

Engenharia de Tecidos para regeneração do tecido nervoso: retrospectiva e perspectivas futuras

**Ângela Fernandes Gomes Borlido**

**Engenharia de Tecidos para regeneração do tecido nervoso:  
retrospectiva e perspectivas futuras**

**Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto**

**2014**

**Ângela Fernandes Gomes Borlido**

**Engenharia de Tecidos para regeneração do tecido nervoso:  
retrospectiva e perspectivas futuras**

**Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde**

**Porto**

**2014**

**Ângela Fernandes Gomes Borlido**

**Engenharia de Tecidos para regeneração do tecido nervoso:  
retrospectiva e perspectivas futuras**

---

Assinatura

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

## **Resumo**

A Engenharia de Tecidos é o ramo da Engenharia que se preocupa no desenvolvimento de metodologias e estratégias para a reparação, regeneração e substituição de tecidos e órgãos lesados.

A regeneração do tecido nervoso é um fenómeno biológico complexo. Pois, o Sistema Nervoso Periférico regenera-se sensivelmente no seu ambiente promissor, enquanto que o Sistema Nervoso Central, mais concretamente na medula espinal não se regenera sensivelmente no seu ambiente nativo.

Este trabalho consiste numa pesquisa bibliográfica da Engenharia de Tecidos aplicada ao tecido nervoso, incluindo assim, as metodologias alcançadas até ao momento na regeneração deste tecido. No entanto, a aplicabilidade clínica ainda não é significativa, de maneira, que a investigação a este nível continua a ser bastante promissora.

## **Abstract**

The Tissue Engineering is the branch of engineering that is concerned in the development of methodologies and strategies for the repair, regeneration and replacement of damaged tissues and organs.

The nerve tissue regeneration is a complex biological phenomenon. The Peripheral Nervous System regenerates substantially in its promising environment, while the Central Nervous System, in particular in the spinal cord, does not regenerate substantially in its native environment.

This work consists of a literature research of tissue engineering applied to the nerve tissue, including the methodologies achieved so far in the regeneration of this tissue. However, the clinical applicability is still not significant, so that research on this level is still very promising.

## **Agradecimentos**

Um especial agradecimento à Professora Dr<sup>a</sup> Maria Pia Ferraz, por ser minha orientadora na elaboração deste trabalho e pela disponibilidade, apoio e confiança na concretização deste, um muito obrigada.

A todos os professores que fizeram parte deste longo percurso, também um muito obrigada.

Os meus maiores agradecimentos aos meus pais, que sempre me apoiaram nos bons e maus momentos, sendo eles as principais figuras no decorrer do percurso académico, pois sem eles não seria possível a concretização deste.

Ao meu irmão, que apesar de já não se encontrar entre nós, sei que sempre me apoiou e esteve ao meu lado nos piores momentos.

Ao meu namorado, pela sua tamanha paciência, sendo incansável naquilo que me poderia ajudar, nunca me deixando desistir.

Aos meus amigos e a todos os colegas que percorreram comigo este percurso académico, com um agradecimento especial a duas companheiras do curso, Ariana Lima e Ana Isabel Varejão, pois foi principalmente com a companhia e amizade delas o decorrer deste percurso.

## Índice

<b>Capítulo I - Introdução</b> .....	<b>10</b>
<b>Capítulo II – A Engenharia de Tecidos</b> .....	<b>12</b>
1. Conceito da Engenharia de Tecidos.....	12
2. Técnica.....	14
3. Células Estaminais.....	16
3.1. Células Estaminais Embrionárias .....	17
3.2. Células Estaminais não Embrionárias .....	17
4. Suporte.....	18
4.1. Suportes naturais.....	20
4.2. Suportes sintéticos .....	21
<b>Capítulo III – Sistema Nervoso</b> .....	<b>24</b>
1. Divisão e funções.....	24
2. Neuroglia .....	26
3. Neurónio .....	28
4. Potencial de ação .....	31
5. Nervos.....	33
<b>Capítulo IV – Lesão do nervo e regeneração</b> .....	<b>35</b>
1. Sistema Nervoso Periférico .....	35
2. Sistema Nervoso Central .....	37
<b>Capítulo V – Engenharia de Tecidos na regeneração do tecido nervoso</b> .....	<b>39</b>
1. Enxertos de tecido nervoso.....	41
2. Tubulização.....	43
2.1. Tubos biológicos.....	44
2.2. Tubos sintéticos .....	46
2.3. Tubos combinados.....	49
3. Terapia Celular .....	50
3.1. Células de Schwann.....	50
3.2. Células Olfativas Eansheathing (OEC's).....	53
3.3. Células Estaminais.....	54
3.4. Entrega de células.....	56
4. Terapia Biomolecular .....	57
4.1. Fatores neurotróficos .....	57
4.2. Métodos de entrega.....	60

<b>Capítulo VI – Perspetivas futuras.....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo VII – Conclusão .....</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo VIII – Referências Bibliográficas.....</b>	<b>66</b>

## **Índice de figuras**

Figura 1 – Abordagens da Engenharia de Tecidos .....	13
Figura 2 – Neuroglia do SNC .....	28
Figura 3 – Estrutura de um neurónio .....	30
Figura 4 – Sinapse .....	33
Figura 5 – Propriedades do canal ideal de orientação do nervo .....	48

## Capítulo I – Introdução

Durante séculos, devido aos poucos recursos terapêuticos disponíveis, as lesões teciduais no ser humano eram resolvidas com a remoção da porção lesada, trazendo várias limitações ao paciente, incluindo um significativo decréscimo na qualidade de vida (Santos, A. e Wada, M., 2007).

Com o aumento da esperança média de vida humana, a descoberta por metodologias para a substituição de tecidos lesados tornou-se uma necessidade (Santos, A. e Wada, M., 2007). O ramo da Engenharia de Tecidos tem crescido exponencialmente ao longo das últimas décadas, devido à grande vontade e emoção de desenvolver, e substituir tecidos do corpo funcionais (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

O tratamento de tecidos e órgãos doentes é um problema de saúde contínuo que pode ser resolvido com tecidos artificiais. Sendo a Engenharia de Tecidos uma grande promessa para o desenvolvimento de métodos para criar modelos com a organização estrutural de tecidos nativos, pode assim ser útil para a medicina regenerativa e também para a pesquisa no ramo farmacêutico (Tekin, H. *et al.*, 2011). A Engenharia de Tecidos tornou-se assim o grande objetivo para a prática da medicina regenerativa.

Na atualidade, técnicas modernas de transplante de tecidos e órgãos de um indivíduo para outro têm sido revolucionárias. De certo modo, a transplantação pode ser vista como a mais extrema forma de cirurgia reconstrutiva, transferindo tecido de um indivíduo para outro (Vacanti, J. e Vacanti, C., 2007).

A regeneração do tecido nervoso tem sido alvo de investigação por vários cientistas, uma vez que a lesão deste afeta a qualidade de vida da população que enfrenta este tipo de lesões. Sendo uma das mais devastadoras lesões que podem afetar o ser humano, estas apresentam limitada ou nenhuma recuperação neurológica. Deste modo, as estratégias de bioengenharia para o Sistema Nervoso Periférico estão focadas em alternativas para o enxerto do nervo, e para a lesão da espinal medula estão focadas na criação de um ambiente permissivo para a sua regeneração (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). Assim, o interesse na regeneração do nervo periférico tornou-se o foco principal

de pesquisa, e uma grande área de crescimento no campo da engenharia de tecidos (Chaulfaun, C., *et al.*, 2006).

Recentes avanços em regeneração nervosa envolveram a aplicação de princípios de Engenharia de Tecidos, evoluindo assim uma nova perspectiva na terapia neural (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

Resumidamente, a Engenharia de Tecidos consiste num campo multidisciplinar, baseada em conhecimentos nas áreas das ciências e engenharias de materiais, biológica e médica, com o objetivo de desenvolver substitutos de órgãos e tecidos que visem à sua regeneração (Carvalho, A. *et al.*, 2010). Ou seja, baseia-se no uso de suportes biológicos ou sintéticos, mais conhecidos como *scaffolds*, que são cultivados com células vivas, para então serem reinseridos no paciente de forma a regenerar a forma ou a função de um tecido ou um órgão danificado (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

Assim, podemos constatar que a Engenharia de Tecidos depende de três condições importantes: fonte celular, *scaffolds* e fatores de indução para o crescimento celular. Nas estratégias mais atuais e com mais sucesso para o tratamento da perda de tecidos, residem a utilização de enxertos autógenos, alógenos e materiais sintéticos (Cardoso, G. e Arruda, A., 2009).

## Capítulo II – A Engenharia de Tecidos

### 1. Conceito da Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos é um campo multidisciplinar focada no desenvolvimento e aplicação dos conhecimentos em química, física, engenharia, ciências da vida e clínica para a solução de problemas médicos críticos, como perda de tecidos e falência de órgãos (Armentano, I. *et al.*, 2010).

Durante séculos a remoção do tecido lesado era a prática comum na resolução de lesões teciduais, trazendo bastantes consequências e limitações aos pacientes, entre as quais um decréscimo na qualidade de vida do paciente. Assim, a Engenharia de Tecidos no que toca à substituição e/ou regeneração de tecidos ou órgãos danificados tornou-se o grande objetivo (Santos, A. e Wada, M., 2007).

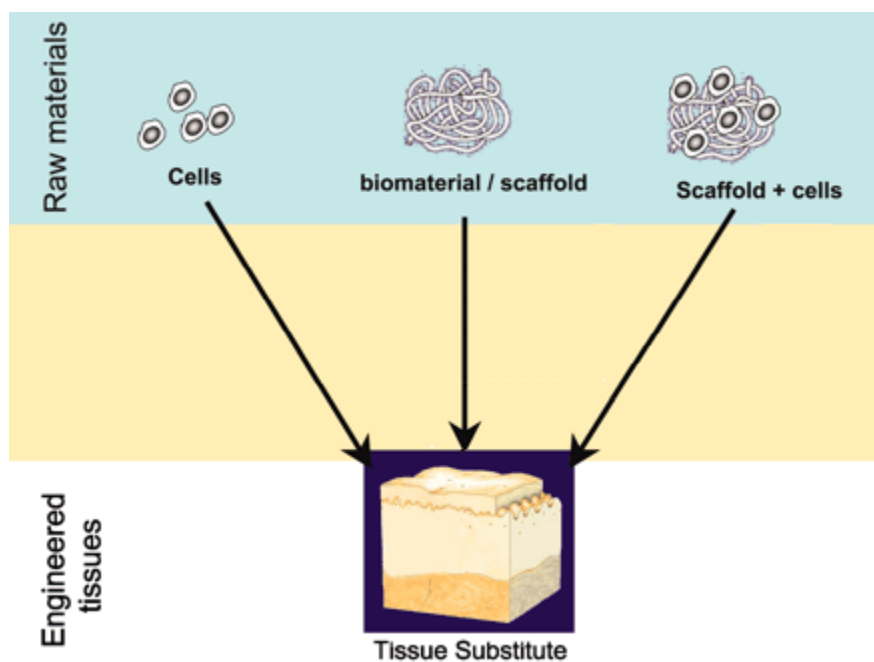
As correntes modalidades terapêuticas para tratar a perda de tecidos ou órgãos incluem dispositivos artificiais ou mecânicos, tecidos processados biologicamente, transplantação de órgãos de um indivíduo para outro, reconstrução cirúrgica e transferência de tecido autólogo para o local da lesão (Saxena, A., 2005).

Na Engenharia de Tecidos, dois procedimentos suprimem a falta de tecidos e órgãos danificados, que são elas a transplantação e a implantação. Nos transplantes, é necessária a utilização de fármacos imunossupressores e antimicrobianos, para evitar de haver rejeição nem infecção, respetivamente. No caso dos implantes, estes são criados para atuarem na interface com os tecidos recetores no organismo, interagindo com eles, sem apresentarem os problemas associados a um transplante (Santos, A. e Wada, M., 2007).

A Engenharia de Tecidos envolve a compreensão fundamental da relação estrutura - função em tecidos normais e patológicos, para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos (Armentano, I. *et al.*, 2010).

É uma técnica que consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, em que é retirado tecido do próprio paciente para este ser cultivado sobre suportes biológicos ou sintéticos (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

A Engenharia de Tecidos tem três abordagens gerais (Figura 1): (1) a utilização de células isoladas ou substitutos de células para substituir a função perdida, (2) a utilização de materiais que são capazes de induzir a regeneração de tecidos, e (3) a utilização de suportes feitos de uma combinação entre as células e materiais (Khademhosseini, A. *et al.*, 2006).



**Figura 1** - Abordagens da Engenharia de Tecidos. Adaptado de Khademhosseini, A. *et al.*, 2006.

A aplicação de células vivas para substituir ou regenerar um tecido ou órgão, pode ser feita *in vivo*, ou *in vitro* e em seguida ser implantado no paciente. Para induzir a regeneração no interior de um biomaterial, este é sintetizado *in vitro* e, em seguida, são testados vários parâmetros, tais como toxicidade e patogenicidade antes dos ensaios *in vivo*. Em dispositivos de combinação de suporte com as células vivas, estas são incorporadas no interior do suporte, que contém matriz extracelular, para estas crescerem, proliferarem e se diferenciarem (Khademhosseini, A. *et al.*, 2006).

Após implantação no paciente, as células vivas migram para o suporte ou já estão associadas a ele, começando a regenerar ou a formar o tecido que se pretende, através de sinais biológicos (Vacanti, J. e Vacanti, C., 2007).

## 2. Técnica

A intenção primária de todas as abordagens em engenharia de tecidos é a restauração funcional ou estrutural do tecido através da entrega de elementos vivos que se integram no paciente (Saxena, A., 2005).

A estratégia de transplante celular reflete a natureza multidisciplinar da Engenharia de Tecidos, uma vez que requer vários especialistas em diferentes ramos das ciências e da engenharia. Ou seja, é necessário um especialista na colheita de tecido onde contenha as células de interesse, e de seguida, um especialista em histologia para multiplicar as células em laboratório mantendo as suas funções. No que toca ao ramo da engenharia, esta é importante na produção do tecido que se pretende, em biorreatores e materiais de suporte das células. Por último, um especialista na transplantação do tecido para o paciente (Cardoso, G. e Arruda, A., 2009).

A técnica de Engenharia de Tecidos consiste na escolha das células e de um suporte apropriado, de material biodegradável, para ser reabsorvido, degradado e eliminado; e poroso, para favorecer o crescimento celular e formação de tecido. Este, também deve ser tridimensional para proporcionar um ambiente biologicamente relevante para as células durante a cultura das mesmas e o implante. Quando as células são cultivadas no suporte, este tem que conter matriz extracelular para o fornecimento de fatores de crescimento, oxigénio, entre outros fatores importantes para o crescimento e maturação do tecido. De seguida, o tecido é implantado no paciente com o objetivo de promover a regeneração do tecido/órgão lesado (Vacanti, J. e Vacanti, C., 2007).

Segundo Barbanti, S. *et al.*, 2005, “a preparação dos produtos da engenharia de tecidos seguem as seguintes etapas:

- (I) Seleção e processamento do suporte
- (II) Inoculação da população celular sobre o suporte
- (III) Crescimento do tecido prematuro

- (IV) Crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico (biorreator)
- (V) Reimplante cirúrgico
- (VI) Assimilação do produto.”

As células a usar na técnica de regeneração de tecidos ou órgãos podem ser autólogas (do próprio paciente), alogénicas (de outro ser humano), ou xenogénicas (de origem animal) (Vacanti, J. e Vacanti, C., 2007).

