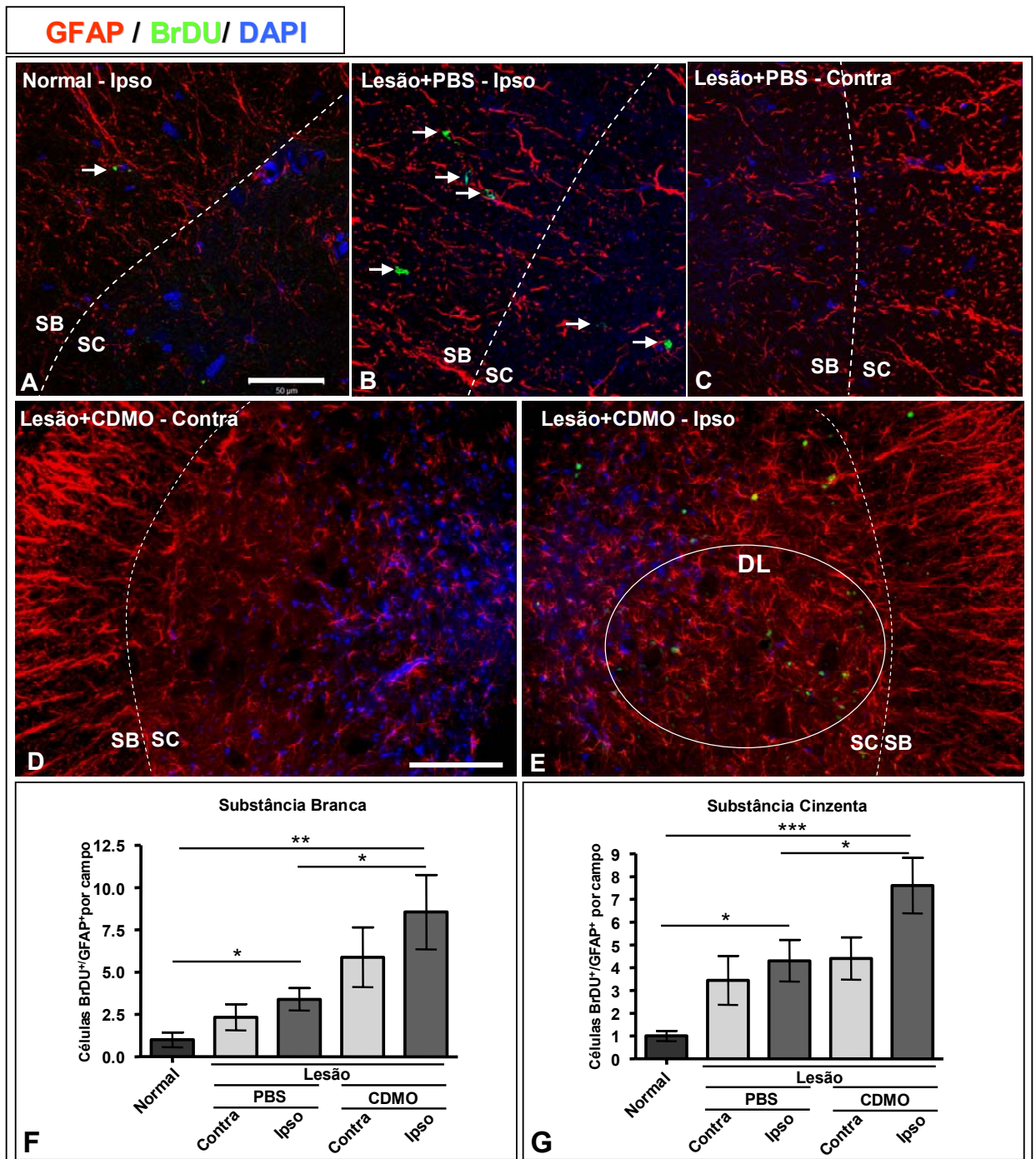
#### ***4.11- A Atividade trófica de CDMO aumenta a proliferação glial na medula espinhal após lesão do Nervo Ciático.***

Para a análise da proliferação glial na medula espinhal os animais cujos nervos ciáticos foram lesionados receberam durante dez dias, uma vez ao dia, injeções intra-peritoniais de BrDU. Os cortes longitudinais da região lombar (L4-L6) da medula espinhal mostraram que em animais não lesionados, existe uma proliferação basal de células gliais visualizadas com a dupla imunomarcação para BrDU e GFAP (Figura 20A). Na substância cinzenta não foi observada nenhuma marcação para BrDU nos animais não lesionados. Por outro lado, em animais lesionados que receberam PBS, o número de células BrDU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> foi 2 vezes maior ( $p < 0,05$ ) enquanto que na substância cinzenta esse aumento foi de 4 vezes ( $p < 0,05$ ) (Figura 20 B, F e G). No lado contra-lateral não houve diferença significativa entre os animais não lesionados e aqueles que receberam apenas PBS (Figura 20C, F e G).

Os animais que receberam CDMO apresentaram um aumento de 8,5 vezes no número de células BrDU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> positivas na substância branca quando comparados à mesma região nos animais não lesionados ( $p < 0.01$ ) (Figura 20 D e F). Essa diferença foi 1,2 vezes maior quando comparado aos animais lesionados que receberam apenas PBS 10mM. Por outro lado o número de células BrDU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> positivas foi 7,5 vezes maior nos animais que receberam CDMO quando comparados aos animais não lesionados, na substância cinzenta ( $p < 0,001$ ) (Figura 20 D e G). Esse número foi 76% maior quando comparado com animais lesionados que receberam apenas PBS 10mM. Não houve diferença significativa no número de células BrDU<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> positivas no lado contra lateral à lesão dos animais que receberam CDMO se comparados às demais regiões e condições experimentais. No entanto, também foram observadas células com esse perfil de marcação no lado contra-lateral de animais lesionados que receberam CDMO ou PBS 10mM.