Tecidos alogénicos ou xenogénicos têm a vantagem de que a sua utilização e abastecimento pode ser grande, uma vez que não necessita da colheita a partir do próprio paciente. No entanto, o uso destas duas origens de tecidos, para além de correrem o risco de serem rejeitados, possuem também algum risco de transmissão de doenças, devendo ser usados em conjunto com imunossuppressores (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

De origem autóloga e alogénica, a colheita das células é feita através de uma biópsia ao paciente e ao dador, respetivamente, ou ainda através das células estaminais do cordão umbilical guardadas por criopreservação (Vacanti, J. e Vacanti, C., 2007).

A origem/escolha das células implica fatores como a imunidade; a realização da biópsia, sendo este um método invasivo; a utilização de células estaminais e os custos socioeconómicos que envolvem os procedimentos (Vacanti J. e Vacanti, C., 2007).

A capacidade de diferenciação das células também é um ponto importante no que toca à regeneração de tecidos, uma vez que existem diferentes tipos de tecidos. Assim, o uso de células estaminais é preferível, uma vez que estas têm a capacidade de desenvolver diferentes tipos de linhagens celulares, ou seja, o tecido que se pretende regenerar (Vacanti J. e Vacanti, C., 2007).

Para obter o sucesso do crescimento e reparação de tecidos *in vivo*, é importante conhecer as propriedades mecânicas do suporte, assim como, analisar o comportamento das células em contacto com os biomateriais utilizados na fabricação do suporte. Pois, com esta avaliação *in vitro*, permite-nos otimizar o tipo de material utilizado para determinado tecido/órgão que se pretende criar/regenerar (Khademhosseini, A. *et al.*, 2006). Pois, a adequação do design do suporte e a composição da matriz extracelular e do

suporte, são fatores importantes que têm que ser avaliados *in vitro*, de forma a que haja compatibilidade entre as células e o suporte na criação do novo tecido que se pretende (Vacanti J. e Vacanti, C., 2007).

### 3. Células Estaminais

As células tronco ou células estaminais, são células indiferenciadas capazes de se autorregenerar originando novas células tronco, e de originar também células diferenciadas funcionais sob certas condições fisiológicas e experimentais. Ou seja, estas têm a capacidade de gerar todas as células de um organismo adulto (Yarak, S. e Okamoto, O., 2010; Carvalho, A. *et al.*, 2010).

Estas células podem ser obtidas de um embrião ou de um organismo adulto, tendo também a capacidade de permitirem a sua manipulação laboratorial sem que ocorra perda de capacidades funcionais (Teixeira, M. e Oliveira, C., 2011).

As células estaminais podem-se classificar em várias categorias: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As totipotentes encontram-se única e exclusivamente no zigoto e na mórula, podendo originar todos os tecidos e órgãos de um organismo. A partir deste estágio, encontram-se células estaminais embrionárias no blastocisto, em que estas são apenas pluripotentes. E, à medida que se vão formando os vários tecidos e órgãos, estas células tornam-se multipotentes, ou seja, células estaminais não embrionárias (Watt, F. e Driskell, R., 2010).

Pode-se então dizer que estas células dividem-se em dois grandes grupos, sendo eles células tronco embrionárias e células tronco adultas ou somáticas. Sendo as primeiras pluripotentes, estas podem-se proliferar indefinidamente *in vitro* sem se diferenciar, ou diferenciarem-se se as condições de cultivo assim o permitirem. No entanto, estas apresentam uma grande desvantagem em relação às células tronco não embrionárias, uma vez que a definição de “Vida” é um conceito que varia para diversos autores, levantando assim várias questões éticas (Carvalho, A. *et al.*, 2010).

Após a descoberta e manipulação das células tronco embrionárias e somáticas, as perspectivas científicas e tecnológicas revolucionaram a Engenharia de Tecidos

fortalecendo o seu potencial de aplicação no campo da medicina regenerativa (Yarak, S. e Okamoto, O., 2010; Carvalho, A. *et al.*, 2010). O transplante destas células tem assim como objetivo a criação de um microambiente favorável para a regeneração tecidual (Sebben, A. *et al.*, 2011).

### 3.1. Células estaminais embrionárias

As células estaminais embrionárias, como já foi referido, sendo estas derivadas a partir do blastocisto, possuem duas importantes propriedades, sendo elas a pluripotência e a capacidade de autorregeneração. Esta capacidade de se diferenciarem em células das três linhagens germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme), tornam uma fonte atraente para uma variedade de aplicações, entre as quais no ramo da Engenharia de Tecidos (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Estas têm a grande vantagem de se diferenciarem em todos os tipos de células somáticas uma vez que são indiferenciadas, logo, podem formar qualquer tipo de célula que exista no organismo. Assim, as células embrionárias necessitam de ser cultivadas num meio controlado com fatores de crescimento, para que estas se diferenciem corretamente, formando as células pretendidas de determinado tecido (Vacanti, J. e Vacanti, C., 2007).

No entanto, apesar da preferência do uso de células estaminais embrionárias devido à sua pluripotência em relação às células estaminais somáticas, estas apresentam algumas limitações, como questões éticas como já foi referido; divisão celular descontrolada, podendo desencadear células carcinogénicas; e o seu uso em aplicações clínicas devido à falta de conhecimento na capacidade de diferenciação (Vacanti, J. e Vacanti, C., 2007; Carvalho, A. *et al.*, 2010).

### 3.2. Células estaminais não-embrionárias

Estas células podem ser encontradas em diversas partes do corpo, tais como: fluido amniótico, cordão umbilical, sistema nervoso central, retina e pele, entre outros (Cardoso, G. e Arruda, A., 2009).

Sendo também designadas por células tronco adultas ou somáticas, estas caracterizam-se por serem multipotentes, ou seja, são capazes de promover diferenciação, transformação e regeneração de apenas alguns tipos de células definitivas, constituindo assim uma fonte de células atraente na Engenharia de Tecidos. Estas células podem ser isoladas de tecidos do próprio paciente, eliminando problemas de rejeição em caso de transplantes (Carvalho, A. *et al.*, 2010; Teixeira, M. e Oliveira, C., 2011).

Apesar destas células possuírem uma diferenciação *in vitro* muito mais limitada que as células embrionárias, devido à sua multipotência, elas podem ser reprogramadas *in vitro* para a produção de um tecido em particular (Teixeira, M. e Oliveira, C., 2011).

O uso de células tronco somáticas é uma das áreas mais prometedoras na Engenharia de Tecidos, uma vez que não envolve questões éticas. Há assim um interesse crescente na utilização destas células em estudos sobre o desenvolvimento de neoplasias, doenças degenerativas e ainda aplicações terapêuticas na área da cirurgia reconstrutiva (Yarak, S. e Okamoto, O., 2010).

No entanto, os investigadores têm concluído com os diferentes estudos, que existem alguns contras relativamente ao uso das células estaminais somáticas em relação às células estaminais embrionárias, uma vez que estão disponíveis em reduzido número nos tecidos adultos, existe dificuldade de se identificarem e isolarem, facilmente originam tumores devido ao acumular de mutações que podem ocorrer (Teixeira, M. e Oliveira, C., 2011).

#### **4. Suporte**

O primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido passa pela seleção de um suporte para as células. Assim, a necessidade de criação de um suporte apropriado para a reconstrução de um órgão ou tecido, tem em consideração o local da lesão, o tipo de lesão, como da sua extensão (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

A seleção de biomateriais constitui um ponto-chave para o sucesso da prática da engenharia de tecidos (Armentano, I., *et al.*, 2010).

Muitos requisitos devem ser cumpridos na projeção de suportes, incluindo a biocompatibilidade e a criação de um ambiente que permita a infiltração de células e restauração das conexões neuronais no local da lesão. Os suportes devem também fornecer apropriadas extremidades para promover a regeneração do nervo de uma forma controlada e localizada. Seguindo estas orientações, tecidos artificiais podem ser produzidos para promover a regeneração ao tornarem-se totalmente integrados no tecido saudável existente (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2007).

A organização do um tecido é altamente dependente das propriedades do suporte, tais como a degradação do material e a integridade mecânica. Estas propriedades devem ser tomadas em devida consideração pois influenciam diversas respostas celulares, tais como a aderência e a diferenciação (Dawson, E. *et al.*, 2007).

Os suportes devem ser materiais compatíveis com os sistemas vivos ou com as células vivas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Os materiais utilizados para a criação de um suporte podem ser naturais ou sintéticos, permanentes ou biodegradáveis. Dado que a taxa de degradação de um suporte ser de extrema importância na regeneração, é necessário um estudo a este nível antes de se utilizar o material pretendido. Pois, as células para regenerarem os tecidos, necessitam de migrar, logo é necessário um determinado tempo para favorecer a regeneração, sem que haja degradação do suporte antes do tempo, garantido o correto e eficaz crescimento do tecido (Vacanti, J. e Vacanti, C., 2007).

Os materiais permanentes têm o objetivo de substituir um tecido lesado por tempo indefinido, enquanto que os temporários/biodegradáveis têm o objetivo de preencher numa escala de tempo apropriada a região lesada até que a recomposição tecidual ou o processo regenerativo se concretize (Santos, A. e Wada, M., 2007).

Com o avanço em estudos no ramo da Engenharia de Tecidos, a criação de suportes sintéticos, para substituir os biológicos tem vindo a assumir uma elevada presença e desenvolvimento. Assim, para esse efeito a criação de suportes sintéticos requer propriedades como biocompatibilidade, porosidade, biodegradabilidade e ainda, uma superfície condutora (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

A tridimensionalidade também tem uma certa relevância no fabrico de suportes, uma vez que tanto os órgãos como os tecidos são estruturas tridimensionais, logo o uso de suportes tridimensionais são os mais adequados para o desenvolvimento de tecidos artificiais e entrega de células para aplicação *in vivo* (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Atualmente, os polímeros são criados para interagir com os tecidos, originando respostas fisiológicas como crescimento e/ou diferenciação celular no local de implantação (Santos, A. e Wada, M., 2007).

De um modo geral, os suportes têm grande relevância no que toca à regeneração/substituição de tecidos/órgãos, pois são eles que “suportam” o crescimento de um novo tecido. Para tal, a comunicação intercelular, disponibilidade de nutrientes, fatores de crescimento e a presença de substâncias ativas, são alguns aspetos relevantes para que se concretize o crescimento ou regeneração de um tecido (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

#### 4.1. Suportes naturais

As proteínas e os polissacarídeos, ambos constituintes da matriz extracelular, desempenham papéis importantes, tanto em proporcionar a estrutura dos tecidos, como na manutenção da estrutura da matriz extracelular, respetivamente (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

A utilização de materiais naturais, tais como a utilização de componentes da matriz extracelular (por exemplo: proteínas e polissacarídeos como o colagénio, fibrinogénio, laminina, ácido hialurónico, agarose, alginato, entre outros) proporcionam um grande ponto de partida para o desenvolvimento de suportes, uma vez que naturalmente estes materiais desempenham muitas funções *in vivo*. Estes materiais são bastante atraentes no ramo da Engenharia de Tecidos, uma vez que têm a grande vantagem de ser obtidos a partir da natureza, sendo assim biocompatíveis e tendo propriedades mecânicas semelhantes ao tecido nativo (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

A matriz extracelular é de grande importância na regeneração de tecidos, uma vez que contribui para a integridade mecânica, tanto na sinalização como na função reguladora, na manutenção e no desenvolvimento dos tecidos (Vacanti, J. e Vacanti, C., 2007).

No entanto, a utilização de materiais naturais possuem algumas desvantagens que são difíceis de ultrapassar, incluindo:

- A variabilidade do lote do material, dependendo da fonte de colheita;
- Necessidade de assegurar a pureza do material antes da implantação a fim de evitar uma resposta imunitária;
- Dificuldade em ajustar taxas de degradação e de esterilização;
- Controlo limitado sobre as propriedades físicas e químicas (Dawson, E. *et al.*, 2007; Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Assim, para ultrapassar estas dificuldades que os materiais naturais apresentam, a utilização de materiais sintéticos para a construção de suportes é bastante atraente na Engenharia de Tecidos.

#### 4.2. Suportes sintéticos

Idealmente, um suporte sintético deve imitar as propriedades físicas e químicas do tecido nativo, atuando como um molde e estimular o crescimento de células e tecidos. Devem ser biocompatíveis, reduzindo respostas do sistema imunitário, e biodegradáveis, de forma a serem degradados sem originar produtos tóxicos. Para além disto, estes devem constituir uma rede porosa com um diâmetro suficientemente grande para facilitar a migração celular, troca de fluidos e crescimento interno de tecido (Jones, J., 2006).

Em relação aos materiais naturais, o uso de materiais sintéticos são uma alternativa bastante promissora. Pois estes podem ser altamente reprodutíveis e controláveis (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

A biocompatibilidade é de extrema importância para o comportamento das células em contacto com o material utilizado de maneira a que estas possam aderir à sua superfície (Oliveira, C. *et al.*, 2010). Pois, para que ocorra uma boa interação entre o

polímero e as células é necessário que se estabeleça adesão celular ao substrato (Santos, A. e Wada, M., 2007).

As características da superfície do material (substrato) devem ser similares às da matriz extracelular para que a adesão celular ocorra e assim sendo, o suporte tenha uma interação mais efetiva no local de implantação, promovendo a regeneração do tecido (Santos, A. e Wada, M., 2007; Oliveira, C. *et al.*, 2010).

Assim, a produção de polímeros centra-se nas características físico-químicas e mecânicas o mais próximas possível dos tecidos nos quais vão ser implantados (Santos, A. e Wada, M., 2007). Pois, a criação de uma matriz polimérica é concebida para satisfazer as necessidades nutricionais e biológicas das populações de células envolvidas na formação do novo tecido (Saxena, A., 2005).

Os materiais sintéticos possuem inúmeras vantagens em relação aos materiais naturais, entre as quais a capacidade de moldar o material permitindo a produção de um suporte que está em conformidade com as especificações do local da lesão ou transplante. Além disso, as suas propriedades mecânicas podem ser alteradas para imitar as dos tecidos nativos e permitir o crescimento interno de tecido celular (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

A capacidade de adaptar a velocidade de degradação é uma grande vantagem em relação aos materiais naturais, pois esta propriedade também pode afetar a taxa de libertação de fármacos incorporados em tais suportes (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

No entanto, estes materiais possuem algumas desvantagens em comparação com o uso de materiais naturais. Pois, muitos destes materiais não possuem locais de adesão celular, tendo que ser quimicamente modificados para tal. A biocompatibilidade muitas vezes também está comprometida, pois como se tratam de materiais sintéticos a ser transplantados, estes podem provocar rejeição por parte do organismo *in vivo* (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Atualmente, a alternativa viável para o restabelecimento das funções de uma estrutura biológica de um órgão ou tecido, é repor um implante feito de um biomaterial. Dos materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam um grande potencial, uma vez que são fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

A utilização de polímeros biorreabsorvíveis, os poli( $\alpha$ -hidroxi ácidos), como suporte tem vindo a crescer no ramo da Engenharia de Tecidos. Segundo Vert *et al.*, o termo biodegradável define polímeros e dispositivos sólidos que sofrem dispersão *in vivo*, não eliminando os produtos e subprodutos pelo organismo. Bioabsorvível é o termo que define a dissolução lenta dos polímeros nos fluidos corpóreos, sem haver degradação. Um polímero biorreabsorvível é degradado *in vivo*, através da diminuição de tamanho, e os seus produtos são absorvidos pelo organismo (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

## Capítulo III – Sistema Nervoso

A fisiologia do sistema nervoso apresenta desafios únicos para a bioengenharia (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

O sistema nervoso é uma estrutura complexa que se estende a todo o corpo. De uma forma geral, a constituição do sistema nervoso consiste no encéfalo, espinal medula, nervos e recetores sensoriais (Seeley, R. *et al.*, 2003).

O sistema nervoso reflete aquilo que somos em termos de personalidade, ponto de vista, intelecto, coordenação e muitas outras características que são únicas a cada um de nós, como seres humanos (Haines, D., 2006). Assim, é responsável pelas perceções sensoriais, pelas atividades da mente, pela estimulação dos movimentos dos músculos e pela estimulação da secreção de diversas glândulas (Seeley, R. *et al.*, 2003).

Assim, a informação (estímulos internos e externos), é recebida pelos recetores sensoriais e transmitida para o cérebro ou para a espinal medula e, posteriormente a informação sensorial é processada e integrada, transmitindo às diversas zonas do corpo, dando início a uma resposta apropriada (Haines, D., 2006).

### 1. Divisão e funções

É dividido por duas grandes subdivisões anatómicas: SNC (Sistema Nervoso Central) e SNP (Sistema Nervoso Periférico). O SNC consiste no cérebro e espinal medula, que devido às suas localizações, no crânio e na coluna vertebral, respetivamente, estas estruturas são as mais protegidas do corpo. O SNP, sendo externo ao SNC, consiste em recetores sensoriais, nervos e gânglios. Este conecta com o cérebro e a espinal medula (SNC) através dos nervos, dando resposta às estruturas periféricas (Haines, D., 2006).

O SNP compreende duas subdivisões, sendo elas a aferente ou sensorial e a eferente ou motora. A sensorial transmite sinais elétricos que se designam por potenciais de ação, dos recetores sensoriais ao SNC, através de fatores ambientais internos ou

externos. A divisão motora transmite os potenciais de ação do SNC aos órgãos efetores, como os músculos esquelético, liso e cardíaco e, glândulas (Seeley, R. *et al.*, 2003).

Por sua vez, a divisão motora subdivide-se em sistema nervoso somático ou voluntário e sistema nervoso autónomo (SNA) ou vegetativo. O sistema nervoso somático transmite os potenciais de ação do SNC ao músculo esquelético, e o SNA transmite os potenciais de ação do SNC aos músculos liso e cardíaco, e às glândulas. O SNA por sua vez, também se divide em sistema nervoso simpático e sistema nervoso parassimpático (Haines, D., 2006). O sistema nervoso simpático prepara o corpo para a ação, enquanto que o parassimpático regula o repouso, como digerir os alimentos ou esvaziar a urina da bexiga (Seeley, R. *et al.*, 2003).

Quanto ao SNC, como foi dito, é constituído pela medula espinhal e pelo cérebro, ambos revestidos pela dura-máter. A medula espinhal é de extrema importância, uma vez que é o elo de comunicação entre o encéfalo e o SNP, integrando a informação que recebe e produzindo respostas através de mecanismos reflexos. Esta está localizada dentro do canal vertebral e é contínua com a medula oblonga do cérebro (Haines, D., 2006; Seeley, R. *et al.*, 2003).

A medula espinhal consiste de uma porção cinzenta central em forma de borboleta e de uma porção branca periférica. A substância branca consiste em axónios mielinizados, formando feixes nervosos, células gliais, bem como oligodendrócitos e astrócitos e células da microglia (células do sistema imunológico). A substância cinzenta consiste em corpos celulares neuronais, dendritos e axónios. Os impulsos entram e saem da medula espinhal através dos 31 pares de nervos espinais. Contém fibras sensoriais e neurónios motores envolvidos na atividade reflexa e nas vias ascendentes (para o encéfalo) e descendentes (do encéfalo) que ligam os centros espinais com outras partes do SNC. Estas vias encontram-se na substância branca, sendo que as vias ascendentes transporta potenciais de ação relacionados com as sensações de dor e temperatura (informação sensorial), e as vias descendentes transportam potenciais de ação relacionados com a sensibilidade tátil fina, influenciando a atividade dos neurónios na substância cinzenta da medula espinhal. A substância cinzenta organiza-se em cornos, sendo eles o posterior, anterior e os laterais, em que os últimos estão associados ao SNA. É nesta substância que

se encontra o canal central. Os nervos raquidianos provêm dos cornos posterior e anterior da espinhal medula (Haines, D., 2006; Seeley, R. *et al.*, 2003).

O encéfalo é o centro de controlo para muitas das funções corporais. Este é constituído por unidades básicas, sendo elas o tronco cerebral, o cerebelo, o diencéfalo e cérebro hemisférico (hemisférios direito e esquerdo) (Seeley, R. *et al.*, 2003).

O tronco cerebral é o que conecta a medula espinhal com o restante encéfalo, sendo responsável por muitas das funções essenciais. Lesões no tronco cerebral levam com frequência à morte, uma vez que os reflexos essenciais à sobrevivência são integradas nesta área. O cerebelo está conectado com diversas regiões do SNC, através de três grandes feixes nervosos, os pedúnculos cerebelosos superior, médio e inferior. Funcionalmente, o cerebelo é considerado parte do sistema motor. O diencéfalo é constituído pelo tálamo, subtálamo, epitálamo e hipotálamo, sendo no seu conjunto responsável pela informação sensorial. Os hemisférios ocupam a maior porção do encéfalo. O Sistema límbico é constituído por partes do cérebro hemisférico e do diencéfalo, sendo este sistema responsável pela sobrevivência básica, como a memória, a reprodução e a nutrição (Haines, D., 2006; Seeley, R. *et al.*, 2003).

## **2. Neuroglia**

O Sistema Nervoso é composto por dois tipos de células, que são elas os neurónios e outras células designadas coletivamente por neuroglia. Sendo estas últimas mais abundantes que os neurónios, são células de suporte estrutural aos neurónios mantendo um microambiente apropriado, essencial para a função neuronal. Ao contrário dos neurónios, estas células têm também a capacidade para a divisão celular (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Haines, D., 2006).

De uma forma geral, estas células participam na formação da barreira hematoencefálica, fagocitam substâncias estranhas, produzem líquido cefalorraquidiano, e formam bainhas de mielina em torno dos axónios (Seeley, R. *et al.*, 2003). Também são essenciais no início do desenvolvimento do SNC, guiando os neurónios em desenvolvimento para as suas localizações corretas e, no adulto, são um suporte estrutural para as células nervosas (Haines, D., 2006).

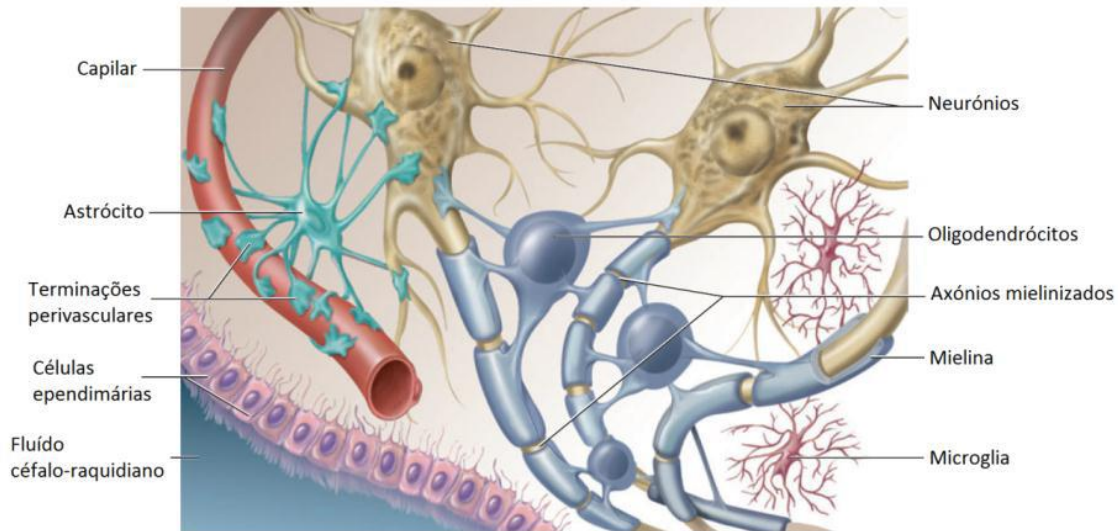
Da neuroglia fazem parte diferentes tipos de células com características estruturais e funcionais únicas. Do SNC fazem parte as seguintes células (Figura 2), em que da Macroglia fazem parte os Astrócitos e os Oligodendrócitos:

**Astrócitos:** São as células mais abundantes da neuroglia do SNC. São células altamente ramificadas, em forma de estrela, em que as suas terminações axonais estendem-se e cobrem a superfície de vasos sanguíneos, neurónios e da piamáter (a mais interna das membranas meníngeas que envolvem o SNC). Ou seja, todo o vaso sanguíneo no SNC é recoberto por uma camada de terminação axonal que o separa do tecido neural, a que estas células também se ligam. Esta junção contribui para a barreira hematoencefálica, determinando quais as substâncias que podem passar do sangue para o tecido nervoso do encéfalo e da espinal medula. Estas células contactam a maioria das superfícies dos dendritos neuronais e dos corpos celulares, bem como algumas superfícies axonais. Os astrócitos têm também capacidade a regular a composição do líquido intersticial, pois regulam a concentração de iões e gases, e absorvem e reciclam os neurotransmissores. Participam assim, no metabolismo de neurotransmissores e modulam a transmissão sináptica. No caso de lesão do SNC, os astrócitos irão ocupar o espaço criado pela fragmentação dos resíduos da destruição das células. (Seeley, R. *et al.*, 2003; Haines, D., 2006).

**Oligodendrócitos:** A sua função é a mielinização. São células, que tal como os astrócitos são ramificadas, e estes prolongamentos do citoplasma enrolam-se em torno dos axónios, formando bainhas de mielina, aumentando assim a velocidade de condução dos potenciais de ação ao longo desse axónio (Seeley, R. *et al.*, 2003; Haines, D., 2006). Este fenómeno é particularmente importante para os axónios que se estendem em longas distâncias (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

A Microglia é constituída por células efectoras imunes do SNC, correspondendo às principais células envolvidas na inflamação do SNC (Haines, D., 2006). São pequenos macrófagos, que fagocitam em resposta à infeção, tecido nervoso morto, microorganismos e outras substâncias estranhas (Seeley, R. *et al.*, 2003).

**Células empedimárias:** São células que pavimentam as cavidades internas do cérebro e da espinal medula, e têm como principal função produzir o líquido cefalorraquidiano (Seeley, R. *et al.*, 2003).



**Figura 2 - Neuroglia do SNC.** Adaptado de Saladin, K., 2003.

Quanto ao SNP, este contém células da glia, que são células de sustentação, sendo elas as células-satélite que são análogas aos astrócitos, e têm como função envolver os corpos celulares dos neurônios nos gânglios sensoriais e autônomos, e as células de Schwann, sendo estas análogas aos oligodendrócitos, têm como função mielinizar os axônios nos nervos periféricos (Haines, D., 2006).

### 3. Neurônio

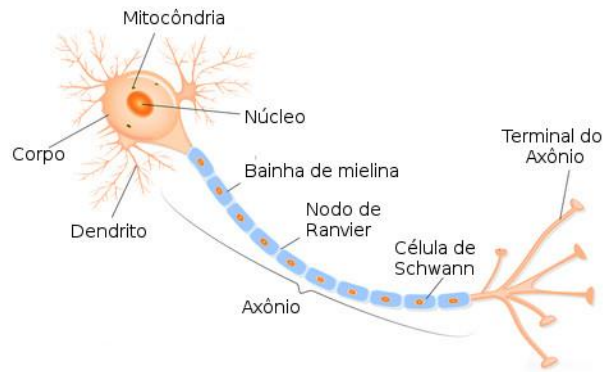
O neurônio consiste num corpo celular, na qual surgem os dendritos e um axônio. Cada neurônio tem a função de receber a informação do ambiente ou de outras células nervosas; processar a informação; e enviar essa informação para outros neurônios ou tecidos efetores. Para que isto aconteça, os neurônios precisam de ter estruturas especializadas que são projetadas para executar cada uma dessas tarefas, organizando-se de modo a formar redes complexas que desempenham as funções do Sistema Nervoso (Haines, D., 2006; Seeley, R. *et al.*, 2003).

O corpo celular, também designado por soma ou pericário, contém um único núcleo relativamente grande e centrado, com um nucléolo proeminente, envolto por uma

massa de citoplasma, contendo as organelas necessárias para a síntese proteica e para a manutenção metabólica, tais como, as mitocôndrias, os ribossomas, o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi, sendo estes dois últimos bastante amplos. A presença do retículo endoplasmático indica que o corpo celular neuronal é o local privilegiado de síntese de proteínas nos neurónios (Haines, D., 2006; Seeley, R. *et al.*, 2003).

Sendo a ramificação dos neurónios um atributo indispensável para a comunicação entre as células, os dendritos ramificam-se amplamente na vizinhança do corpo celular, recebendo sinais de outros neurónios através de contactos, designadas sinapses. A informação proveniente de outros neurónios é recebida pelos dendritos, em direção ao corpo celular, sendo estes o local de entrada de informação, gerando pequenas correntes elétricas que são conduzidas para o corpo celular (Haines, D., 2006; Seeley, R. *et al.*, 2003).

Os axónios, ou fibras nervosas, surgem de uma área alargada do corpo celular designada por cone de implantação, sendo que adjacente a este, a parte proximal do axónio é designada por segmento inicial. Cada axónio tem um diâmetro constante, no entanto podem estender-se em comprimento desde poucos milímetros a mais de um metro. Estes podem também dar origem a axónios colaterais ou ramos laterais. O citoplasma do axónio, designado por axoplasma, contém microtúbulos e neurofilamentos que funcionam como elementos estruturais e exercem o transporte dos metabolitos e organelas ao longo do axónio. A terminação dos axónios, designada por arborizações terminais, sendo estas constituídas por pequenos botões terminais ou terminais pré-sinápticos, correspondem a pontos de contacto funcionais entre as células nervosas – sinapses. No interior destes botões estão presentes numerosas vesículas pequenas que contêm neurotransmissores, sendo estes necessários para a progressão do sinal elétrico para outro neurónio, célula efetora ou célula muscular (Haines, D., 2006; Seeley, R. *et al.*, 2003).



**Figura 3** – Estrutura de um neurônio. Retirado de <<http://www.infoescola.com/biologia/sistema-nervoso/>>

Os neurônios podem ser classificados tanto a nível funcional como a nível estrutural. A nível funcional é considerada a direção em que são conduzidos os potenciais de ação, dado que os neurônios aferentes ou sensoriais conduzem o seu potencial para o SNC e os neurônios eferentes ou motores conduzem o seu potencial do SNC para os músculos ou glândulas. Os neurônios de associação ou interneurônios, conduzem os seus potenciais de ação de um neurônio para outro, dentro do SNC (Seeley, R. *et al.*, 2003).

A nível estrutural, os neurônios podem ser classificados como:

**Neurônios multipolares** – Estes têm numerosos dendritos afunilados que emergem do corpo celular, e um único axônio. Estes somam a grande maioria dos neurônios tanto no SNC como no SNP;

**Neurônios bipolares** – Estes possuem apenas um dendrito e um axônio, com um corpo celular redondo ou oval. Estes localizam-se em alguns órgãos sensoriais, tais como a retina, na cavidade nasal e no sistema auditivo;

**Neurônios unipolares (ou pseudo-unipolares)** – Estes contêm um prolongamento que se divide em dois ramos, sendo eles, um axonal e um periférico. O axonal é dirigido para o SNC e o periférico ramifica-se em recetores sensoriais de modo semelhante aos dendritos. As duas ramificações funcionam como um único axônio, logo o sinal elétrico não passa pelo corpo celular, pois os recetores sensoriais periféricos geram potenciais de ação que são conduzidos pelo axônio até ao SNC. Os corpos celulares destas células são encontrados nos gânglios sensoriais dos nervos cranianos e espinhais (Haines, D., 2006; Seeley, R. *et al.*, 2003).