Foi possível observar que a lesão do nervo ciático promoveu um aumento significativo no número de células gliais tanto na substância branca quanto na substância cinzenta do lado ipso lateral a lesão. As CDMO por sua vez aumentaram significativamente esse número de células gliais em proliferação.





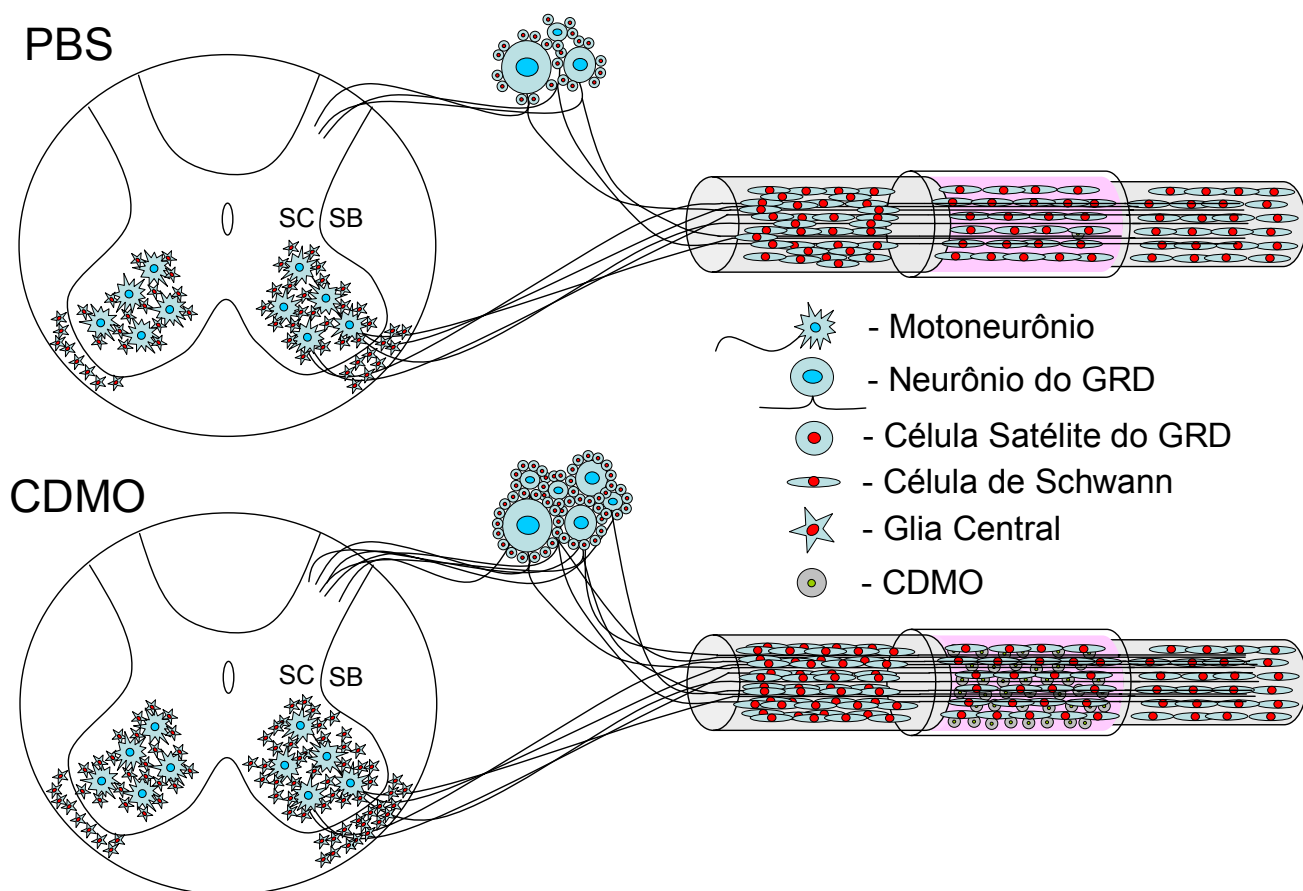
**Figura 20.** A atividade trófica de CDMO aumenta proliferação a glial no corno anterior da medula espinal após lesão do nervo ciático. **A-E:** Imagens obtidas por microscopia confocal de cortes transversais de medula espinal duplamente imunomarcados para GFAP (vermelho) e BrDU (verde) e contra corados com DAPI. A figura **A** representa a medula de um animal não lesionado. **B e C:** Região ipso-lateral (**B**) e região contra-lateral (**C**) de um animal lesionado que recebeu apenas 10mM. **D e E:** Região contra-lateral (**D**) e região ipso-lateral (**E**) de um animal lesionado que recebeu CDMO. **F e G:** Histogramas do número de células GFAP<sup>+</sup>/BrDU<sup>+</sup> presentes na substância cinzenta (DL) da medula espinal (**F**) e na região adjacente localizada na substância branca (**G**). **SC:** Substância cinzenta. **SB:** Substância branca. **DL:** Região dorso-lateral do corno anterior da medula espinal. Barras: **A-E**=50µm.

## **5- Conclusões**

---

- 1- CDMO se mantém no sítio onde foram injetadas e aumentam a regeneração dos axônios do nervo ciático no interior do tubo nos períodos iniciais (7 e 21 dias) após lesão;
- 2- CDMO aumentam a sobrevivência de neurônios sensitivos de gânglio da raiz dorsal (GRD), mas não aumentam a sobrevivência de motoneurônios 21 dias após lesão do nervo ciático;
- 3- CDMO aumentam o número de axônios de neurônios sensitivos e motores em regeneração após lesão do nervo ciático;
- 4- CDMO apresentam baixo potencial de diferenciação em células de Schwann 14 dias após lesão do nervo ciático *in vivo*, no entanto se mantém na região em regeneração;
- 5- A atividade trófica de CDMO promove sobrevivência neuronal e neuritogênese *in vitro*;
- 6- A atividade trófica de CDMO induz migração glial a partir de explantes de GRD e nervo ciático *in vitro*;
- 7- CDMO aumentam proliferação de células de Schwann no coto proximal e células satélite do GRD após lesão do nervo ciático *in vivo*;
- 8- CDMO aumentam a proliferação de astrócitos da medula espinhal após lesão do nervo ciático *in vivo*.