#### 4. Potencial de Ação

Os sinais elétricos para comunicar e processar informação denominam-se por potenciais de ação. São os meios pelos quais as células transmitem a informação de uma parte para outra do corpo. Pois, a capacidade de ter percepção do meio que nos rodeia, de desempenhar atividades mentais complexas e de agir depende dos potenciais de ação. As propriedades elétricas das células resultam de diferentes concentrações iônicas através da membrana celular e das características de permeabilidade da membrana celular (Seeley, R. *et al.*, 2003).

A alteração do potencial elétrico da membrana ocorre devido à abertura e fecho de canais de iões, transportadores e bombas de iões. Este potencial elétrico é resultado da diferença de concentração de iões entre o interior e exterior da membrana da célula. Estas diferenças nas concentrações iônicas intracelulares e extracelulares resultam principalmente da bomba de sódio-potássio e das características de permeabilidade da membrana celular (Seeley, R. *et al.*, 2003).

A bomba de sódio-potássio desloca os iões  $K^+$  e  $Na^+$  através da membrana no sentido inverso dos seus gradientes de concentração, ou seja, os iões  $K^+$  são transportados para o interior da célula e os  $Na^+$  para o exterior da célula, sabendo que são transportados três iões  $Na^+$  para fora da célula e dois iões  $K^+$  para dentro da célula, por cada molécula de ATP utilizada. A membrana celular tem permeabilidade seletiva, permitindo assim, que algumas substâncias passem através de canais iônicos, com ou sem portão. Os sem portão são canais permeáveis, sendo responsáveis pela permeabilidade iônica da membrana celular quando está em repouso. Os canais com portão abrem e fecham em resposta a estímulos. O líquido intracelular e extracelular têm um número quase igual de iões positivos e negativos, no entanto existe uma desigualdade na região adjacente ao interior e exterior da membrana celular, chamada de diferença de potencial. Esta diferença de potencial numa célula nervosa vai de -70 a -90mV, sendo este denominado potencial de repouso, uma vez que não há estímulo (Seeley, R. *et al.*, 2003).

De acordo com o gradiente de concentração o  $K^+$  tende a sair da célula, diminuindo assim o gradiente de concentração de  $K^+$ . Em consequência verifica-se uma menor tendência para os iões  $K^+$  se difundirem para fora da célula, devido ao seu

potencial negativo. Estabelecido este equilíbrio, a diferença de cargas diminui, alteração esta que se designa por despolarização ou hipopolarização do potencial de membrana em repouso. No entanto a diminuição de iões  $K^+$  no exterior da célula, vai induzir o transporte destes iões para o exterior, sendo necessária uma maior carga negativa no interior da célula, alteração esta que se designa por hiperpolarização (Seeley, R. *et al.*, 2003).

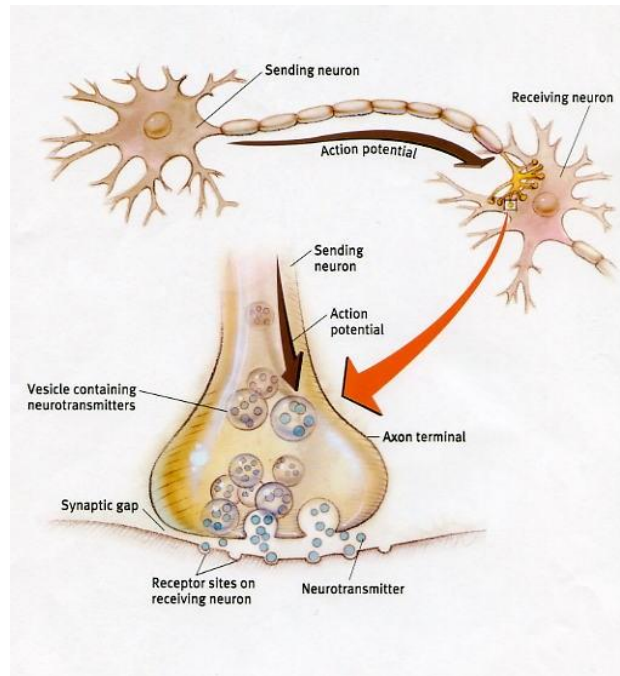
Numa célula estimulada o potencial de ação aumenta, uma vez que os canais de  $Na^+$  abrem, aumentando a permeabilidade da membrana aos iões  $Na^+$ , entrando para o interior da célula, tornando a célula mais positiva e resultando a depolarização. No seguimento, os canais de  $K^+$  também abrem e estes iões começam a sair, levando à repolarização da membrana (Seeley, R. *et al.*, 2003).

A abertura e o fecho dos canais iónicos específicos são controlados por sinais químicos, incluindo neurotransmissores, pela distorção mecânica da membrana e por mudanças de voltagem da membrana, sendo elas por despolarizações ou hiperpolarizações. A soma destes pequenos mecanismos alcança o limiar de despolarização no segmento inicial do axónio, abrindo assim os canais de sódio e consequentemente produzindo um potencial de ação. Este potencial de ação não permanece no local, sendo propagado ao longo do comprimento total do axónio, alcançando todas as terminações axonais (terminal pré-sináptico), provocando a libertação do neurotransmissor nas sinapses (Haines, D., 2006).

A sinapse é uma junção entre duas células, sendo o local onde os potenciais de ação de uma célula causam a produção de potenciais de ação noutra célula. A célula que transporta os potenciais de ação para a sinapse designa-se célula pré-sináptica e a célula que transporta os potenciais de ação para longe da sinapse designa-se célula pós-sináptica, sendo estas tipicamente outros neurónios, células musculares ou glandulares. Existem duas categorias morfológicas de sinapses, a química e a eléctrica, sendo a ampla maioria das sinapses no SNC dos mamíferos do tipo química (Seeley, R. *et al.*, 200; Haines, D., 2006).

Em resposta a um potencial de ação, que chega a um terminal pré-sináptico, os canais de  $Ca^{2+}$  abrem-se e os iões de  $Ca^{2+}$  difundem-se no terminal pré-sináptico, fazendo com que as vesículas sinápticas libertem acetilcolina (neurotransmissor) por

excitose, para o interior da fenda sináptica, ligando-se de forma reversível a recetores específicos da membrana pós-sináptica. Esta combinação faz abrir os canais de Na<sup>+</sup> na célula pós-sináptica, provocando a despolarização na mesma (Seeley, R. *et al.*, 2003; Haines, D., 2006).



**Figura 4 - Sinapse.** Retirado de <<http://www.rhsmpsychology.com/Handouts/synapse.htm>>

## 5. Nervos

Os nervos são um aglomerado de fibras nervosas que se agrupam em feixes, com as suas bainhas, que ligam o SNC aos recetores sensoriais, músculos e glândulas. Eles estabelecem comunicação entre os centros nervosos e os órgãos da sensibilidade e efetores (Seeley, R. *et al.*, 2003).

No SNP, os nervos são constituídos por feixes de nervos, células de Schwann e tecido conjuntivo. Cada axónio ou fibra nervosa é revestido pelo endoneúrio e cada grupo de axónios aglomerados formando um feixe nervoso é revestido pelo perineúrio. O epineúrio é o tecido conjuntivo denso que reveste todos os feixes nervosos, formando assim um nervo (Seeley, R. *et al.*, 2003).

O SNC é constituído por 12 pares de nervos cranianos, que têm origem no encéfalo, e 31 pares de nervos raquidianos que têm origem na espinal medula, estando protegidos pelas vértebras e por membranas protetoras. Os nervos cranianos desempenham funções sensoriais como a visão, e sensitivas como o tato e a dor; funções motoras como o controle dos músculos esqueléticos; proprioceptivas que transportam ao SNC impulsos provenientes de músculos; e por fim parassimpáticas, regulando glândulas, músculos lisos das vísceras e músculo cardíaco. Cada nervo craniano pode ter uma ou mais destas quatro funções (Seeley, R. *et al.*, 2003).

Os nervos raquidianos, localizados na coluna vertebral, esta é constituída por 8 pares de nervos cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sagrados e 1 coccígeo. Estes têm distribuições cutâneas específicas designadas por dermatomas. Estes nervos bifurcam-se em ramos, os dorsais e os ventrais. Os dorsais são reponsáveis pelo movimento da coluna vertebral inervando os músculos do tronco, enquanto que os ventrais distribuem-se pela região torácica formando os nervos intercostais, e formam 5 plexos (cervical, braquial, lombar, sagrado e coccígeo), enervando assim estas zonas (Seeley, R. *et al.*, 2003).

Como já foi referido, os nervos raquidianos provêm da substância cinzenta da espinal medula, em que esta substância é rodeada por substância branca ajudando a proteger e a isolar a espinal medula. Assim, os nervos são projetados a partir da substância branca, passando por uma zona de transição entre o SNC e o SNP e entram no SNP (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Assim, conclui-se que os nervos raquidianos juntamente com os nervos cranianos formam o SNP, sendo este responsável pela locomoção, os vários sentidos e a fala. Pois, o contacto dos nervos periféricos com os músculos dão estímulos sensoriais e excitatórios para o SNC, este também fornece estímulos para o SNP (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

## Capítulo IV – Lesão do nervo e regeneração

A principal diferença entre o SNC e o SNP é a capacidade de regeneração, pois os axónios do SNC não se regeneram sensivelmente no seu ambiente nativo, ao contrário do SNP, em que este é capaz de se regenerar por longas distâncias (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Del Bel, E. *et al.*, 2009).

Quando comparados os neurónios do SNP e do SNC, estes mostram diferenças intrínsecas e extrínsecas que têm consequências ao nível da regeneração (Gruzen, F. *et al.*, 2006).

As estratégias de reparação de danos no SNP e SNC não são melhor sucedidas, devido à falta de conhecimento sobre os mecanismos de lesão do nervo e a sua reparação (Subramanian, A. *et al.*, 2009). Ou seja, a combinação de terapias tem um grande potencial tanto na recuperação de lesões no SNC como no SNP, como vai ser descrito mais adiante.

### 1. Sistema Nervoso Periférico

Axónios de neurónios do SNP regeneram facilmente no interior de nervos lesados quando as partes distais destes se posicionam adequadamente. Esta capacidade deve-se a propriedades intrínsecas dos neurónios periféricos, bem como o meio permissivo para o crescimento de fibras nervosas no interior do nervo lesado (Gruzen, F. *et al.*, 2006).

No SNP, quando ocorre lesão de um nervo, a parte distal começa a degenerar como resultado da atividade da protease, e conseqüentemente a separação dos recursos metabólicos do corpo celular do nervo, ocorrendo também a desagregação do citoesqueleto e a dissolução da membrana. Na parte proximal ocorre degeneração Walleriana. As células de Schwann que se encontram em torno dos axónios na extremidade distal perdem os lípidos de mielina, e com o recrutamento dos macrófagos para o local da lesão, estes contribuem na lise e na fagocitose dos detritos de mielina e na degeneração do axónio, para além de contribuírem para a proliferação das células de Schwann (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Terenghi, G., 1998).

Segundo Sunderland as lesões traumáticas de nervos podem ser classificadas por Grau I, II, III, IV e V. O grau I corresponde à neuropraxia, havendo interrupção da condução do impulso nervoso, e a recuperação ocorre sem degeneração Walleriana, ou seja, não há lesão motora, sendo considerada uma lesão bioquímica. O grau II corresponde à axonotmese, em que neste tipo de lesão ocorre perda do axónio, ocorrendo degeneração Walleriana, sem perda do tecido conjuntivo (endonervo). O grau III corresponde à neurotmese em que há rotura dos axónios e tubos endoneurais, sendo esta a mais grave de todas. No grau IV, ocorre a perda de axónios, endoneuro e perineuro, mantendo o epineuro intacto, e no grau V, a lesão do nervo é total (Batista, K. e Araújo, H., 2009).

Tanto os macrófagos como as células de Schwann desempenham um papel importante na regeneração axonal e na remielinização, uma vez que ambos os tipos de células secretam mitógenos e fatores de crescimento, que aumentam o crescimento do axónio. Pois, a proliferação das células de Schwann dura cerca de 2 semanas, em que estas formam canais que orientam a regeneração dos axónios para a parte distal, designadas por Bandas de Bungner (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Terenghi, G., 1998).

A reinervação funcional exige que os axónios se estendam até chegarem à parte distal, e em seres humanos, esta regeneração ocorre a uma taxa de 2-5 mm/dia, ou seja, lesões significativas podem levar muitos meses a curar. Daí, as células de Schwann serem vitais para o processo de regeneração, pois têm como principal função ser fonte de fatores neurotróficos. Estes difundem para a parte distal exercendo uma influência trófica sobre os axónios na zona da lesão, para estes se regenerarem a partir da parte proximal. O contacto dos fatores neurotróficos com os axónios em regeneração estimula uma segunda fase de proliferação das células de Schwann, no entanto se a regeneração axonal for retardada as células de Schwann diminuem progressivamente e assim, torna-se um ambiente menos sensível à regeneração axonal. Consequentemente, os axónios começam a degenerar na parte proximal, originando brotos neuronais (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Terenghi, G., 1998).

Na lesão do nervo periférico o tratamento padrão consiste no uso de enxerto de nervo autólogo ou conexão cirúrgica das extremidades nervosas danificadas pela lesão. No entanto para lesões mais longas é preferível a enxertia (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

## 2. Sistema Nervoso Central

As lesões no SNC são consideradas traumáticas, uma vez que são eventos catastróficos, cujas causas mais frequentes são acidentes de automóvel, quedas em atividades desportivas e também por arma de fogo. O meio de lesão dos axónios do SNC difere bastante do ambiente do SNP, pois os axónios do SNC não são estruturalmente separados por bainhas perineurais, em que estas estruturas no SNP fornecem condições para a regeneração da fibra lesada. Conclui-se assim, que os axónios do SNC não se regeneram sensivelmente no seu ambiente natural (Gruzen, F. *et al.*, 2006; Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Quando o SNC é lesionado, a sua função pode ser total ou parcialmente prejudicada a nível sensorial, motor e vegetativo, em qualquer parte do corpo abaixo do nível da lesão, podendo ocorrer paraplegia, ou tetraplegia nos casos mais graves (Gruzen, F. *et al.*, 2006; Del Bel, E. *et al.*, 2009).

A lesão medular inicia-se por uma lesão primária, em que há a perda funcional dos axónios, e conseqüentemente ativação de fatores locais que intermedeiam o início da lesão secundária, havendo o desencadeamento de uma cascata de mediadores endógenos, causando a destruição progressiva do SNC. Na progressão da lesão secundária, ocorrem efeitos irreversíveis na substância cinzenta medular, tais como hemorragias logo após o traumatismo, em que estas hemorragias podem demorar até 72 horas a atingir a substância branca afetando a microcirculação. Conseqüentemente, este fenómeno pode causar isquemia global e necrose irreversível da substância branca (Gruzen, F. *et al.*, 2006; Del Bel, E. *et al.*, 2009). Ao contrário do SNP, a resposta fisiológica do SNC é diferente, pois após a lesão no SNC, os macrófagos infiltram-se muito lentamente no local da lesão em comparação com SNP, retardando assim, a remoção dos detritos de mielina e da degeneração do axónio por fagocitose. A desmielinização que ocorre após a lesão produz várias moléculas inibidoras que contribuem para a falta de regeneração de axónios lesionados. Além disso, as moléculas de adesão medular na extremidade distal da lesão, não são reguladas sensivelmente como no SNP. Por último, os astrócitos proliferam de uma maneira abundante, tal como acontece com as células de Schwann no SNP, mas produzem tecido cicatricial, que conseqüentemente é capaz de produzir moléculas que

inibem o crescimento axonal e ser fisicamente um obstáculo para a regeneração dos axónios (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Del Bel, E. *et al.*, 2009).

Durante a regeneração, a extremidade proximal do axónio dilata-se devido à acumulação de organelos citoplasmáticos, formando neuritos. Estes formam cones de crescimento que ao emitir e retrair continuamente vão criando o microambiente desejado para a regeneração, que permita o seu crescimento até à parte distal. No entanto este processo de regeneração é abortivo, devido ao ambiente de regeneração, estando este associado à acumulação de inibidores de mielina e à migração de células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e microglia) para o local da lesão tornando o ambiente não permissivo para o crescimento axonal (Gruzen, F. *et al.*, 2006; Subramanian, A. *et al.*, 2009).

Muitas estratégias foram e continuam a ser testadas para a melhoria da regeneração dos axónios no SNC, uma vez que a regeneração espontânea é impossível (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

A terapia celular resolve alguns destes obstáculos produzidos pela cicatriz glial. Células transplantadas podem secretar matriz extracelular e citocinas que promovem a migração de células para ajudar a contrabalançar os efeitos inibidores da cicatriz glial, podendo também diminuir a quantidade de cicatrizes presentes (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Para além da terapia celular, o transplante de nervos periféricos é também uma das técnicas favoráveis à regeneração axonal no SNC. Pois, o ambiente produzido pelas células do SNP é favorável à regeneração axonal no SNP, logo, estudos a este nível demonstraram que o transplante de nervos periféricos são capazes de regenerar por longas distâncias os axónios do SNC (Coté, M. *et al.*, 2011).

Estudos nas últimas décadas mostram que o crescimento axonal depois de lesão medular pode ocorrer quando é fornecido o substrato correto (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

## **Capítulo V – Engenharia de Tecidos na regeneração do tecido nervoso**

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o esforço de compreender a capacidade de regeneração do SN e as diferenças entre o SNP e o SNC (Gruzen, F. *et al.*, 2006).

É do conhecimento geral que a reparação tecidual requer uma complexa interação entre células, matriz extracelular e fatores tróficos, sendo estes relevantes na regeneração nervosa. Um enxerto de nervo na engenharia de tecidos é normalmente construído através de uma combinação de uma matriz neural e uma variedade de componentes celulares e moleculares. Nas últimas décadas, a terapia celular e a engenharia de tecidos têm sido alvo de atenção, sendo amplamente utilizadas nas diferentes áreas (Sebben, A. *et al.*, 2011).

A orientação física dos axónios é um componente vital da reparação de nervos. Durante o século XIX, muitos materiais foram utilizados na tentativa para orientar fisicamente a regeneração dos nervos periféricos danificados, incluindo enxertos autólogos de nervos. Na década de 60 Millesi foi pioneiro nas técnicas de microcirurgia de alinhar os fascículos nervosos, suturando as terminações nervosas danificadas, com resultados na melhoria funcional. No entanto, esta descoberta pode reparar pequenos danos, pois para danos nervosos mais longos é aconselhado o uso de um enxerto autólogo de nervo. Técnicas semelhantes são exploradas para a reparação de nervos seccionados na medula espinal (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

As estratégias de bioengenharia para a regeneração do SNP têm-se centrado no desenvolvimento de tratamentos alternativos para o enxerto do nervo, especialmente para lesões maiores, melhorar taxas de recuperação, e o seu resultado final. Quanto ao SNC, este é um desafio maior para novas terapias. É muito importante criar um ambiente permissivo para a regeneração após o sistema nervoso ser danificado (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Assim, a tubulização foi proposta como uma alternativa para dirigir suturas nervosas a fim de criar as condições ideais para a regeneração do nervo durante o curto

espaço vazio deixado entre dois troncos nervosos. Esta estratégia é bastante promissora no emprego de tubos feitos de componentes da matriz extracelular, como por exemplo o colagénio, com base a técnica de engenharia de tecidos (Battiston, B. *et al.*, 2005).

As pesquisas existentes sobre os mecanismos de cascata que induz a regeneração após a lesão dos nervos periféricos são vastos, fornecendo informações essenciais para um melhor conhecimento sobre a reparação do nervo periférico (Sebben, A. *et al.*, 2011).

A Engenharia de Tecidos está muito focada no campo da tubulização do nervo. Assim, dois conceitos têm orientado o desenvolvimento na bioengenharia para a reparação do nervo, sendo eles, a tentativa de manipular no laboratório diferentes tecidos e órgãos a fim de criarem canais de orientação de nervos, com características importantes no meio ambiente dos nervos; e tentativa para enriquecer tubos biológicos ou sintéticos com vários elementos que são considerados essenciais para a promoção na regeneração das fibras nervosas e que estão ausentes em enxertos não nervosos (Battiston, B. *et al.*, 2005).

Estes “canais de orientação dos nervos” servem para dirigir os axónios a partir do final do nervo proximal, proporcionar um canal para a difusão de fatores de crescimento secretados pelas terminações nervosas, e reduzir a infiltração de tecido cicatricial. Mais recentemente, pesquisadores centram-se na combinação de materiais e biomoléculas pretendidas para criar novos materiais compostos, que podem estimular ativamente a regeneração do nervo (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Assim sendo, os pesquisadores têm-se focado na bioengenharia, desenvolvendo terapias e dispositivos para melhorar a regeneração, esforçando-se na criação de caminhos físicos ou químicos para regenerar os axónios. Estes dispositivos incluem sinais físicos ou mecânicos de orientação, terapia celular e sinais biomoleculares (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Estudos mais recentes têm-se centrado em progenitores embrionários ou células tronco neurais para o restauro axonal na medula espinal (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Resumindo, a Engenharia de Tecidos tem como objetivo criar matrizes porosas com características semelhantes à matriz extracelular, com a finalidade de proporcionar aos neurónios que permanecem viáveis após uma lesão, condições de crescimento (pontos de adesão e guias) de forma a que ocorra regeneração dos tecidos afetados.

## **1. Enxertos de tecido nervoso**

As estratégias de bioengenharia para a regeneração no sistema nervoso periférico estão focadas alternativas para o enxerto do nervo. Pois, atualmente o enxerto do nervo autólogo é o padrão ouro para o reparo de um defeito do nervo periférico (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Battiston, B. *et al.*, 2005).

A manifestação no início dos anos 70, de enxertar um nervo autólogo para colmatar um defeito nervoso levou a melhores resultados clínicos do que suturar as terminações nervosas lesionadas, abrindo uma nova era na cirurgia do nervo periférico e abrindo portas de sucesso na abordagem cirúrgica para lesões complexas que antes seriam inimagináveis (Battiston, B. *et al.*, 2005).

Enxertos de tecido autólogo possuem várias vantagens. Sendo materiais naturais (tecido removido do paciente), são mais suscetíveis de ser biocompatíveis do que materiais artificiais, são menos tóxicos, e fornecem uma estrutura de suporte para promover a adesão celular e a migração. No entanto, a grande desvantagem é o tecido ser removido do paciente, necessitando assim de duas intervenções cirúrgicas, a remoção do nervo saudável pode resultar em défices sensoriais residuais, tendo também como inconvenientes o isolamento e o controlo (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Battiston, B. *et al.*, 2005).

Nas últimas décadas tem-se aprofundado pesquisas ao nível da regeneração do SNC, em que os estudos têm mostrado que o crescimento axonal depois da lesão medular pode ocorrer, quando fornecido o substrato correto (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

No início da década de 80 foi sugerido por Aguayo *et al.*, que o meio ambiente disponível para a regeneração dos axónios do SNP lesionados pode ser favorável para a regeneração dos axónios lesionados no SNC, demonstrando que quando axónios

lesionados do SNC são fornecidos com um substrato de suporte, como um segmento de nervo periférico, são capazes de regenerar por longas distâncias e de ser direcionados para a área alvo específica. Desde então a utilização de enxertos de nervo periférico tem sido uma alternativa viável no tratamento terapêutico da lesão medular (Côté, M. *et al.*, 2011). Um estudo feito, que consistiu num segmento de enxerto autólogo do SNP na retina de ratos, mostrou que os axónios das células ganglionares da retina cresceram e tiveram a capacidade de reconhecer as áreas alvo e reestabelecer sinapses funcionais com os neurónios alvo (Aguayo, A. *et al.*, 1987; Keirstead, S. *et al.*, 1989).

Pelos estudos feitos, sabe-se que os neurónios próximos ao local de inserção têm uma grande probabilidade de estar envolvidos na resposta regenerativa, ou seja, um enxerto ao nível da espinal medula cervical contém os axónios dos neurónios da própria cervical e dos neurónios do tronco cerebral, enquanto um enxerto na zona torácica ou ao nível da zona lombar contem neurónios da própria, da cervical mas não do tronco cerebral. Esta observação ajudou a confirmar de que a distância de lesão – enxerto do corpo celular do neurónio é fundamental para que a colocação de um enxerto do nervo periférico dê uma resposta regenerativa com sucesso no SNC. Os primeiros estudos feitos a este nível, concluíram que somente axónios lesionados apareceram a regenerar no enxerto e não brotos de axónios adjacentes não lesados (Côté, M. *et al.*, 2011).

No SNC, numa situação mais simples de lesão aguda, um segmento de nervo periférico pré-degenerado pode ser colhido e colocado imediatamente na medula. O isolamento e o corte do nervo periférico alvo é o primeiro passo para qualquer um dos métodos que se utilize um enxerto do nervo periférico. De seguida, o nervo é deixado *in situ* em contacto com outros nervos periféricos. Depois de 7-10 dias, o segmento distal do nervo é colhido para serem enxertados para a espinal medula. Neste procedimento, o perinervo é removido de ambas as extremidades do nervo de forma a diminuir a formação de tecido cicatricial por fibroblastos que se podem infiltrar na interface enxerto-hospedeiro. De seguida, o comprimento do nervo é ajustado ao comprimento da lesão e inserido longitudinalmente no interior da cavidade. O enxerto do nervo é suturado com a dura-máter para este não sair do lugar (Côté, M. *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos relativamente às pesquisas que se têm feito no campo do uso de enxertos autólogos de nervos são variáveis, de extremamente pobres a muito bons

(Belkas, J. *et al.*, 2004). Estes têm sido bastante controversos, o que implica um contínuo desenvolvimento nesta área.

Tecidos não autólogos, alogénicos e xenogénicos têm a vantagem, em relação ao tecido autólogo, do seu abastecimento poder ser grande e a sua colheita não é feita a partir do próprio paciente. No entanto, o uso destes tecidos possuem risco de transmissão de doenças, devendo ser usados com imunossuppressores ou removendo os componentes imunogénicos do tecido. A remoção destes componentes pode ser feita por métodos de radiação, processos químicos e térmicos, sendo este último mais comum, envolvendo ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, matando e fragmentando as células imunogénicas. Estes métodos focam-se na remoção ou destruição das células imunogénicas, mas também na preservação dos componentes da matriz extracelular, no entanto, em estudos realizados, a estrutura da matriz celular é um pouco danificada, resultando em inflamação quando há implantação do enxerto (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

## **2. Tubulização**

Ao longo dos últimos 20 anos, o número de artigos relativos à pesquisa sobre o uso de tubos não nervosos para a reparação do tecido nervoso, tem vindo a aumentar significativamente. O emprego clínico destes tubos (tanto biológicos como sintéticos) serve como uma alternativa ao enxerto de tecido autólogo, uma vez que esta técnica é limitada da disponibilidade de tecido do doador para o transplante autólogo do nervo e pelas diversas desvantagens já mencionadas (Battiston, B. *et al.*, 2005).

A técnica de tubulização é capaz de guiar o crescimento axonal, unindo as extremidades distal e proximal, reduzindo a tensão na linha de sutura. Neste método, as extremidades proximal e distal são introduzidas nas extremidades dos tubos, respetivamente, e ancorados com suturas epineurais, resultando na redução do tempo de cirurgia, comparativamente ao enxerto nervoso autólogo. Assim, os axónios vão regenerar-se no sentido da extremidade distal. Os tubos são um suporte mecânico, diminuindo a tensão entre as extremidades e a quantidade de material na sutura, reduzindo por sua vez a resposta cicatricial. Esta técnica tem também como grande vantagem permitir a manipulação experimental do micro ambiente neural, experimentando por

exemplo a aplicação de fármacos que estimulem a regeneração (Cunha, A., Lemos, S. *et al.*, 2007).

Hudson *et al* listou várias propriedades que os canais de orientação do nervo devem possuir, entre elas, têm que ser facilmente fabricados com o diâmetro desejado, implantados com relativa facilidade, facilmente esterilizáveis. Adicionalmente, devem ser flexíveis, mantendo a sua integridade estrutural *in vivo* (Belkas, J. *et al.*, 2004).

### 2.1. Tubos biológicos

Para a reparação dos nervos periféricos, as pesquisas mais atuais focam-se em enxertos de bainhas epineurais, tendão, veias, entre outros, tendo exibido resultados encorajadores na pesquisa (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

A vantagem de serem materiais biológicos é que existe biocompatibilidade, diminuindo os efeitos tóxicos causados por material sintético. No entanto, a barreira que se mantém é uma resposta imunitária indesejável, dependendo do paciente ou da fonte do material (Chaulfaun, C. *et al*, 2006).

Os canais de orientação do nervo são utilizados não só para dirigir os axónios da parte proximal para a distal como também são utilizados numa tentativa de minimizar a infiltração de tecido cicatricial fibroso impedindo o avanço de neurites. Assim, auto-enxertos biológicos, tais como o uso de artérias, veias, músculo, tendões, bainhas epineurais e outros materiais têm sido usados com sucesso variável. Estes tecidos biológicos podem ser manipulados para melhorar as condições clínicas, tais como o comprimento, diâmetro, rigidez, permeabilidade, degradabilidade, superfície interior, constituição luminal, entre outras propriedades (Belkas, J. *et al.*, 2004).

Entre os vários tecidos utilizados para colmatar um defeito do nervo, os vasos sanguíneos e os músculos esqueléticos são os órgãos que recebem mais atenção por parte dos pesquisadores. Em 1981, Bungner empregou pequenos segmentos de artéria, obtendo sucesso na regeneração do nervo. No entanto, o emprego de artérias para tubulização é limitada, uma vez que na maioria dos casos, as artérias de um tamanho adequado são impossíveis de obter do mesmo indivíduo sem consequências graves, de modo que os

estudos seguintes centraram-se na tubulização com veias. Assim, em 1909, Wrede foi pioneiro na tubulização com veias em pacientes, conseguindo obter a recuperação funcional após a reparação de um nervo, por meio de um tubo de veia com 4,5cm de comprimento. No entanto, estudos seguintes relativos ao emprego de veias levaram a conflitos de resultados (Battiston, B. *et al.*, 2005; Cunha, A., Lemos, S. *et al.*, 2007).

Na década de 80, houve o grande interesse por este procedimento cirúrgico, demonstrando experimentalmente, que o enxerto da veia era capaz de promover reparações nervosas comparáveis ao enxerto do nervo autólogo. Pois, os estudos clínicos publicados por Walton *et al.*, na reparação do nervo sensorial por meio de enxerto da veia, relatou retorno satisfatório de sensibilidade comparativamente com a técnica do enxerto do nervo autólogo. No entanto, foi demonstrado que enxertos venosos foram apenas eficazes para lacunas relativamente curtas (menos de 30mm). Assim, numa tentativa de aumentar a eficácia no máximo de comprimento, alguns estudos investigaram a possibilidade de enriquecer os tubos de veia com outros tecidos, nomeadamente pedaços de nervo e fibras musculares. Esta combinação mostrou resultados satisfatórios na recuperação funcional para lesões maiores que 30mm (Battiston, B. *et al.*, 2005).