**Figura ilustrativa das conclusões.** CDMO podem contribuir para o aumento da sobrevivência de neurônios do GRD e para o aumento do número de axônios motores e sensitivos em regeneração. CDMO podem também contribuir para o aumento da proliferação glial de células de Schwann, no coto proximal do nervo ciático lesionado, aumento da proliferação de células satélite do GRD e aumento da proliferação glial na substância branca (SB) e na substância cinzenta (SC) da medula espinhal lombar.

## 6- Discussão

---

### ***6.1- Contribuições das células derivadas da medula óssea para a regeneração do sistema nervoso periférico: Estariam essas células agindo como mini-bombas de liberação contínua?***

Nesse trabalho, inicialmente observou-se que as CDMO se mantêm no sítio de lesão 7, 14 e 21 dias após transecção do nervo ciático e injeção das CDMO no tubo de polietileno. Essas células foram encontradas próximas aos axônios em regeneração, no interior do tubo de polietileno. Dados semelhantes foram demonstrados por Dezawa e colaboradores em 2001. Para visualizar os axônios em regeneração foram utilizadas as marcações de NF-200 e GAP-43 no coto distal à lesão, além da análise quantitativa dos corpos celulares Dil positivos. Desta forma foi possível analisar não só a extensão da regeneração, mas também o número de neurônios regenerando seus axônios ao longo do tubo e se reinserindo no coto distal a lesão. Através da marcação dos corpos celulares dos neurônios com Dil, foi possível também determinar quais populações celulares estavam regenerando seus axônios. Foi observado um aumento no número de axônios no interior do tubo nos animais tratados com CDMO comparados com os animais controle, 21 e 42 dias após o transplante das células. Não houve diferença entre os grupos experimentais sete dias após o transplante, todavia a média de crescimento axonal no interior do tubo foi maior nos animais transplantados. Juntos, esses dados sugerem que em períodos iniciais após a lesão, as CDMO podem contribuir de alguma forma para uma regeneração mais rápida dos axônios do nervo ciático lesionado.

Foi descrito que aproximadamente 40% dos neurônios do GRD sofrem apoptose após transecção total do nervo ciático de ratos ou camundongos adultos

(Holmberg et al., 2001; Pierucci e Oliveira, 2006). Também foi descrito recentemente que o volume total do GRD é reduzido em aproximadamente 15% após transecção total (West et al., 2007). Nossos resultados mostram que, animais que receberam transplante de CDMO no sítio de lesão tiveram uma diminuição na taxa de morte celular de neurônios quando comparados com o grupo controle. Houve em média uma redução de 31% no número de neurônios no GRD L4 e 22,5 % no GRD L5 após a transecção do nervo ciático. No entanto, quando os animais receberam CDMO houve um aumento de 14% no número de neurônios do GRD L4 e 17% no GRD segmento L5. Em contraste com esses números, a análise quantitativa dos motoneurônios revelou que não houve diferença nos animais que receberam CDMO ou apenas veículo (PBS10mM). É sabido que em mamíferos adultos não há morte celular de motoneurônios após transecção do nervo ciático (Hammanberg et al., 2000). Portanto, uma vez que não há perda dessa população neuronal, nossos resultados corroboram a ausência de contribuições das CDMO para um possível aumento da sobrevivência dos neurônios motores.

Foi demonstrado o aumento na densidade de axônios no coto distal a lesão 42 dias após o tratamento com as CDMO. Esse aumento foi revelado utilizando-se o GAP-43 como marcador para regeneração axonal, (Woolf et al., 1990; Chong et al., 1994; Yin et al., 2006) comparando-se os animais tratados com os que receberam apenas veículo. Utilizando Dil como traçador axonal (Rosário et al., 1993; Ramon-Cueto e Nieto-Sampedro, 1994; Oysiku e Wigston, 1996) aplicado no coto distal a lesão também foi possível observar a contribuição das CDMO para a regeneração de axônios de motoneurônios e neurônios do GRD. Além disso, observou-se que neurônios do GRD que possuem corpo celular de tamanho pequeno médio e grande regeneraram seus axônios.

Nossos resultados demonstram que CDMO apresentam atividade trófica promovendo sobrevivência neuronal e extensa neuritogênese *in vitro* (Figuras 14 e 15). É possível sugerir que os fatores tróficos liberados por CDMO estejam sendo transportados retrogradamente até os corpos celulares dos neurônios do GRD e motoneurônios, promovendo sobrevivência e crescimento axonal. Para fortalecer essa hipótese, nós observamos que CDMO<sup>GFP+</sup> não se diferenciam em células de Schwann, auxiliando assim na regeneração dos axônios. É conhecido o fato de que o transporte axonal retrógrado de fatores tróficos é aumentado após lesão de nervos periféricos (Murphy et al., 1999; Rind et al., 2006; Barati et al., 2006). A atividade trófica de CDMO foi observada em culturas de neurônios simpáticos dissociados após a incubação com MC-CDMO por 48h (Figura 14C), onde a sobrevivência e neuritogênese observadas foram semelhantes com a adição de NGF. Mais de 95% dos neurônios do gânglio simpático são responsivos ao NGF através da ligação aos receptores do tipo tirosina cinase A (TrKA) sinalizando para sobrevivência e crescimento axonal (Glevoba e Ginty, 2005). Além disso, aproximadamente 70% dos neurônios do GRD são neurônios nociceptivos e possuem receptores do tipo TrKA, portanto, também são responsivos ao NGF. A hipótese de que o NGF seja uma das moléculas expressas e secretadas por CDMO é fortalecida pela identificação do RNAm e da proteína através das técnicas RT-PCR, Western Blotting e ELISA utilizando material obtido do lisado de CDMO e meio condicionado de CDMO (Chen et al., 2007b; Pereira-Lopez et al., 2006; Crigler et al., 2006). Os dados referentes a expressão de BDNF variam de acordo com a população de CDMO estudadas. Pereira Lopez e colaboradores (2005) demonstraram a ausência do RNAm de BDNF em células do estroma da medula óssea de ratos através de RT-PCR. No entanto, em sub-populações de células mesenquimais humanas a expressão do BDNF é

maior que a expressão de NGF (Crigler et al., 2006). Qin Chen e colaboradores (2005) demonstraram que além de NGF e BDNF, células do estroma da medula óssea expressam também GDNF, CNTF e NT-3.