Contudo, existem uma série de desvantagens com a utilização de vasos sanguíneos, músculo e outros tecidos biológicos, tais como reação tecidual, fibrose e a falta de um controlo preciso das propriedades mecânicas do canal. Estas limitações conduziram assim, ao aparecimento de canais feitos de materiais sintéticos inovadores, apesar de possíveis problemas com a biocompatibilidade (Belkas, J. *et al.*, 2004).

Além da utilização dos tecidos mencionados, a investigação também se centrou na utilização de proteoglicanos e glicosaminoglicanos purificados da matriz extracelular, que podem ser modificados servindo de suportes. As moléculas da matriz extracelular, tais como a laminina, colagénio e fibronectina, têm sido relevantes no desenvolvimento axonal e na sua reparação, sendo ótimos candidatos na utilização em canais de orientação do nervo (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Belkas, J. *et al.*, 2004; Battiston, B. *et al.*, 2005).

O uso de enxertos biológicos têm uma grande vantagem em relação aos materiais sintéticos, pois, os biológicos podem ser comprados em baixo custo, enquanto os últimos são muito caros. Esta característica dos materiais biológicos é fundamental para países em

que os recursos do sistema de saúde são baixos, representando assim um ponto importante que pode facilitar a sua difusão no futuro próximo (Battiston, B. *et al.*, 2005).

## 2.2. Tubos sintéticos

Embora as primeiras tentativas do uso da tubulização foram feitas com materiais biológicos, a ideia de usar materiais não biológicos veio alguns anos mais tarde. À semelhança do que aconteceu para os tubos biológicos, nos últimos 20 anos houve grandes avanços experimentais e clínicos no que toca em enxertos não biológicos para reparar o nervo (Battiston, B. *et al.*, 2005).

Os materiais sintéticos são atraentes como já foi referido, porque as suas propriedades físicas e químicas (porosidade, resistência mecânica, diâmetro, taxa de degradação, etc), podem ser manipuladas especificamente para determinada aplicação, a fim de otimizar as condições de regeneração. As dimensões do tubo devem ser facilmente controladas de uma maneira reprodutível, assim como a espessura da parede é outro fator que deve ser considerado, pois paredes mais finas demonstraram um aumento do crescimento axonal (Belkas, J. *et al.*, 2004). Alterações nas propriedades físicas têm consequências na difusão dos materiais com os nutrientes, inibem células prejudiciais tais como fibroblastos que podem causar tecido cicatricial, e aceleram o crescimento axonal, por exemplo em superfícies lisas (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

No entanto, a biocompatibilidade dos materiais sintéticos é um desafio, pois a resposta inflamatória do organismo pode variar consideravelmente de um material para outro. Além disso, alguns materiais sintéticos que são tolerados pelo sistema imunitário podem ser incompatíveis com a adesão celular e reparação tecidual, e assim sendo, estes materiais são muitas vezes modificados para torna-los mais compatíveis (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

A seleção de um material sintético adequado tem de responder a determinadas propriedades que os canais de orientação devem possuir, tais como: ser com as dimensões desejadas; ser esterilizáveis; resistentes ao desgaste; fácil manuseio e sutura; ser flexíveis, mantendo a sua forma e resistir ao colapso durante a implantação e ao longo do tempo para a regeneração. Além disso, devem ser biodegradáveis, uma vez que materiais que

não o são representam um risco maior de provocar uma resposta inflamatória crônica (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Um número de diferentes materiais sintéticos têm sido explorados para a utilização na regeneração do nervo. Poliésteres, tais como ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA) e poli (ácido lático – co – glicólico) (PLGA), foram os primeiros candidatos para testes devido à sua respectiva disponibilidade, facilidade de processamento, características de biodegradação e aprovação pela FDA (Belkas, J. *et al.*, 2004; Chaulfaun, C. *et al.*, 2006). Para além destes polímeros, outros poliésteres biodegradáveis e outros polímeros, demonstraram capacidade para orientar a regeneração, apresentando uma grande promessa em aplicações na regeneração nervosa (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

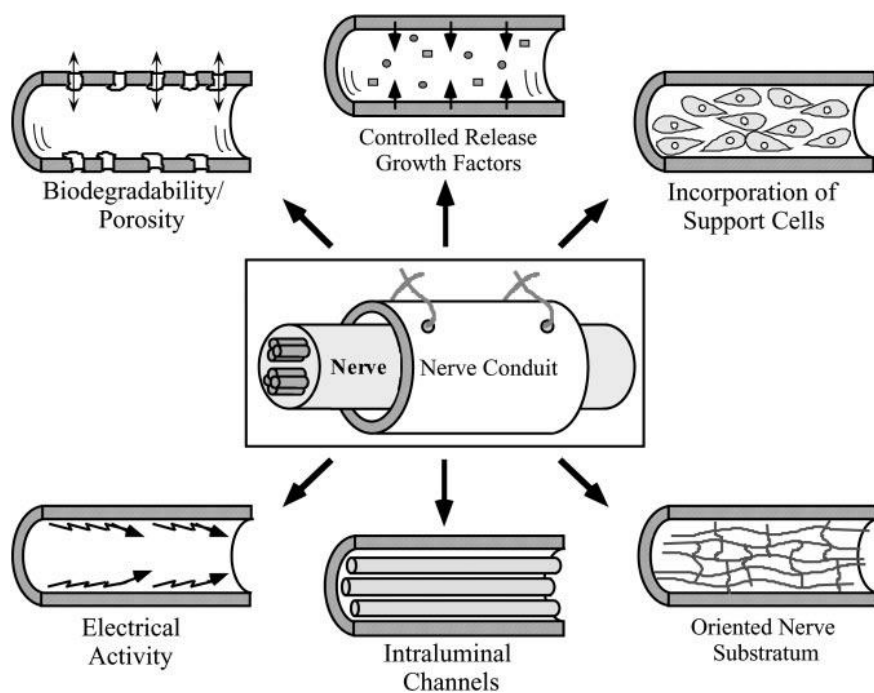
O uso de PGA como condutas, em ensaios clínicos revelou uma excelente recuperação sensorial na reparação do nervo digital. No geral, tubos de PGA, têm sido bem sucedidos na reparação clínica de nervos digitais até 3cm de comprimento (Belkas, J. *et al.*, 2004).

No entanto, vários materiais não degradáveis têm sido usados em aplicações de reparação do nervo, incluindo o tubo de silicone. Este, em particular, tem sido estudado desde a década de 60 e muitas das ideias fundamentais para a regeneração do nervo vem do uso deste modelo (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). Dahlin e Lundborg demonstraram que em intervalos curtos (menores que 5mm), o emprego de tubos de silicone pode levar a uma bem sucedida regeneração do nervo (Battiston, B. *et al.*, 2005). No entanto, é comumente aceite que canais inertes, tais como o silicone, não suportam a regeneração em defeitos maiores do que 10mm, sem a presença de fatores de crescimento exógenos (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). Pois, o conceito de que deixando intencionalmente um curto espaço entre os dois cotos do nervo aumenta o acúmulo de células e a matriz extracelular, que pode estimular a correta regeneração, foi liderada por Dahlin e Lundborg, usando tubos de silicone como uma alternativa para dirigir suturas nervosas para lesões maiores, sem perda de substância (Battiston, B. *et al.*, 2005).

A principal preocupação no emprego clínico de material sintético não degradável nos seres humanos é a ocorrência de complicações, como fibrose local, desencadeada

pelo material implantado, e a compressão do nervo (Battiston, B. *et al.*, 2005). Pois, para além destas complicações, o uso de condutas de silicone demonstrou provocarem em termos clínicos, reação inflamatória, exigindo a sua remoção após a regeneração (Belkas, J. *et al.*, 2004). Assim, a investigação está agora focada no desenvolvimento de canais de orientação semipermeáveis ou degradáveis, que podem estimular ativamente a melhoria na regeneração para intervalos mais longos (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Como alternativa para os tubos de material não degradável/absorvíveis, vários tubos bioabsorvíveis foram testados tanto experimentalmente como na prática clínica, e, em particular, o emprego clínico de condutas de ácido poliglicólico mostrou grande eficácia no restauro de defeitos nervosos. Em 2000, um estudo sobre condutas de ácido poliglicólico para a reconstrução do nervo digital em 96 pacientes foi publicado e mostrou que a reparação do nervo, tanto para lacunas mais curtas como para mais longas produz resultados superiores em comparação com enxertos nervosos autólogos (Battiston, B. *et al.*, 2005).



**Figura 5 - Propriedades do canal ideal de orientação do nervo.** Propriedades físicas desejadas: Parede do canal biodegradável e porosa; capacidade de proporcionar fatores bioativos, tais como fatores de crescimento; ou a incorporação de células de suporte; uma matriz interna para suportar a migração das células; canais intraluminais para imitar a estrutura de fascículos nervosos; e atividade elétrica. Adaptado de Schmidt, C. e Leach, J., 2003.

### 2.3. Tubos combinados

Com o objetivo de reparar um órgão ou tecido, vários tipos de condutas foram concebidas e experimentalmente testadas (Battiston, B. *et al.*, 2005).

A combinação de materiais poliméricos com materiais naturais (componentes da matriz extracelular) oferece um dos métodos mais bem sucedidos para desenvolver um suporte apropriado com todas as propriedades preferenciais para aplicações específicas na Engenharia de Tecidos (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

A maioria dos polímeros sintéticos são hidrofóbicos, limitando a sua utilização como suportes para a Engenharia de Tecidos. Assim, se forem combinados com materiais naturais, estes podem induzir a hidrofília que por sua vez melhora a adesão celular ao suporte (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

Estudos revelam sucesso nesta combinação. Por exemplo, um enxerto de nervo artificial com um suporte de mistura de quitosana/PGA foi utilizado para preencher uma lesão no nervo ciático de 30mm num modelo animal (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

Estudos experimentais em ratos, feitos com tubos de silicone (material sintético) com matriz extracelular (laminina, fibronectina e colagénio) comprovaram a regeneração do nervo ciático com uma lacuna de 10mm, em comparação aos controles que continham os tubos de silicone vazios. Outros estudos, como o uso de filamentos de colagénio demonstraram que guiam os axónios em regeneração em defeitos de 20-30mm, em ratos. Fibras de colagénio orientadas dentro de géis, alinhadas usando campos magnéticos forneceram um modelo melhorado para a extensão de neurites em relação às fibras de colagénio orientadas aleatoriamente. Atualmente os estudos centram-se também na investigação de outras moléculas naturais para a aplicação do reparo do nervo, incluindo ácido hialurónico, fibrinogénio, geles de fibrina, entre outros (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Outros tipos de tubos combinados são com base no enriquecimento com elementos à base de fatores de crescimento, células de Schwann, entre outros como vai ser descrito mais adiante, pois a terapia celular tem uma grande influência na regeneração

do tecido nervoso, principalmente as células de Schwann sendo estas um complemento na restauração nervosa (Battiston, B. *et al.*, 2005).

Os tubos combinados representam um futuro no reparo do nervo na prática clínica, uma vez que dois notáveis resultados, através de diferentes estudos, surgem sobre esta questão. Em primeiro, vários estudos demonstraram que as condutas nervosas podem trazer semelhantes ou até melhores resultados funcionais em comparação com o enxerto do nervo autólogo. Em segundo, existe a evidência de o limite máximo de comprimento ser de 3cm, podendo ser ultrapassado por novos tipos de condutas feitas pela Engenharia de Tecidos (Battiston, B. *et al.*, 2005).

### **3. Terapia Celular**

A terapia celular associa-se à Engenharia de Tecidos, atuando no contexto da medicina regenerativa, procurando controlar a capacidade natural da regeneração de tecidos (Oliveira, C. *et al.*, 2010).

No SNP, os investigadores têm-se debruçado em encontrar uma alternativa para o enxerto do nervo autólogo e assim eliminar a necessidade de duas cirurgias e a remoção de tecido do paciente. As células são veículos eficazes e adequados para o fornecimento de fatores neurotróficos, matriz extracelular e moléculas de adesão, em que a regeneração do nervo pode ser muito facilitada por estes importantes fatores. As células tronco e as células olfativas Ensheathing (OEC) estão a ser amplamente investigadas como transplantes para a regeneração do nervo, tanto a nível do SNP como do SNC (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Assim, com o objetivo de aumentar a regeneração axonal foram desenvolvidos estratégias de incorporar células ou moléculas nas condutas nervosas.

#### **3.1. Células de Schwann**

Estas células, fazendo parte da glia do sistema nervoso periférico, são células de suporte aos axónios. Pois, estas secretam fatores de crescimento e isolam os axónios

formando uma bainha de mielina. Para além disso, são capazes de produzir moléculas da matriz extracelular, como laminina e colagénio (Sebben, A. *et al.*, 2011).

Estudos experimentais baseados na utilização destas células como alternativa terapêutica para a recuperação de nervos com perda de substância comprovaram a eficácia destas células (Sebben, A. *et al.*, 2011).

Tendo como sua principal função serem células de suporte aos axónios através da libertação de fatores de crescimento, e isolamento dos axónios através da formação de bainhas de mielina (Chaulfaun, C., *et al.*, 2006; Sebben, A. *et al.*, 2011), desempenham um papel importante na manutenção, nutrição e no reparo dos nervos periféricos (Sebben, A. *et al.*, 2011).

Uma vez presentes no SNP, as células de Schwann são as principais responsáveis pelo ambiente dentro de um enxerto de nervo periférico, pois produzem matriz extracelular, uma grande variedade de fatores de crescimento, tais como NT-3, NGF, BDNF, CNTF e FGF, e moléculas de adesão de células neurais. Estas células também desempenham um papel crítico na condução de axónios periféricos para a parte distal do nervo, e na formação de sinapses. Além disso, as culturas altamente puras de células de Schwann podem ser cultivadas de forma fiável, sendo facilmente expandidas *in vitro*, a partir de auto-enxertos de nervos, permitindo assim o transplante destas células de apoio autólogas, evitando uma resposta imune. Por todas estas razões, estas células têm sido alvo de pesquisa intensa para promover a regeneração do nervo (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Relatos experimentais suportam o conceito de que estas células oferecem um substrato altamente preferido para a migração de axónios e libertação de fatores bioativos que melhoram a migração do nervo periférico para a parte distal. No nervo não lesionado, estas células parecem ser de repouso, no entanto, quando este é lesionado, as células de Schwann sofrem concomitante mudança com a degeneração axonal, na parte distal. Em poucas horas, estas começam a expressar MAC-2, uma lectina específica da galactose que medeia o volume de fagocitose nas primeiras horas da lesão (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

Embora estas células possuam potencial regenerativo, existem fatores limitantes para o uso das mesmas, provocando efeitos indesejáveis, tais como a inibição da migração destas células no SNC, retardada recuperação funcional e, em certos casos, seguem o caminho para a substância branca em vez da substância cinzenta (Subramanian, A. *et al.*, 2009). Para além disso, o cultivo destas células, exige a colheita dos nervos sensoriais periféricos para a cultura e expansão antes da implantação (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

Estas células têm-se mostrado com grande potencial na promoção de reparação da medula espinal, no entanto os estudos feitos evidenciam que estas células têm melhores resultados e uma maior promessa, quando combinadas com outros fatores, tais como Matrigel (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). Bunge e seus colegas investigaram o uso de células de Schwann cultivadas em Matrigel dentro de condutas de orientação do nervo, com a extremidade distal tampada, para determinar o seu efeito sobre a lesão na espinal medula. Neste estudo usaram um modelo de lesão de transacção completa, removendo a espinal medula entre T9-T11 e substituíram pelas condutas de orientação do nervo contendo células de Schwann. Em comparação com as condutas de controlo, estas mostraram um aumento na remielinização, bem como a regeneração axonal propriospinal e sensorial. No seguimento deste estudo, abordou-se a entrega de BDNF e NT-3 a partir de bombas osmóticas, resultando na regeneração dos axónios da supra-espinal, no entanto nenhuma avaliação da recuperação funcional foi relatada. Um terceiro estudo indicou que o uso de canais em aberto resultou na regeneração de ambas as extremidades da lesão. Assim sendo, concluiu-se que os animais feridos recuperaram a condução do impulso depois de receber as células de Schwann (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

O uso de células de Schwann geneticamente modificadas, aumentando a secreção de fatores de crescimento, tais como o NGF e BDNF, revelou um aumento na regeneração axonal em comparação às células não modificadas, no entanto em ambas as linhagens celulares não houve recuperação funcional (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

De um modo geral, os resultados de várias pesquisas mostram que estas células funcionam melhor quando associadas a outras abordagens terapêuticas que minimizem os inibidores da regeneração no local da lesão (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008). Ou seja, na maioria dos estudos publicados, o enriquecimento das condutas sejam elas biológicas ou sintéticas, com células de Schwann, melhorou significativamente a

recuperação funcional do nervo. Por exemplo Zhang, *et al.*, e Strauch, *et al.*, demonstraram que uma conduta de veia preenchido com estas células foi bem sucedida no restauro de defeitos nervosos em coelhos (Battiston, B. *et al.*, 2005).

### 3.2.Células Olfativas Ensheathing (OECs)

Ao contrário do resto do SNC do adulto, o bulbo olfatório mantém a sua capacidade de regeneração. Pois, os neurónios encontrados no sistema olfativo duram aproximadamente 4 semanas antes de morrer, sendo substituídos por neurónios recém – formados. Esta capacidade deve-se à presença de OECs, que são células gliais que comandam a diferenciação das células progenitoras presentes no sistema olfativo (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Estas células, como foi dito são células gliais, que continuamente regeneram e mielinizam os nervos olfativos (Chaulfaun, C., *et al*, 2006). Elas têm propriedades tanto das células de Schwann como dos astrócitos, estando presentes tanto no tecido periférico como no central (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

Uma vez que têm esta capacidade, estas têm sido amplamente estudadas tanto na promoção da regeneração no SNP como no SNC (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008). Pois, o transplante destas células aumenta a migração e secreção de moléculas da matriz extracelular e fatores neurotróficos (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que o grau de recuperação funcional após implantação destas células é rápido em comparação com as células de Schwann (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

Estudos feitos com o uso destas células para regeneração no SNC demonstraram que estas aumentam o efeito regenerativo das células de Schwann após transecção completa da medula espinal, permitindo uma ampla regeneração através da cicatriz glial e permitindo o crescimento axonal de longas distâncias. Como também, estudos a longo prazo, como a injeção destas células em ratos com secção da medula espinal, demonstraram regeneração axonal, recuperando a função sensorial e motora setes meses após transplante (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Devido ao processo de colheita ser invasivo, uma vez que remover OECs do bulbo olfativo pode comprometer o olfato do humano, e por isso, uma fonte alternativa destas células é no tecido periférico, sendo obtidas a partir da biópsia do epitélio olfativo do nariz. No entanto, estudos também demonstraram que OECs humanas se comportam de uma forma semelhante às dos ratos. Logo, estes podem ser uma fonte de OECs obtidas a partir do bulbo olfatório, sendo estas derivadas do tecido nervoso central (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

OECs modificadas podem também segregar fatores neurotróficos. Estudos a este nível em ratos revelaram-se satisfatórios, uma vez que foi promovida a recuperação funcional (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

A compreensão detalhada das suas propriedades biológicas e moleculares é essencial para garantir a sua eficácia clínica após o transplante destas células olfativas (Higginson, J. e Barnett, S., 2011).

### 3.3.Células Estaminais

Alguns dos desafios na utilização destas células incluem determinar os sinais corretos para a sua diferenciação em células específicas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008). As células estaminais pluripotentes podem permitir múltiplos caminhos de diferenciação, podendo criar um ambiente permissivo para a regeneração (Chaulfaun, C. *et al*, 2006).

A maioria dos estudos feitos com estas células são feitos a partir da colheita de células estaminais animais (ratos), uma vez que a colheita em humanos para estudos clínicos tem que ultrapassar questões éticas (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008). Assim, as células estaminais neurais têm sido isoladas a partir do cérebro, da espinal medula, músculo esquelético e medula óssea de ratos (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). As células estaminais neurais são células multipotentes, dando origem às células do sistema nervoso. Elas são encontradas tanto em tecidos embrionários como adultos, como já referido (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

As células estaminais embrionárias de rato são atraentes para estudos pré-clínicos porque são de fácil cultura e facilmente diferenciam-se em células do sistema nervoso. Pois, um dos primeiros estudos na utilização destas células, para o tratamento da lesão medular em ratos, demonstrou que promoveram a formação de células da glia, oligodendrócitos e astrócitos, para estas serem transplantadas para o local da lesão. Estas células depois de transplantadas demonstraram a capacidade de remielinização, indicando assim uma grande potencialidade das células estaminais no tratamento de lesões no SNC, mais propriamente na medula espinal (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008). Estas células progenitoras da glia têm sido utilizadas com sucesso em aplicações de remielinização, após desmielinização ou lesão, aumentando a regeneração e a recuperação funcional do tecido nervoso (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

No entanto, no transplante direto de células estaminais para o local da lesão, estas podem sobreviver durante semanas e diferenciar-se em neurónios, astrócitos e oligodendrócitos. Pois, sabe-se que após 2-5 semanas do transplante, elas ainda estão ativas para se diferenciarem (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Assim, Weidner, *et al.*, tem estudado o uso de células progenitoras de células neurais para o tratamento da lesão da medula espinal. Um dos seus estudos é sobre a capacidade de diferenciação tanto *in vitro* como *in vivo* (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Tendo estas células a capacidade de se diferenciarem nas linhagens celulares do sistema nervoso, esta diferenciação é feita através de um ambiente controlado em suportes que contêm componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento. Suportes à base de fibrina foram bem sucedidos para aplicações em engenharia de tecidos neurais (Subramanian, A. *et al.*, 2009). Um maior controlo *in vitro* na diferenciação das células embrionárias pode permitir o transplante dessas mesmas células e produzir resultados mais previsíveis (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Está descrito que estas células também têm influência no que toca ao reparo do nervo periférico, e não só como descrito até aqui na medula espinal. Pois, a capacidade da sua diferenciação *in vitro*, torna possível a sua utilização no reparo tanto do nervo periférico como na espinal medula. Estudos assim o indicam, que a utilização destas

células juntamente com a técnica de tubulização aumentaram a regeneração nervosa e a recuperação funcional do nervo periférico (Sebben, A. *et al.*, 2011).

Contudo, vários estudos investigaram o potencial de células estaminais neurais derivadas de seres humanos, para promover a recuperação da lesão da medula espinal em modelos animais (ratos). Estas células foram recolhidas de tecidos fetais do cérebro, revelando resultados satisfatórios, no que toca à sua diferenciação em células da glia e neurónios, promovendo também um aumento na recuperação funcional (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

### 3.4. Entrega de células

Uma vez tomada a decisão sobre o tipo de células a usar, a próxima consideração é como entregar as células para o local da lesão, pois o transplante de células deve garantir a integridade e viabilidade das células (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Em métodos de engenharia de tecidos à base de células, isoladas e disseminadas, estas são injetadas na corrente sanguínea ou de um órgão específico do recetor. A injeção de células evita as complicações de uma cirurgia, permite a substituição de apenas as células que fornecem a função necessária, e permite a manipulação de células antes da infusão (Saxena, A., 2005).

Um método alternativo para o fornecimento de células para o sítio da lesão envolve a utilização de suportes, em que estas são semeadas neste, e em seguida o suporte é implantado no local da lesão (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008). O suporte funciona como uma estrutura temporária utilizada para apoio das células na construção ou reparação de tecidos (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

A utilização de suportes tem algumas vantagens em relação ao uso da injeção direta. Pois, os suportes podem proporcionar um ambiente mais hospitaleiro para a sobrevivência celular, bem como ser um suporte trófico para as células. Estes podem ser modificados com o objetivo de promover a sobrevivência celular e promover a diferenciação de células estaminais (Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S., 2008).

Vários materiais (sintéticos e naturais) foram utilizados como condutas de nervos, servindo de suportes para as células. Assim, a matriz extracelular tem um papel importante, pois fornece um meio para as células interagirem e migrarem, promovendo a adesão celular, proliferação e diferenciação *in vitro* e *in vivo* (Subramanian, A. *et al.*, 2009). Daí a sua importância na utilização desta na técnica de tubulização. Pois, componentes da matriz extracelular como colagénio, laminina, entre outros, estão envolvidos no processo de regeneração. O preenchimento de tubos com matriz extracelular apresenta um aumento na taxa de regeneração e de conexão em lesões extensas (Sebben, A. *et al.*, 2011; Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

#### **4. Terapia Biomolecular**

##### **4.1. Fatores neurotróficos**

Os fatores neurotróficos também conhecidos como fatores de crescimento são polipeptídeos e têm sido um foco de grande investigação na regeneração neuronal, sendo testados tanto *in vitro* como *in vivo* (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Subramanian, A. *et al.*, 2009; Terenghi, G., 1998; Sebben, A. *et al.*, 2011). Estes suportam a sobrevivência, diferenciação e crescimento dos neurónios e dos diferentes tipos celulares no desenvolvimento do sistema nervoso e promovem a regeneração do nervo (Belkas, J. *et al.*, 2004). Muitas vezes, os neurónios não recebem as quantidades adequadas de neurotrofinas em apoptose (Willerth, S., Sakiyama-Elbert, S., 2007). Assim, os fatores neurotróficos têm sido vistos como ideais para o tratamento de doenças neurodegenerativas do SNC, neuropatias e lesão do nervo periférico (Terenghi, G., 1998).

Admite-se que os fatores neurotróficos são um conjunto de três famílias de moléculas e seus receptores, responsáveis por manter o crescimento e sobrevivência dos axónios e neurónios motores e sensitivos, após danos teciduais (Sebben, A. *et al.*, 2011).

A família das neurotrofinas tem sido fortemente investigada na regeneração de nervos. Estas incluem o fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina – 3 (NT-3) e neurotrofina - 4/5 (NT - 4/5). Outros fatores neurotróficos que não fazem parte desta família, como fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator de crescimento derivado da linhagem de células da glia (GDNF) e fatores

de crescimento, ácido e básico, de fibroblastos (aFGF e bFGF), promovem uma gama de respostas neuronais, tendo mostrado sucesso em estudos de regeneração do nervo (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Belkas, J. *et al.*, 2004).

A descoberta de NGF foi das mais úteis para a regeneração do sistema nervoso (Subramanian, A. *et al.*, 2009; Chaulfaun, C. *et al.*, 2006). As células de Schwann segregam NGF e outros fatores após a lesão do nervo periférico e, como resultado, o NGF tem sido investigada como um tratamento para tratar lesões de nervos periféricos (Willerth, S., Sakiyama-Elbert, S., 2007). Desempenha um papel fundamental na regeneração de nervos periféricos, pois este é expressado em níveis baixos pelo nervo periférico saudável. No entanto, quando há lesão tanto ao nível do nervo periférico como na medula espinal, NGF é regulado positivamente, acumulando-se na parte distal do nervo periférico, e na parte distal e proximal da lesão medular. A nível celular, estes promovem a sobrevivência e crescimento das ramificações de neurónios sensoriais, mas não ajudam na regeneração de neurónios motores (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). Pois, os neurónios motores não têm recetores de alta afinidade para NGF, como os neurónios sensoriais apresentam os TrKA que são recetores de alta afinidade para NGF, daí os níveis de NGF aumentarem aquando lesão do nervo sensorial. Estudos que comprovam que o NGF quando combinado com biomateriais e com libertação controlada, o seu efeito é potencializado, promovendo a regeneração nervosa com melhoria funcional (Sebben, A. *et al.*, 2011).

BDNF está presente nos neurónios motores, uma vez que estes, tal como os neurónios sensoriais para NGF, apresentam recetores de alta afinidade (TrKB) para BDNF (Sebben, A. *et al.*, 2011). Este fator tem de ser entregue localmente e em altas concentrações para ter um efeito sobre a regeneração do nervo (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). Ou seja, estudos concluem que a entrega desta biomolécula tem que ser contínua em condutas biodegradáveis (Sebben, A. *et al.*, 2011) promovendo assim a sobrevivência de neurónios motores e a sua excrescência, bem como o crescimento axonal sensorial (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

O fator neurotrófico NT-3 estimula o crescimento e diferenciação de novos neurónios e sinapses, e atua na diferenciação de neurónios. Este é maioritariamente encontrado em neurónios do SNC. Estudos comprovam que a utilização desta

biomolécula em combinação com NGF e BDNF promove regeneração tanto a nível periférico como na medula espinal, respetivamente. Sugerindo assim, que este fator de crescimento desempenha um papel importante na regeneração nervosa (Sebben, A. *et al.*, 2011). Assim como a NT-4/5, possuindo atividade semelhante à NT-3, comprovou o seu papel na regeneração nervosa, promovendo a sobrevivência e crescimento de neurónios motores e sensoriais (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

GDNF, sendo estes derivados de células gliais, são fundamentais na formação tanto de neurónios motores como de neurónios sensoriais (Sebben, A. *et al.*, 2011) promovendo a sua sobrevivência e o seu crescimento tanto a nível do SNC como do nervo periférico (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). A presença deste aumenta intensivamente na lesão do nervo, daí o seu forte envolvimento na regeneração de nervos periféricos. Estudos concluíram que a combinação com CNTF e NGF resultaram em recuperação funcional após lesão do nervo ciático em ratos, tanto na sobrevivência de neurónios sensitivos e motores como no crescimento de neuritos e alongamento dos neurónios motores e sensoriais (Sebben, A. *et al.*, 2011). GDNF em comparação com NGF e NT-3 promove um crescimento mais extenso dos neurónios (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Os níveis de expressão de CNTF decrescem significativamente e continuam baixos por um longo período após lesão do nervo periférico (Sebben, A. *et al.*, 2011) no entanto os seus níveis são aumentados em lesões ao nível da espinal medula. Contudo, este demonstrou desempenhar um papel na cicatriz glial (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Willerth, S., Sakiyama-Elbert, S., 2007). A aplicação deste fator neurotrófico exogenamente tem sido associada a níveis aumentados de regeneração após lesão, tanto na medula espinal como no nervo periférico. Mas, no que diz respeito à regeneração de nervos periféricos, resultados conclusivos foram apenas *in vitro* ou em animais de pequeno porte. Pois, em humanos e animais de grande porte não se mostraram muito vantajosos (Sebben, A. *et al.*, 2011; Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Muitos estudos feitos com fatores neurotróficos para a regeneração do nervo, tanto no SNP como no SNC, demonstram muitas vezes resultados inconclusivos. No entanto, sabe-se que a aplicação destes exogenamente promove uma variedade de respostas neurais, como sobrevivência e excrescência dos neurónios sensoriais e motores dos nervos, regeneração do nervo tanto na medula espinal como no SNP e crescimento do

nervo sensorial ao longo da zona de transição SNP-SNC. Muitas vezes os resultados são inconclusivos, pois *in vivo*, as respostas podem variar de acordo com o método de entrega do fator de crescimento (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