É cada vez mais frequente o número de trabalhos que mostram a contribuição de células derivadas da medula óssea através da expressão e liberação de moléculas com atividade sinalizadora em neurônios. No entanto, pouco se sabe sobre quais os tipos celulares envolvidos com a produção dos fatores tróficos e quais as condições ideais de cultivo ou transplante para que esse suporte trófico tenha o rendimento ideal.

## ***6.2- Atividade trófica de células derivadas da medula óssea agindo em duas populações celulares: Neurônios e Glia.***

### ***6.2.1- Proliferação de células de Schwann após lesão.***

Nossas observações sobre o efeito do meio condicionado das CDMO nos permite sugerir a existência de uma atividade direta sobre populações gliais, além do efeito direto sobre populações neuronais sugerido anteriormente. Foi demonstrado que o MC-CDMO aumenta preferencialmente o número de células de Schwann migratórias, após 10 dias de incubação de explantes de nervo ciático de ratos adultos previamente lesionados. Corroborando esses dados, foi observado que as CDMO são capazes de aumentar a proliferação das células de Schwann no coto proximal do nervo lesionado (Figura 18). Recentemente foi demonstrado que o FGF-2 ligando-se ao receptor de FGF tipo 3 é um potente indutor de proliferação de células de Schwann após lesão do nervo ciático de ratos adultos (Jungnickel et al., 2004). Esse mesmo fator é capaz de inibir a mielinização promovida por células de

Schwann durante esse mesmo período (Jungnickel et al., 2006). Dados recentes do nosso laboratório mostraram através de RT-PCR a presença do RNA mensageiro de FGF no lisado de células mesenquimais que foram cocultivadas com explantes de nervo ciático transecionado. Esse dado sugere que essa molécula ative a proliferação das células de Schwann a partir de fragmentos de nervo lesionado em cultura e também in vivo no coto proximal do nervo lesionado. O aumento das concentrações de BDNF durante a regeneração periférica e a ligação dessa neurotrofina ao receptor de baixa afinidade para neurotrofinas p75, promove remielinização das células de Schwann durante a regeneração do nervo ciático (Zhang et al., 2000; Song et al., 2006). Em paralelo aos efeitos das moléculas citadas acima, foi demonstrado que o TGF- $\beta$  é capaz de induzir nas células de Schwann o aumento da liberação de fatores tróficos (Rogister et al., 1993; Sulaiman e Gordon, 2002). Esse dado nos permite imaginar que a atividade trófica de CDMO possa também promover o aumento da secreção de fatores tróficos em populações residentes no SNP. Além disso, o TGF- $\beta$  quando adicionado sozinho em cultura primária de células de Schwann, induz morte celular. Porém, quando adicionado juntamente com Neuregulina-1 promove proliferação dessas células (D'Antônio et al., 2006).

A sobrevivência, proliferação e organização das células de Schwann são fundamentais para que os neurônios periféricos possam sobreviver e seus axônios regenerar. Dessa forma, a atividade trófica das CDMO se mostra importante para o aumento da regeneração do SNP, mesmo agindo indiretamente sobre populações gliais.

### **6.2.2- Proliferação das células satélite do GRD.**

A análise da marcação de BrDU também mostrou que as células satélite do GRD aumentaram sua proliferação *in vivo* 10 dias após a transecção do nervo ciático. Além disso, a atividade trófica das CDMO aumentou ainda mais essa proliferação glial no GRD. Células satélite eram consideradas apenas como células com função estrutural no GRD adulto até a década passada. No entanto, alguns trabalhos mostraram os papéis biológicos dessas células para a manutenção da homeostasia de neurônios após o desenvolvimento embrionário. Huang e colaboradores (2006) demonstraram através de injeção do corante fluorescente Lucifer yellow, que 26,2% das células satélite do gânglio da raiz dorsal se comunicam com os neurônios através de junções do tipo GAP. Eles demonstraram ainda que a diminuição do pH, que é comum em processos inflamatórios, diminui a comunicação entre essas células. Foi também caracterizado o transporte de íons ( $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ ), fatores tróficos (NGF, BDNF e NT-3) e segundos mensageiro (AMPc e GMPc) de células gliais para neurônios do GRD em ratos adultos (Liu et al., 2003; Thippeswamy et al., 2005; Arteaga et al., 2004). Essas informações sugerem que o aumento da proliferação de células satélite no GRD do rato adulto após o transplante de CDMO possa aumentar o suporte de fatores necessário reduzindo a morte celular dos neurônios. Além do suporte aos neurônios, células satélite atuam ainda no crescimento e manutenção de vasos sanguíneos do GRD através da liberação de VEGF (Kutcher et al., 2004). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de liberação de VEGF pelas CDMO com efeito sobre os vasos em crescimento no nervo em regeneração (para revisão ver Mendez-Otero et al., 2007).