#### 4.2. Métodos de entrega

Uma variedade de técnicas para fornecer estas biomoléculas têm sido utilizadas, incluindo bombas osmóticas e reservatórios de silicone (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Terenghi, G., 1998; Belkas, J. *et al.*, 2004). Contudo, estes métodos não são os mais adequados para aplicação clínica, pois há potencial de causar inflamação e infecção devido aos seus componentes não degradáveis (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). Assim, outras técnicas têm sido investigadas, como a administração subcutânea ou injeção intraperitoneal e a utilização de materiais bioabsorvíveis (Terenghi, G., 1998). Assim como a utilização de matrizes poliméricas, microesferas e da terapia génica são métodos de entrega eficazes (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Os fatores neurotróficos podem ser incorporados em matrizes poliméricas. Os polímeros sintéticos e naturais são amplamente utilizados na libertação controlada em dispositivos. Estes são concebidos para que as biomoléculas sejam libertadas de forma espacial e temporalmente controlada, ou seja, a libertação pode ocorrer à medida que o polímero degrada ou por difusão através dos poros da matriz do polímero (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

As microesferas são vulgarmente utilizadas para entrega destas biomoléculas no SNC. Estas auxiliam na libertação controlada dos fatores de crescimento (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). No entanto, este método apresenta algumas desvantagens, como a degradação, em que esta pode ser variável (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006) e o seu diâmetro (até 1mm), podendo ser aplicada uma técnica menos invasiva, como por exemplo a injeção (Schmidt, C. e Leach, J., 2003). Contudo, pesquisas demonstram que a duração de entrega de fatores de crescimento pode ser mantida por um período prolongado de tempo (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006). Cao e Shoichet encapsularam fatores neurotróficos em microesferas biodegradáveis que libertaram o seu conteúdo à medida que se degradavam, melhorando a biodisponibilidade e a bioatividade (Belkas, J. *et al.*, 2004). O encapsulamento destes fatores em diversos polímeros tanto naturais (quitosano, alginato),

como sintéticos foram investigados, mostrando uma grande promessa em modelos de lesão medular (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Assim, em aplicações neurais o uso da tubulização, consistindo esta no uso de um canal de guiamento do nervo, também serve como dispositivo de entrega de fatores neurotróficos para ajudar na regeneração do nervo (Schmidt, C. e Leach, J., 2003; Belkas, J. *et al.*, 2004). Sendo os fatores de crescimento incorporados na matriz polimérica do canal, é dispensável a preocupação da biodisponibilidade ou da bioatividade (Belkas, J. *et al.*, 2004). Alguns materiais poliméricos, como por exemplo PLGA, demonstraram grande potencial como transportadores de fatores neurotróficos (Subramanian, A. *et al.*, 2009).

Os níveis de fator de crescimento que se pretende podem requerer a entrega destes, com tempo e sequências alternadas. Assim, os protocolos para a entrega destas biomoléculas devem abordar a sequência e tempo, de dosagem, de distribuição de vetores, e a duração da terapêutica (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

A utilização de polímeros de libertação prolongada, apesar de demonstrarem uma grande promessa no que toca à regeneração do tecido nervoso, como dispositivos de entrega de fatores de crescimento, apenas proporcionam um reservatório destes agentes bioativos. Assim, futuras estratégias estão a ser baseadas em terapia génica para a produção a longo prazo de fatores de crescimento ativos *in situ* (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

A terapia génica, no que compete ao restauro do tecido nervoso, consiste na inserção de genes nas células neuronais, em que estas produzem fatores neurotróficos. Alternativamente, a regeneração dos neurónios pode ser sustentada por enxertos de células que foram geneticamente manipuladas para produzir fatores neurotróficos (Terenghi, G., 1998). A utilização de vetores virais também tem sido amplamente investigados em diversos tecidos e incluem métodos baseados em retrovírus, vírus do herpes simplex e adenovírus. Os dois últimos são amplamente investigados no tecido nervoso (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006; Schmidt, C. e Leach, J., 2003). No entanto, por se tratarem de agentes virais, existe um certo risco associado. Logo, antes de serem

utilizados em testes clínicos, estes devem ser minimizados de qualquer resposta inflamatória (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Assim, a utilização de vetores não-virais têm sido alvo de pesquisa. O DNA nu pode ser injetado diretamente, mas esta técnica resulta em baixa expressão. Assim, os lipoplexos ou os complexos de DNA com lípidos catiónicos são um dos métodos de administração de genes não virais mais comuns e bem sucedidos. No entanto os mecanismos pelos quais os vetores não virais são capazes de transfectar células não está bem entendido, logo a otimização desses sistemas continua a ser um desafio na pesquisa (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

As estratégias experimentais no que toca à manipulação genética para a regeneração de nervos mostram grande potencial na terapêutica tanto no SNC como SNP (Terenghi, G., 1998). Sabe-se que os fatores neurotróficos afetam a expressão de genes que promove a sobrevivência neuronal e o crescimento axonal. Assim, a pesquisa também se tem centrado na manipulação de genes que estão associados à regeneração do nervo (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Sabe-se que os RAG's (genes associados à regeneração) são expressos em primeiro lugar durante o desenvolvimento do sistema nervoso, e que a expressão destes genes no nervo adulto saudável é negligenciável, no entanto, quando o nervo periférico é lesionado estes genes são re-expressados, resultando muitas vezes em regeneração bem sucedida. O mesmo não acontece na lesão medular, mas a regulação positiva destes genes na medula espinal pode ser um tratamento eficaz (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

Como já descrito, os fatores neurotróficos podem resultar em aumentos significativos na regeneração nervosa. No entanto, é difícil o seu fornecimento controlado ao longo da duração da regeneração. Assim, as células geneticamente modificadas transplantadas representam uma grande vantagem pois são uma fonte contínua de fatores neurotróficos (Schmidt, C. e Leach, J., 2003).

## Capítulo VI – Perspetivas futuras

Hoje em dia, a maioria dos autores concorda que o enxerto do nervo ainda deve ser considerada a primeira escolha de estratégia para a reparação de nervos, principalmente de nervos periféricos. No entanto, a tubulização tem vindo a crescer como uma alternativa ao enxerto do nervo, logo, esta suposição pode vir a alterar ao longo dos próximos anos (Battiston, B. *et al.*, 2005).

Avanços significativos foram feitos na conceção de alternativas para o enxerto do nervo, para além do uso de condutas de nervos, a manipulação de fatores de crescimento através da engenharia genética, a indução e diferenciação de células estaminais, entre outras. No entanto no que diz respeito à incorporação destas aplicações clinicamente, muitos obstáculos têm que ser superados (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

A utilização de diferentes células, por si só requerem ambientes de cultura únicos, tornando difícil criar os suportes apropriados e biocompatíveis com diferentes linhagens celulares. Estamos assim, perante o desafio de criar suportes capazes de “suportar” uma variedade de tipos de células (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

A natureza exata de uma conduta de um nervo ideal é desconhecida, contudo, com a capacidade de projetar e modificar os materiais utilizados em termos físicos e químicos, a correta combinação será encontrada (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

Quanto ao uso de fatores neurotróficos, ainda há muito a aprender e compreender. Pois, a dosagem adequada, definir com precisão a sequência da sua expressão e a sua duração, são fatores nos quais tem que haver uma melhor aprendizagem (Chaulfaun, C. *et al.*, 2006).

Em cultura de células, células estaminais têm vindo a ganhar destaque ao longo dos anos, e muito provavelmente as pesquisas a este nível vão criar impactos positivos no sentido de encontrar uma alternativa adequada para o enxerto do nervo autólogo. Assim, o estudo da diferenciação celular induzida pela composição do suporte é fundamental na regeneração de tecidos e órgãos (Barbanti, S. *et al.*, 2005).

A fim da utilização de células estaminais, muitos aspetos éticos têm que ser ultrapassados para obter pesquisas mais concretas nesse sentido.

A engenharia de tecidos é uma tecnologia com benefícios profundos e um enorme potencial no futuro, oferecendo a promessa no tratamento de perda de função de órgãos ou tecidos.

## Capítulo VII – Conclusão

A engenharia de tecidos tem como objetivo a reparação, regeneração ou substituição de tecidos e órgãos tanto a nível estrutural como funcional. No caso do sistema nervoso, esta abordagem foca-se mais na regeneração do próprio tecido, evitando e tentando encontrar alternativas para o enxerto do nervo autólogo.

Assim, as pesquisas têm-se focado na produção e aplicação de novos biomateriais para uso de suportes. Estes, no que respeita ao uso na regeneração do Sistema Nervoso, funcionam como canais de guiamento dos nervos, havendo sucesso tanto ao nível do SNP como no SNC.

Para além disso, é necessária uma combinação de elementos biológicos e sintéticos para que a regeneração no Sistema Nervoso apresente melhores resultados. Assim, os suportes utilizados “suportam” os elementos biológicos, tais como componentes da matriz extracelular, a transplantação de células e de biomoléculas. Estudos comprovaram sucesso na conjugação entre os suportes e estes constituintes biológicos.

Uma compreensão precisa da biologia celular com ênfase na diferenciação celular, interação celular e formação de matriz extracelular é de extrema importância para obter sucesso na regeneração do tecido nervoso.

A engenharia de tecidos é uma área dinâmica e inovadora que permite a colaboração entre cientistas, médicos e indústria, a fim de fazer avanços significativos no atendimento clínico.

## Capítulo VIII – Referências Bibliográficas

Aguayo, A., Vidalsanz, M., Villegasperez, M., Bray, G. (1987). Growth and connectivity of axotomized retinal neurons in adult-rats with optic nerves substituted by Pns grafts linking the eye and the midbrain, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 495, pp. 1 – 9.

Armentano, I., *et al.* (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polymer Degradation and stability*, 95 (2010), pp. 2126 – 2146.

Barbanti, S. H., Zavaglia, C., Duek, E. (2005). Polímeros Biorreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15 (1), pp. 13-21.

Batista, K., Araújo, H. (2009). Microcirurgia das lesões traumáticas de nervo periférico do membro superior, *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, 25 (4), pp. 708 – 714.

Battiston, B. *et al.* (2005). Nerve Repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and syntetic conduits for sensory nerve repair. [Em linha]. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/micr.20127/full>>. [Consultado em 02/04/2014].

Belkas, J., Shoichet, M., Midha, R. (2004). Peripheral nerve regeneration through guidance tubes, *Neurological research*, 26, pp. 1 – 10.

Cardoso, G., Arruda, A. (2009). O papel das células tronco na engenharia tecidual, *Ciências & Cognição*, 14 (3), pp. 214 – 219.

Carvalho, A. Pereira, E., Costa, C., Barreto, I., Madureira, L., Paim, F. (2010). Estratégias regenerativas da boengenharia tecidual e aspetos éticos, *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 9 (1), pp. 20 – 27.

Chalfoun, C., Wirth, G., Evans, G. (2006). Tissue engineered nerve constructs: where do we stand?, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10 (2), pp. 309 – 317.

Côté, M., *et al.* (2011). Peripheral Nerve Grafts Support Regeneration after Spinal Cord Injury, *The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 8, pp. 294 – 303.

Cunha, A., Lemos, S., *et al.* (2007). Utilização da veia glicerolada na regeneração neural. Estudo experimental em ratos, *Acta Ortopédica Brasileira*, 15 (4), pp. 210 – 213.

Dawson, E., Mapili, G., Erickson, K., Taqvi, S., Roy, K. (2007). Biomaterials for stem cell differentiation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (2008), pp. 215 – 228.

Del Bel, E., Silva, C., Mladinic, M. (2009). O trauma raquimedular, *Coluna/Columna*, 8 (4), pp. 441 – 449.

Guzen, F., *et al.* (2006). Tratamento farmacológico e regeneração do sistema nervoso central em situações traumáticas, *Revista Neurociências*, 17 (2), pp. 128 – 132.

Haines, D. (2006). Biologia celular dos neurónios e da glia. In: Haines, D. (Ed.). *Neurociência Fundamental para aplicações básicas e clínicas*. 3ª Edição. Rio de Janeiro, Elsevier, pp. 17 – 39.

Haines, D. (2006). Orientação à estrutura e à imagem do sistema nervoso central. In: Haines, D. (Ed.). *Neurociência Fundamental para aplicações básicas e clínicas*. 3ª Edição. Rio de Janeiro, Elsevier, pp. 3 – 15.

Higginson, J., Barnett, S. (2011). The culture of olfactory ensheathing cells (OECs) – a distinct glial cell type, *Experimental Neurology*, 229 (1), pp. 2 – 9.

Jones, J. (2006). Observing cell response to biomaterials, *Materials today*, 9 (12), pp. 34 – 43.

Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J. (2006). Microscale technologies for tissue engineering and biology, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 103 (8), pp. 2480 – 2487.

Keirstead, S., Rasminsky, M., Fukuda, Y., Carter, D., Aguayo, A., Vidalsanz, M. (1989). Electrophysiologic responses in hamster superior colliculus evoked by regenerating retinal axons, *Science*, 246, pp. 255 – 257.

Oliveira, C. *et al.* (2010). Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual, *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 9 (1), pp. 28 – 36.

Saladin, K. (2003). *Anatomy and Physiology – The unit of form and function*. 3ª Edição. New York, McGraw-Hill.

Santos Jr, A., Wada, L. M. (2007). Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 17 (4), pp. 308-317.

Saxena, A. (2005). Tissue engineering: Present concepts and strategies, *Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons*, 10 (1), pp. 14 – 19.

Schmidt, C., Leach, J. (2003). Neural Tissue Engineering: Strategies for repair and regeneration, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5, pp. 293 – 347.

Sebben, A., Lechtenfels, M., Silva, J. (2011). Regeneração de nervos periféricos: Terapia celular e fatores neurotróficos, *Revista Brasileira de Ortopedia*, 46 (6), pp. 643 – 649.

Sebben, A. *et al.* (2011). Efeito de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico, *Scientia Medica*, 21 (2), pp. 81 – 89.

Seeley, R., Stephens, T., Tate, P. (2003). Encéfalo e nervos cranianos. In: Seeley, R. (Ed.). *Anatomia & Fisiologia*. 6ª Edição. Loures, Lusociência, pp. 443 – 473.

Seeley, R., Stephens, T., Tate, P. (2003). Organização funcional do tecido nervosa. In: Seeley, R. (Ed.). *Anatomia & Fisiologia*. 6ª Edição. Loures, Lusociência, pp. 374 – 441.

Subramanian, A., Krishnan, U., Sethuraman, S. (2009). Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration, *Journal of Biomedical Science*, 16, p.108.

Teixeira, M., Oliveira, C., (2011). A bioética e a investigação em células estaminais humanas – em Portugal e na Comunidade Europeia, *Revista Brasileira de Bioética*, 7 (1 – 4), pp. 32 – 46.

Tekin, H., Sanchez, J., Tsinman, T., Langer, R., Khademhosseini, A. (2011). Thermoresponsive Platforms for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *National Institutes of Health*, 57 (12), pp. 3249 – 3258.

Terenghi, G. (1998). Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors, *Journal of Anatomy*, 194, pp. 1 – 14.

Vacanti, J., Vacanti, C. (2007). *Principles of Tissue Engineering*. 3ª Edição, London, Elsevier.

Watt, F., Driskell, R. (2010). The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical transactions of the royal society B*, 365 (1537), pp. 155 – 163.

Willerth, S., Sakiyama-Elbert, S. (2007). Approaches to Neural Tissue Engineering using Scaffolds for Drug Delivery, *National Institutes of Health*, 59 (4 – 5), pp. 325 – 338.

Willerth, S., Sakiyama-Elbert, S. (2008). Cell Therapy for Spinal Cord Regeneration, *National Institutes of Health*, 60 (2), pp. 263 – 276.

Willerth, S., Sakiyama-Elbert, S. (2008). Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. [Em linha]. Disponível em <<http://www.stembook.org/node/450>>. [Consultado em 02/06/2014].

Yarak, S., Okamoto, O. (2010). Células – tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85 (5), pp. 647 – 656.