Independente do aumento na proliferação glial no GRD após lesão do nervo ciático, foi demonstrada a existência de uma proliferação basal desse tipo celular em ratos não lesionados. Recentemente, Li e colaboradores (2007) isolaram e caracterizaram uma população de células progenitoras da crista neural no GRD de ratos adultos. Esse grupo mostrou que células semelhantes a progenitores gliais e neuronais são derivadas de células satélite, utilizando o ensaio de BrDU. Com base nessas observações, o grupo sugere que após lesão, novos neurônios podem ser gerados no GRD do rato adulto, a partir desses progenitores.

### ***6.2.3- Proliferação de células gliais na medula espinhal.***

Os ensaios de proliferação *in vivo* mostraram que a lesão do nervo ciático de ratos adultos aumenta a proliferação de células gliais no lado ipso- lateral a lesão na medula espinhal. Foi possível identificar células gliais duplamente positivas para BrDU e GFAP tanto na substância branca como na substância cinzenta. Esses dados sugerem que exista uma sinalização nas duas áreas do segmento lombar da medula espinhal induzindo a proliferação glial. Os animais que receberam o transplante de CDMO tiveram um aumento ainda maior na proliferação glial nas substâncias branca e cinzenta. Esse aumento de proliferação ocorreu em regiões próximas dos motoneurônios cujos axônios foram lesionados. Essa observação fortalece a hipótese de que fatores tróficos proveniente das CDMO e transportados pelos axônios possam estar estimulando o aumento da proliferação das células gliais vizinhas aos corpos celulares dos motoneurônios em regeneração. Sabe-se que lesões no SNC estimulam a proliferação de oligodendrócitos e astrócitos, que liberam uma variedade de fatores tróficos que atuam na sobrevivência e plasticidade



dos neurônios (Swanson et al., 2004; Ridet et al., 1997). Gao e colaboradores (2005) demonstraram que células do estroma da medula óssea quando co-cultivadas com astrócitos aumentam a produção de RNAm de BDNF, VEGF e FGFb. Uma vez que o BDNF tem papel fundamental na sobrevivência e plasticidade de motoneurônios via receptores TrKB, é possível que, tanto o BDNF liberado pelas CDMO como o aumento da expressão dessa neurotrofina pelos astrócitos, induzam um aumento no número de axônios em regeneração e o comprimento de regeneração.

### ***6.3- Perspectivas e considerações finais sobre o uso de CDMO em terapias celulares na regeneração do SNP.***

Os resultados apresentados neste trabalho associados aos dados recentemente apresentados por outros autores demonstram que as CDMO podem contribuir para a regeneração de nervos periféricos e recuperação da função comprometida. A análise da regeneração até seis semanas após lesão e tratamento com CDMO, como realizado neste trabalho, não é suficiente para o estudo da recuperação das funções perdidas. No entanto, é muito importante manter o maior número possível de neurônios em regeneração, para que a recuperação funcional em períodos posteriores represente efetivamente o restabelecimento da função perdida. As CDMO, através da secreção de fatores tróficos, podem ser utilizadas como uma ferramenta importante para terapias celulares em pacientes que sofreram algum tipo de lesão de nervos por acidente ou em decorrência de uma patologia que leve a compressão, rompimento ou perda de função. No Brasil, estudos clínicos preliminares utilizando CDMO foram realizados em pacientes com lesão de nervos periféricos. Embora os dados obtidos tenham sido animadores, ainda existe muita controvérsia na tentativa de explicar como essas células atuam na contribuição da

melhora da função perdida nesses pacientes. Além disso, o estudo de mecanismos fundamentais na contribuição das CDMO ajuda a entender quais populações celulares estão envolvidas na regeneração de nervos periféricos.

Ainda em relação aos estudos básicos, seria muito importante caracterizar os fatores que estão sendo produzidos pelas CDMO, não só em períodos curtos, mas também ao longo de todo o tratamento. É de fundamental importância a caracterização da ocorrência de mudanças no conjunto de fatores tróficos secretados ao longo do tratamento além da caracterização das populações celulares beneficiadas com tal procedimento.

## 7- Bibliografia

---

Aguayo AJ, Bray GM, Carter DA, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M (1990) Regrowth and connectivity of injured central nervous system axons in adult rodents. *Acta Neurobiol Exp (Klein-Parker et al.)* 50:381-389.

Aguayo AJ, David S, Bray GM (1981) Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 95:231-240.

Akassoglou K, Yu WM, Akpınar P, Strickland S (2002) Fibrin inhibits peripheral nerve remyelination by regulating Schwann cell differentiation. *Neuron* 33:861-875.

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968-973.

Antignani A, Youle RJ (2005) A chimeric protein induces tumor cell apoptosis by delivering the human Bcl-2 family BH3-only protein Bad. *Biochemistry* 44:4074-4082.

Arancio O, Chao MV (2007) Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. *Curr Opin Neurobiol* 17:325-330.

Arteaga MF, Gutierrez R, Avila J, Mobasher A, Diaz-Flores L, Martin-Vasallo P (2004) Regeneration influences expression of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-atpase subunit isoforms in the rat peripheral nervous system. *Neuroscience* 129:691-702.

Atanasoski S, Scherer SS, Sirkowski E, Leone D, Garratt AN, Birchmeier C, Suter U (2006) ErbB2 signaling in Schwann cells is mostly dispensable for maintenance of myelinated peripheral nerves and proliferation of adult Schwann cells after injury. *J Neurosci* 26:2124-2131.

Bajestan SN, Umehara F, Shirahama Y, Itoh K, Sharghi-Namini S, Jessen KR, Mirsky R, Osame M (2006) Desert hedgehog-patched 2 expression in peripheral nerves during Wallerian degeneration and regeneration. *J Neurobiol* 66:243-255.

Barati S, Hurtado PR, Zhang SH, Tinsley R, Ferguson IA, Rush RA (2006) GDNF gene delivery via the p75(NTR) receptor rescues injured motor neurons. *Exp Neurol* 202:179-188.

Barde YA (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2:1525-1534.

Berger A, Lassner F (1994) Peripheral nerve allografts: survey of present state in an experimental model of the rat. *Microsurgery* 15:773-777.

Bixby S, Kruger GM, Mosher JT, Joseph NM, Morrison SJ (2002) Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* 35:643-656.

Bomze HM, Bulsara KR, Iskandar BJ, Caroni P, Skene JH (2001) Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat Neurosci* 4:38-43.

Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M (2001) The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 15:66-78.

Brushart TM (1988) Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *J Neurosci* 8:1026-1031.

Brushart TM (1993) Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci* 13:2730-2738.

Brushart TM, Hoffman PN, Royall RM, Murinson BB, Witzel C, Gordon T (2002) Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci* 22:6631-6638.

Bunge RP (1993) Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 3:805-809.

Bunge RP (1994) The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *J Neurol* 242:S19-21.

Cabral-da-Silva MC, dos Santos NE, de Mello FG, Taylor JS, Tolkovsky AM, Linden R, Reis RA (2003) Herbimycin A induces sympathetic neuron survival and protects against hypoxia. *Neuroreport* 14:2397-2401.

Campana, W. M. and R. R. Myers (2003). Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 18(6): 1497-506.

Carulli D, Laabs T, Geller HM, Fawcett JW (2005) Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 15:116-120.

Chan JR, Cosgaya JM, Wu YJ, Shooter EM (2001) Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14661-14668.

Chan JR, Watkins TA, Cosgaya JM, Zhang C, Chen L, Reichardt LF, Shooter EM, Barres BA (2004) NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron* 43:183-191.

Chen ZL, Yu WM, Strickland S (2007a) Peripheral Regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 19(7):209-233.

Chen ZL, Strickland S (2003) Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol* 163:889-899.

Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, Wang CC, Wang WY, Huang YS, Hsu SH (2007b) Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol* 204:443-453.

Chen Q, Long Y, Yuan X, Zou L, Sun J, Chen S, Perez-Polo JR, Yang K (2005) Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *J Neurosci Res* 80:611-619.

Chong MS, Woolf CJ, Andrews P, Turmaine M, Schreyer DJ, Anderson PN (1994) The downregulation of GAP-43 is not responsible for the failure of regeneration in freeze-killed nerve grafts in the rat. *Exp Neurol* 129:311-320.

Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM (2002) The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science* 298:1245-1248.

Court FA, Sherman DL, Pratt T, Garry EM, Ribchester RR, Cottrell DF, Fleetwood-Walker SM, Brophy PJ (2004) Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature* 431:191-195.

Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG (2006) Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol* 198:54-64.

D'Antonio M, Droggiti A, Feltri ML, Roes J, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen KR (2006) TGFbeta type II receptor signaling controls Schwann cell death and proliferation in developing nerves. *J Neurosci* 26:8417-8427.

Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H (2001) Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 14:1771-1776.

Dezawa M (2002) Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. *Anat Sci Int* 77:12-25.

Dobrowsky RT, Jenkins GM, Hannun YA (1995) Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis. Modulation by co-expression of p75NTR with Trk receptors. *J Biol Chem* 270:22135-22142.

Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, Schneider W (2001) Tissue engineering of peripheral nerves: A comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. *Plast Reconstr Surg* 107:485-494; discussion 495-486.

Fansa H, Keilhoff G, Plogmeier K, Frerichs O, Wolf G, Schneider W (1999) Successful implantation of Schwann cells in acellular muscles. *J Reconstr Microsurg* 15:61-65.

Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556-562.

Gage FH (2002) Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 22:612-613.

Gao Q, Li Y, Chopp M (2005) Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult. *Neuroscience* 136:123-134.

Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C (2000a) Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* 22:987-996.

Garratt AN, Voiculescu O, Topilko P, Charnay P, Birchmeier C (2000b) A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool. *J Cell Biol* 148:1035-1046.

Giardino R, Nicoli Aldini N, Perego G, Cella G, Maltarello MC, Fini M, Rocca M, Giavaresi G (1995) Biological and synthetic conduits in peripheral nerve repair: a comparative experimental study. *Int J Artif Organs* 18:225-230.

Glebova NO, Ginty DD. (2005) Growth and survival signals controlling sympathetic nervous system development. *Annu Rev Neurosci.* 28:191-222.

Hammarberg H, Wallquist W, Piehl F, Risling M, Cullheim S (2000) Regulation of laminin-associated integrin subunit mRNAs in rat spinal motoneurons during postnatal development and after axonal injury. *J Comp Neurol* 428:294-304.

Heumann R (1987a) Regulation of the synthesis of nerve growth factor. *J Exp Biol* 132:133-150.

Heumann R, Lindholm D, Bandtlow C, Meyer M, Radeke MJ, Misko TP, Shooter E, Thoenen H (1987b) Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8735-8739.

Holmberg K, Shi TJ, Albers KM, Davis BM, Hokfelt T (2001) Effect of peripheral nerve lesion and lumbar sympathectomy on peptide regulation in dorsal root ganglia in the NGF-over expressing mouse. *Exp Neurol* 167:290-303.

Horie H, Kadoya T, Hikawa N, Sango K, Inoue H, Takeshita K, Asawa R, Hiroi T, Sato M, Yoshioka T, Ishikawa Y (2004) Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci* 24:1873-1880.

Huang TY, Hanani M, Ledda M, De Palo S, Pannese E (2006) Aging is associated with an increase in dye coupling and in gap junction number in satellite glial cells of murine dorsal root ganglia. *Neuroscience* 137:1185-1192.

Ijkema-Paassen J, Meek MF, Gramsbergen A (2001) Transection of the sciatic nerve and reinnervation in adult rats: muscle and endplate morphology. *Equine Vet J Suppl*:41-45.

Ijkema-Paassen J, Meek MF, Gramsbergen A (2002) Reinnervation of muscles after transection of the sciatic nerve in adult rats. *Muscle Nerve* 25:891-897.

Jaegle M, Meijer D (1998) Role of Oct-6 in Schwann cell differentiation. *Microsc Res Tech* 41:372-378.

Jessen KR, Mirsky R (1999) Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci* 22:402-410.

Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic J (1994) The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 12:509-527.

Jessen KR, Mirsky R (2002) Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat* 200:367-376.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49.

Joseph NM, Mukoyama YS, Mosher JT, Jaegle M, Crone SA, Dormand EL, Lee KF, Meijer D, Anderson DJ, Morrison SJ (2004) Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* 131:5599-5612.

Jungnickel J, Gransalke K, Timmer M, Grothe C (2004) Fibroblast growth factor receptor 3 signaling regulates injury-related effects in the peripheral nervous system. *Mol Cell Neurosci* 25:21-29.

Jungnickel J, Haase K, Konitzer J, Timmer M, Grothe C (2006) Faster nerve regeneration after sciatic nerve injury in mice over-expressing basic fibroblast growth factor. *J Neurobiol* 66:940-948.

Kiyotani T, Teramachi M, Takimoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Endo K. (1996) Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.* 740:66-74.

Kopitz J, von Reitzenstein C, Burchert M, Cantz M, Gabius HJ (1998) Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *J Biol Chem* 273:11205-11211.

Kutcher ME, Klagsbrun M, Mamluk R (2004) VEGF is required for the maintenance of dorsal root ganglia blood vessels but not neurons during development. *Faseb J* 18:1952-1954.

Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ (2002) Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35:657-669.

Langone F, da-Silva CF (1990) Exogenous ganglioside stimulation of axonal regeneration after nerve transection and entubulation repair. *Braz J Med Biol Res* 23:823-826.

Langone F, Lora S, Veronese FM, Caliceti P, Parnigotto PP, Valenti F, Palma G (1995) Peripheral nerve repair using a poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials* 16:347-353.

Lankford KL, Waxman SG, Kocsis JD (1998) Mechanisms of enhancement of neurite regeneration in vitro following a conditioning sciatic nerve lesion. *J Comp Neurol* 391:11-29.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6:1229-1234.

Le Douarin NM, Brito JM, Creuzet S (2007) Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Res Rev*.

Lemke G (2006) Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE* 2006:pe11.

Lietz M, Dreesmann L, Hoss M, Oberhoffner S, Schlosshauer B (2006) Neuro tissue engineering of glial nerve guides and the impact of different cell types. *Biomaterials* 27:1425-1436.

Li HY, Say EH, Zhou XF (2007) Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells* 25:2053-2065.

Li, X., S. L. Gonias, et al. (2005). Schwann cells express erythropoietin receptor and represent a major target for Epo in peripheral nerve injury. *Glia* 51(4): 254-65.

Liu F, Wang T, Li M, Wu L, Feng Z, Wang T (2003) [Expression of NGF, BDNF and NT-3 in satellite cells of dorsal root ganglion. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 34:36-39.

Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK (2005) Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood. *J Lab Clin Med* 146:271-278.

Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE (2007) The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res* 4:143-151.



Markus A, Patel TD, Snider WD (2002) Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 12:523-531.

Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, Topilko P (2004) Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat Neurosci* 7:930-938.

Martinelli C, Sartori P, Ledda M, Pannese E (2004) Gap junctions between perineuronal satellite cells increase in number with age in rabbit spinal ganglia. *J Submicrosc Cytol Pathol* 36:17-22.

McKerracher L (2002) Ganglioside rafts as MAG receptors that mediate blockade of axon growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7811-7813.

McKerracher L, Ellezam B (2002) Development. Putting the brakes on regeneration. *Science* 296:1819-1820.

Mears S, Schachner M, Brushart TM (2003) Antibodies to myelin-associated glycoprotein accelerate preferential motor reinnervation. *J Peripher Nerv Syst* 8:91-99.

Mendez-Otero R, de Freitas GR, Andre C, Furtado de Mendonca ML, Friedrich M, Oliveira-Filho J (2007) Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. *Regen Med* 2:417-423.

Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* 304:700-703.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. (2001) *Exp Biol Med* (Maywood). 226:507-20.

Mirsky R, Jessen KR, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E, Lawson D (2002) Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris* 96:17-24.

Murphy PG, Borthwick LS, Johnston RS, Kuchel G, Richardson PM. (1999) Nature of the retrograde signal from injured nerves that induces interleukin-6 mRNA in neurons. *J Neurosci.* 19:3791-800.

Nakamura T, Inada Y, Fukuda S, Yoshitani M, Nakada A, Itoi S, Kanemaru S, Endo K, Shimizu Y (2004) Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res* 1027:18-29.

Neuhuber B, Timothy Himes B, Shumsky JS, Gallo G, Fischer I (2005) Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Res* 1035:73-85.

Negishi H, Dezawa M, Oshitari T, Adachi-Usami E (2001) Optic nerve regeneration within artificial Schwann cell graft in the adult rat. *Brain Res Bull* 55:409-419.

Nicholls, J.G. Wallace, B.G., Fuchs, P.A., Martin, A.R. (2001) *From Neuron to Brain*. Quarta edição. Sinauer associates.

Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005) p75NTR--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15:49-57.

Oyesiku, N. M. and D. J. Wigston (1996). Ciliary neurotrophic factor stimulates neurite outgrowth from spinal cord neurons. *J Comp Neurol* 364(1): 68-77.

Pan YA, Misgeld T, Lichtman JW, Sanes JR (2003) Effects of neurotoxic and neuroprotective agents on peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo. *J Neurosci* 23:11479-11488.

Pereira Lopes FR, Camargo de Moura Campos L, Dias Correa J, Jr., Balduino A, Lora S, Langone F, Borojevic R, Blanco Martinez AM (2006) Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp Neurol* 198:457-468.

Pevny L, Rao MS (2003) The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci* 26:351-359.

Pietri T, Eder O, Breau MA, Topilko P, Blanche M, Brakebusch C, Fassler R, Thiery JP, Dufour S (2004) Conditional beta1-integrin gene deletion in neural crest cells causes severe developmental alterations of the peripheral nervous system. *Development* 131:3871-3883.

Pierucci A, de Oliveira AL (2006) Increased sensory neuron apoptotic death 2 weeks after peripheral axotomy in C57BL/6J mice compared to A/J mice. *Neurosci Lett* 396:127-131.

Poliak S, Peles E (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* 4:968-980.

Qiu J, Cai D, Filbin MT (2002) A role for cAMP in regeneration during development and after injury. *Prog Brain Res* 137:381-387.

Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M (1994) Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* 127:232-244.

Reis RA, Cabral da Silva MC, Loureiro dos Santos NE, Bampton E, Taylor JS, de Mello FG, Linden R (2002) Sympathetic neuronal survival induced by retinal trophic factors. *J Neurobiol* 50:13-23.

Ribeiro-Resende VT, Oliveira-Silva A, Ouverney-Brandao S, Santiago MF, Hedin-Pereira C, Mendez-Otero R (2007) Ganglioside 9-O-acetyl GD3 expression is upregulated in the regenerating peripheral nerve. *Neuroscience* 147:97-105.

Richardson PM, Issa VM (1984) Peripheral injury enhances central regeneration of primary sensory neurones. *Nature* 309:791-793.

Richardson JS (1999) Neuroprotective agents. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 10:447-461.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.

Rind HB, Butowt R, von Bartheld CS (2005) Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *J Neurosci*. 25:539-49.

Rogister B, Delree P, Leprince P, Martin D, Sadzot C, Malgrange B, Munaut C, Rigo JM, Lefebvre PP, Octave JN, et al. (1993) Transforming growth factor beta as a neuronogial signal during peripheral nervous system response to injury. *J Neurosci Res* 34:32-43.

Rosario CM, Aldskogius H, Carlstedt T, Sidman RL (1993) Differentiation and axonal outgrowth pattern of fetal dorsal root ganglion cells orthotopically allografted into adult rats. *Exp Neurol* 120:16-31.

Ruscheweyh R, Forsthuber L, Schoffnegger D, Sandkuhler J (2007) Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with A-beta-, A-delta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. *J Comp Neurol* 502:325-336.

Schwab ME (2004) Nogo and axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 14:118-124. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4:193-205.

Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6:683-690.

Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD (2006) Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1477-1497.

Song XY, Zhou FH, Zhong JH, Wu LL, Zhou XF (2006) Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. *J Neurochem* 96:833-842.

Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.

Sulaiman OA, Gordon T (2002) Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. *Glia* 37:206-218.

Suzuki G, Ochi M, Shu N, Uchio Y, Matsuura Y (1998) Sensory neurons regenerate more dominantly than motoneurons during the initial stage of the regenerating process after peripheral axotomy. *Neuroreport* 9:3487-3492.

Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4:193-205.

Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL (2005) Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47:681-694.

Teng KK, Hempstead BL (2004) Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* 61:35-48.

Teng YD, Lavik EB, Qu X, Park KI, Ourednik J, Zurakowski D, Langer R, Snyder EY (2002) Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3024-3029.

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545.

Thippeswamy T, McKay JS, Morris R, Quinn J, Wong LF, Murphy D (2005) Glial-mediated neuroprotection: evidence for the protective role of the NO-cGMP pathway via neuron-glia communication in the peripheral nervous system. *Glia* 49:197-210.

Tofaris, G. K., P. H. Patterson, et al. (2002). "Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF." *J Neurosci* 22(15): 6696-703.

Tolwani RJ, Cosgaya JM, Varma S, Jacob R, Kuo LE, Shooter EM (2004) BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 77:662-669.

Tonra JR, Curtis R, Wong V, Cliffer KD, Park JS, Timmes A, Nguyen T, Lindsay RM, Acheson A, DiStefano PS (1998) Axotomy upregulates the anterograde transport and expression of brain-derived neurotrophic factor by sensory neurons. *J Neurosci* 18:4374-4383.

Tonra JR, Curtis R, Wong V, Cliffer KD, Park JS, Timmes A, Nguyen T, Lindsay RM, Acheson A, DiStefano PS (1998) Axotomy upregulates the anterograde

transport and expression of brain-derived neurotrophic factor by sensory neurons. *J Neurosci* 18:4374-4383.

Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL (2002) Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 297:2256-2259.

Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (2002) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420:74-78.

Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M (2003) Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422:897-901.

West CA, Davies KA, Hart AM, Wiberg M, Williams SR, Terenghi G (2007) Volumetric magnetic resonance imaging of dorsal root ganglia for the objective quantitative assessment of neuron death after peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 203:22-33.

Wetmore C, Olson L (1995) Neuronal and nonneuronal expression of neurotrophins and their receptors in sensory and sympathetic ganglia suggest new intercellular trophic interactions. *J Comp Neurol* 353:143-159.

Williams AC, Brophy PJ (2002) The function of the Periaxin gene during nerve repair in a model of CMT4F. *J Anat* 200:323-330.

Woolf, C. J., M. L. Reynolds, et al. (1990). The growth-associated protein GAP-43 appears in dorsal root ganglion cells and in the dorsal horn of the rat spinal cord following peripheral nerve injury. *Neuroscience* 34(2): 465-78.

Vargas ME, Barres BA (2007) Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* 30:153-179.

Vyas AA, Patel HV, Fromholt SE, Heffer-Lauc M, Vyas KA, Dang J, Schachner M, Schnaar RL (2002) Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8412-8417.

Yamauchi J, Chan JR, Shooter EM (2004) Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8774-8779.

Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Terao S, Mitsuma T (1996) Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res* 21:929-938.

Yin Y, Henzl MT, Lorber B, Nakazawa T, Thomas TT, Jiang F, Langer R, Benowitz LI (2006) Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat Neurosci* 9:843-852.

Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF (2000) Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci* 12:4171-4180.

Zhang X, Chen Y, Wang C, Huang LY (2007) Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9864-9869.

# 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](#)